

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

**PRİLOCAİNE HCl'İNİN BİYOANALİTİK YÖNTEM  
VALİDASYONU**

**Arş. Gör. Alptuğ ATİLA**

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

**Yüksek Lisans Tezi  
ERZURUM-2006**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Analitik Kimya Programında Bilim Uzmanlığı Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tezin Enstit¼ye Verildiği Tarih :01.09.2006

Tezin S¼zl¼ Savunma Tarihi :20.09.2006

Tez Danışmanı: : Prof. Dr. Y¼cel KADIOğLU  
(Atat¼rk niversitesi)

¼ye: : Prof. Dr. şahin G¼LLAPOęLU

¼ye: : Prof. Dr. Yunus KARA

¼ye: : Prof. Dr. Nazan DEMİR

¼ye : Doç. Dr. Ufuk ÖZGEN

Enstit¼ M¼d¼r¼  
Doç.Dr. Adnan TEZEL

**Y¼ksek Lisans Tezi**  
**ERZURUM-2006**



İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
SUMMARY.....	X
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Etki Mekanizmaları.....	4
2.2. Lokal Anestezi Şekilleri.....	4
2.2.1. Yüzeysel Anestezi (topikal blok).....	4
2.2.2. İnfiltrasyon Anestezi.....	5
2.2.3. Sinir Bloku (bölgesel blok).....	5
2.2.4. Spinal (intratekal) Anestezi.....	5
2.3. Hastaya Uygun Anestezi Seçimi.....	6
2.4. Kanın Yapısı ve Özellikleri.....	6
2.5. Prilocaine HCl.....	7
2.5.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	7
2.6. Prilocaine HCl ile İlgili Yapılan Çalışmalar .....	7
2.7. Spektroskopik Yöntemler .....	9
2.7.1. Işının Absorplanması.....	10
2.7.1.1. Atomik AbsorpsiyonSpektrumları.....	11
2.7.1.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi .....	12
2.7.2. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar .....	15
2.7.3. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri .....	16
2.7.3.2. Tek Işınlı Spektrofotometreler.....	16

2.7.3.2. Çift Işınlı Spektrofotometreler.....	17
2.7.4. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları.....	18
2.7.4.1. Kalitatif Analiz ve Molekül Yapısını Aydınlatma .....	18
2.7.4.2. Kantitatif Analiz .....	19
2.8. Türev Spektrofotometrisi Yöntemi .....	20
2.8.1. Teorik Temelleri .....	21
2.8.2. Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi .....	23
2.8.3. Türev Spektroskopisi Yönteminin Uygulamaları .....	24
2.9. Kromatografik Yöntemler .....	24
2.9.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması .....	25
2.9.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar .....	27
2.9.2.1. Dağılım Kromatografisi .....	27
2.9.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi .....	27
2.9.2.3. İyon Değişirme Kromatografisi .....	27
2.9.2.4. Boyut-Eleme Kromatografisi .....	28
2.10. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) .....	29
2.10.1. Gaz Kromatografisi Teorisi .....	29
2.10.2. Gaz Kromatografisi Cihazı .....	30
2.10.2.1. Taşıyıcı Gaz .....	31
2.10.2.2. Elektronik Basınç Kontrolü (EPC) .....	32
2.10.2.3. Enjeksiyon Bloğu .....	33
2.10.2.4. Fırın .....	36
2.10.2.5. Kolon .....	36
2.10.2.6. Dedektör .....	38

2.10.2.7. İdeal bir Dedektörden Beklenen Özellikler.....	38
2.10.2.7.1. Azot –Fosfor Dedektör (NPD).....	39
2.10.2.7.2. Kütle Spektrometresi (MS).....	40
2.10.2.7.3. GC-MS Ara Bağlantıları.....	41
2.10.2.7.4. İyon Kaynağı.....	42
2.10.2.7.5. Kütle Analizörü.....	44
2.10.2.7.6. Dedektör .....	44
2.10.2.7.7. Vakum Sistemleri.....	45
2.11. Geçerlilik Testi (Validasyon) .....	46
2.11.1. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	47
2.11.2. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite).....	48
2.11.3. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	48
2.11.4. Duyarlılık.....	48
2.11.5. Tayin alt sınırı (Limit of Quantification, LOQ).....	48
2.11.6. Gözlenebilme (teşhis) Sınırı (Limit of Dedection, LOD).....	49
2.11.7. Tutarlılık .....	49
2.11.8. Geri Kazanım.....	49
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>50</b>
3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler.....	50
3.2. Kullanılan Cihazlar .....	50
3.3. Yöntemler .....	51
3.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması .....	51
3.3.2. Spektrofotometrik Yöntem Koşulları .....	51
3.3.3. Gaz Kromatografisi-Azot Fosfor Dedeksiyon (GC-NPD) ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Yöntem Koşulları.....	52

3.3.4. Prilocaine HCl' nin Plazmadan Ekstraksiyon Prosesi .....	53
<b>4.BULGULAR</b> .....	55
4.1. Prilocaine HCl'nin Saflık Kontrolü .....	55
4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi.....	55
4.2.1. İn-Vitro Çalışması.....	55
4.2.1.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	55
4.2.1.3. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	56
4.2.1.3.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	56
4.2.1.3.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	57
4.2.1.3.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	57
4.2.1.3.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması .....	58
4.2.2. Plazma Çalışması .....	59
4.2.2.1. Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması .....	59
4.2.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	60
4.2.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	60
4.2.2.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	61
4.2.2.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	61
4.2.2.2.4. Plazmadan Geri Kazanım.....	62
4.3. Birinci Derece Türev Spektrofotometri Yöntemi.....	63
4.3.1. İn-Vitro Çalışması .....	63
4.3.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	63
4.3.1.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	64
4.3.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri.....	64
4.3.1.2.2. Gözlenebilme Alt Sınırı (LOD) ve Tain Alt Sınırı (LOQ).....	66

4.3.1.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik .....	66
4.3.1.2.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	68
4.4. Gaz Kromatografisi- Azot Fosfor Dedeksiyon (GC –NPD) Yöntemi.....	70
4.4.1. İn-Vitro Çalışması.....	70
4.4.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	70
4.4.1.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	71
4.4.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	71
4.4.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	72
4.4.1.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	72
4.4.1.2.4.Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	73
4.4.2. Plazma Çalışması .....	75
4.4.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	75
4.4.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu) .....	76
4.4.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi .....	76
4.4.2.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	77
4.4.2.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	77
4.4.2.2.4. Geri Kazanım.....	78
4.5. Gaz Kromatografis Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Yöntemi.....	79
4.5.1. Plazma Çalışması.....	79
4.5.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	79
4.5.1.2.Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	81
4.5.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri.....	81
4.5.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	82
4.5.1.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	82



4.5.1.2.4. Geri Kazanım.....	83
4.5.1.2.5. Stabilite Testi.....	84
4.5.1.2.6. Plazma Çalışmasında GC-NPD ve GC-MS sitemlerinde sıcaklığın ve akış hızının etkisi.....	86
<b>5.TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>90</b>
<b>6.KAYNAKLAR.....</b>	<b>98</b>
<b>7.EKLER.....</b>	<b>102</b>

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Anestezi duyumsama yokluğu anlamına gelmektedir <sup>1</sup>. Genel ve lokal anestezi olarak iki kısma ayrılmaktadır. Genel anestezi, bütün duyu çeşitlerini içine alacak şekilde duyumsama fonksiyonunun tüm olarak ortadan kalkmasını ifade eder ve bilinç kaybı ile oluşur. Lokal anestezi, uygulanan bölgedeki sinir ya da sinirlerin iletiminin bloke edilerek bunların uygulama alanı içine giren bölgede ağrıya karşı duyarlılığın azalmasıdır. Lokal anestezikler temel olarak sinir iletimini tersinir bir şekilde bloke etmek için kullanılan ilaçlar olup löfgren sınıflandırmasına göre zincir yapısından dolayı amid, ester ve eter olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. Prilocaine HCl amid yapılı lokal anesteziklerden birisi olup infiltrasyon, sinir bloku ve spinal anestezi için geniş bir uygulama alanına sahiptir <sup>2,3</sup>. Prilocaine HCl, diğer amid yapılı lokal anesteziklerin aksine toluidinin sekonder bir amino türevi olup “2-(Propilamino)-o-propiyonotoluidine monohidroklörür” kimyasal yapısına sahiptir. Aynı yapıya sahip olan Lidocaine göre daha az toksik, daha az vazodilasyon üretir ve serbest allerjik reaksiyonlarının da daha az olduğu düşünülmektedir <sup>4</sup>. Prilocaine en fazla karaciğerde metabolize olmaktadır. Bunun sonucunda N-propilalanin ve o-toluidine hidroliz olur. Prilocaine alım dozu çocuklarda 8 mg/kg ve yetişkinlerde 600 mg/kg ‘ı aştığı zaman metaboliti o-toluidine ayrılmakta ve bundan dolayı da methemoglobinin oluştuğu görülmektedir<sup>5</sup>. Hemoglobin, eritrositlerde bulunan ve dokulara oksijen taşınmasını sağlayan bir moleküldür. Bu işlevini devam ettirebilmesi için yapısında bulunan demirin ferro (Fe<sup>2+</sup>) formda olması gerekir. Normal hemoglobindeki iki değerli demir, çeşitli oksidatif streslerle oksitlenmesi sonucu üç değerli ferri (Fe<sup>3+</sup>) demir haline gelerek methemoglobinemi (metHb) oluşturur. MetHb, oksijen taşıyamaz ve Hb-oksijen dissosiyasyon eğrisini sola kaydırarak dokulara daha zor oksijen verilmesine yol açar.

Yeni doğan çocuklarda methemoglobin redüktaz enzimi gelişmediği için klinik olarak önemli olan methemoglobin ihtimalini artırırlar. Methemoglobinemi, solunum, kalp yetmezliği ve ağır anemisi olanlarda sorun oluşturabilmektedir. Tekrarlanan enjeksiyonlarda olduğu gibi uzun süreli blok uygulanacaksa, toksik plazma konsantrasyonlarına ulaşma ya da lokal sinir hasarı oluşma riskinin bulunduğu unutulmamalıdır <sup>6,7</sup>.

Lokal anestezi olarak geniş kullanım alanına sahip Prilocaine HCl ile ilgili yapılan literatür taramasında plazma ve ticari preparatlarda miktar tayinine yönelik çok az bilimsel çalışmaya ulaşılmıştır. Literatür taramasında UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi ve Birinci derece türev spektrofotometrisi yöntemleriyle miktar analizine yönelik bir çalışmaya ulaşamadığından bu çalışmada lokal anesteziklerden prilocaine HCl'nin insan plazması ve ticari preparatlarda miktar tayinine yönelik UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi yöntemi ve Birinci Türev Spektrofotometrisi yöntemlerinin geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması, ayrıca bu yöntemlere alternatif olarak GC ve GC-MS yöntemlerinin de geliştirip geçerlilik testlerinin (validasyonlarının) yapılması amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

Uygun derişimdeki lokal anestezipler sinir lifleri ile temasa girdiklerinde bu liflerdeki impuls iletimini geri dönüşümlü olarak bloke ederler. Sadece sinir liflerinde (akson veya dendritlerde) değil aynı zamanda nöronun somasında yani genel olarak bütün eksitabl hücrelerde (çizgili kas, miyokard, düz kas v.b.) depolarize edebilme özelliğini ve depolarizasyon dalgasının yayılmasını geri dönüşümlü bir şekilde kısmen veya tamamen bozabilirler. Esas olarak, ağırlı stimulusların periferden santral sinir sistemine iletimini geçici olarak kesmek için kullanılırlar. Lokal anestezipler, membranda sodyum kanallarının açılmasını engelleyerek içe yönelik hızlı sodyum akımını derişime bağılı olarak azaltırlar. Buna bağılı olarak sinir liflerinde ve diğer uyarılabilir hücrelerde <sup>1</sup>,

1. Aksiyon potansiyelinin yükseliş hızını yani depolarizasyon hızını ( $dv/dt$ ) yavaşlatırlar,
2. Aksiyon potansiyelinin amplitüdünü azaltırlar veya onu tamamıyla ortadan kaldırırlar,
3. Refrakter periyodu uzatırlar,
4. Eksitasyon eşliğini yükseltirler,
5. İletim güvenlik faktörünü azaltırlar ve yeterli derişimde ilaç uygulanmışsa iletimi tam olarak bloke ederler.

Lokal anestezipler yüksek derişimde kullanılmaları haricinde, nöronun istirahat potansiyelini etkilemezler. Kalpteki bazı hücrelerde olduğu gibi impuls üreten uyarılabilir hücrelerde üretim (spontan deşarj) yeteneğı, lokal anestezipler tarafından inhibe edilir. Esas olarak kalsiyum akımı ile yavaş bir şekilde depolarize olan düz kaslar ve kalbin nodal hücrelerinde pek etkili değildirler <sup>1</sup>.

## 2.1. Etki Mekanizmaları

Lokal anesteziye, sinir lifinin (akson veya dendrit) iki önemli fizyolojik özelliği depolarize edilir ve liflerin herhangi bir yerinde oluşan depolarizasyonu belirli bir hızda kendi boyunca iletmesini sağlar. Her iki olayda sinir lifi membranıyla ilgilidir ve bu olaylarda sitoplazmanın primer olarak bir katkısı yoktur.

Elektriksel stimülasyon veya diğer bazı etkenler belirli şiddette iseler uygulandıkları noktada, yayılan aksiyon potansiyeli (spayk potansiyeli) meydana getirirler. Spayk potansiyelinin gelişimi esnasında (1 milisaniyeden daha kısa bir süre), hücre içi potansiyeli istirahat halindeki  $-90 : -60$  mV değerinden  $+30$  mV dolayında bir değere kadar yükselir ve 1-2 milisaniye içinde tekrar başlangıçtaki düzeyine döner. Spayk potansiyelinin oluşması, sinir membranının sodyuma karşı istirahat halinde düşük olan geçirgenliğinin aniden ve ileri derecede artmasına bağlıdır. Lokal anestezikler sodyum kanalını etkileyerek sinir liflerinin daha duyarlı hale gelmesine neden olurlar. Sodyum kanalını etkilemeleri ile ilgili birçok hipotez mevcuttur<sup>1</sup>.

## 2.2.Lokal Anestezi Şekilleri

Uygulanma şekline ve yerine göre dört çeşit lokal anestezi mevcuttur. Bunlar <sup>1</sup>;

**2.2.1.Yüzeysel Anestezi (topikal blok):** Lokal anestezik solüsyonu konjonktiva kesesi, burun, boğaz, trake-bronşiyal kanal, üretra, mesane ve diğer yerlerdeki mukoza yüzeylerine uygulanır. Bu ilaçların çoğu mukoza içine iyi nüfuz ederler ve uygulama yerlerindeki sinir uçlarını anestezi ederek ağrı ve diğer doku modalitelerinin santral sinir sistemine (SSS) iletilmesini bloke ederler. Normal cilde iyi nüfuz etmezler; fakat yanık, sıyrık ve yara hallerinde cilde nüfuz artar. Bu gibi durumlarda lokal anestezik pomadları, zedelenmiş cilt bölgesinde ağrıyı kaldırmak için uygulanır.

**2.2.2. İnfiltrasyon Anestezi:** Lokal anestezik solüsyonu, ağrı duyusunun kaldırılmak istendiği bölgede ve çevresinde cilt altına infiltre edilir. İnfiltrasyona başlamadan önce, infiltrasyon için kullanılacak iğnenin ciltten geçeceği yerde ince bir iğne ile intradermal olarak lokal anestezik enjekte edilir. Ayrıca cilt altına infiltrasyondan sonra daha derin dokulara da infiltrasyon yapılabilir.

İnfiltrasyon için lokal anestetikler genellikle düşük derişimlerde ve alanın büyüklüğüne göre, fazla hacimde kullanılırlar. Bu yöntem genellikle küçük cerrahi girişimlere hastayı hazırlamak için başvurulur. İnfiltrasyon anesteziinde anestezik solüsyonunu geniş bir alana yaymak amaç olduğundan absorpsiyona bağlı sistemik toksik etkiler sık görülebilir. Bunu önlemek için diğer lokal anestezi şekillerinde de olduğu gibi, lokal anestezik solüsyonu etkili en düşük derişimlerde ve yeterli minimum hacimde uygulanmalıdır.

**2.2.3. Sinir Bloku (bölgesel blok):** Cerrahi girişim yapılacak bölgeyi innerve eden sinir gövdesinin yanına, lokal anestezik ilacı ufak hacim için de yüksek derişimde enjekte etmek suretiyle yapılır. Böylece, ilaç uygulanan noktada sinir gövdesi içindeki liflerde iletim bloke edilir. Sinir blokunda, infiltrasyondan farklı olarak, lokal anestezik enjekte edilen nokta, cerrahi girişim yapılacak noktadan az veya çok uzaktır.

**2.2.4. Spinal (intratekal) Anestezi:** Bölgesel bloğun özel bir türüdür. Bu yöntemde lokal anestezik solüsyonu, omuriliğin alt ucunun altında kalan bölgede subaraknoid aralığa yani serebrospinal sıvı içine enjekte edilir. Spinal anestezi sırasında lokal anesteziğin belirli bir bölgede kalması, solüsyonun yoğunluğunu ve hastanın pozisyonunu ayarlamak suretiyle büyük ölçüde sağlanabilir. Spinal anestezi için genellikle yoğunluğu serebrospinal sıvınınkinden yüksek solüsyonlar kullanılır.

### 2.3. Hastaya Uygun Anestezi Seçimi

Preoperatif dönemde anestezi uzmanları güvenli ve yeterli anesteziyi sağlayacak ilaçları hem yapılacak olan cerrahi girişime hem de hastanın psikolojik ve farmakolojik durumuna göre belirlerler. Ayrıca karaciğer ve böbrekler, anesteziklerin vücutta uzun dönemde dağılımlarını ve atımlarını belirledikleri gibi, aynı zamanda toksik etkiler için hedef organlar da olduklarından, bu organların fizyolojik durumları da mutlaka anestezi uzmanları tarafından gözden geçirilmelidir <sup>8</sup>.

### 2.4. Kanın Yapısı ve Özellikleri

Özgül ağırlığı 1.055-1.065 olan kan, sulu ortamda hareket halindeki özelleşmiş hücrelerden oluşan kompleks bir dokudur. Vizkozitesi sudan yaklaşık 5-6 kat fazladır. Hacim olarak yetişkin vücut ağırlığının %8' ini oluşturan kanın miktarı 5-6 litredir. Çocuklarda yetişkinlere göre kan/vücut ağırlığı daha fazladır <sup>9</sup>.

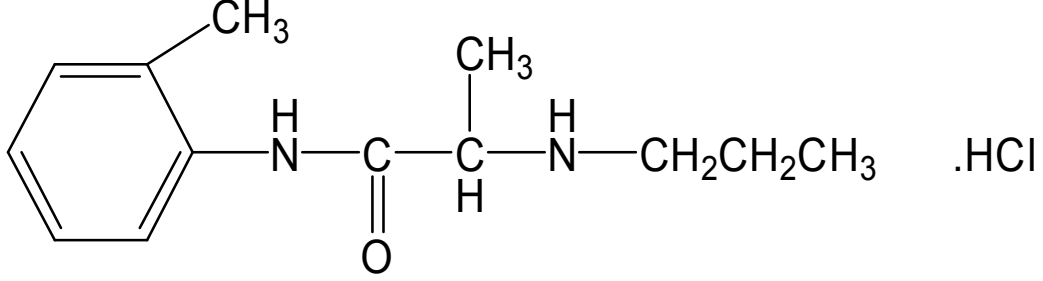
**Serum:** Antikoagülan eklenmeden kanın bekletilmesi sonucu hücresel elemanlar koagüle olmakta ve üstte sarı berrak kısım olan serum kalmaktadır.

**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 stoplazmasındaki derişimlerinden farklıdır.

**Kanın Görevleri:** Kanın görevleri O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 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>9</sup>.

## 2.5. Prilocaine HCl



Şekil 2.1: Prilocaine HCl'nin kimyasal yapısı

### 2.5.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Prilocaine HCl amid yapılı lokal anesteziklerden birisi olup kapalı formülü  $C_{13}H_{20}N_2O.HCl$  şeklindedir<sup>10</sup>.

- Metanol ve suda çözünür
- Molekül ağırlığı:  $256.77 \text{ g mol}^{-1}$
- Erime noktası:  $166-169 \text{ } ^\circ\text{C}$

### 2.6. Prilocaine HCl ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Ohshima ve ark.<sup>3</sup>; katı faz ekstraksiyonu ile ester yapısındaki lokal anesteziklerin insan plazması ve idrarda aynı anda belirlenmesi için GC-MS sistemini kullanmışlardır. Analizde, DB-1 (0,53 mm x 15 m x 1.5  $\mu\text{m}$ ) kolon kullanılmış. Kolon sıcaklığı dakikada  $16 \text{ } ^\circ\text{C}$  artacak şekilde  $140 \text{ } ^\circ\text{C}$ ' den  $300 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'e çıkarılıp  $300 \text{ } ^\circ\text{C}$ ' de 10 dakika tutulmuş. Mobil faz olarak  $15 \text{ ml dak}^{-1}$  akış hızında helyum kullanılmış.

Klein ve ark.<sup>5</sup>; domuz plazmasında prilocaine HCl, lidocaine ve o-toluidine HPLC-UV yöntemiyle miktar analizini gerçekleştirmişler. Yöntem, 210 nm dalga boyu, oda sıcaklığı, 5  $\mu\text{m}$  octyl 1B kolon, akış hızı  $1 \text{ ml dak}^{-1}$  ve mobil faz olarak %50' lik fosforik asitle pH' ı 5.8' e ayarlanmış asetonitril-0,05 M sodyum fosfat tamponu (27:73 , v/v)



mobil faz şartlarında gerçekleştirilmiş. Domuzdan alınan kan örneklerine sıvı-sıvı ekstraksiyon uygulanarak prilocaine HCl, lidocaine ve o-toluidine ekstrakte edildikten sonra HPLC ile analizleri gerçekleştirilmiş. Prilocaine için kalibrasyon eğrisi 20-1000 ng ml<sup>-1</sup> arasında doğrusal olup  $r^2 = 0,978$  olarak belirlenmiş.

Koehler ve ark.<sup>11</sup>; insan serumunda prilocaine, mepivacaine, bupivacaine, ropivacaine belirlenmesi için LC-MS-MS sistemine uygulamışlar. LC sisteminde romatografik ayrımlar 4 mm x 2 mm ön kolon ile birlikte 150 mm x 2 mm sinerji 4 µ polar RP-80 A üzerinde yapılmıştır. Gradient elüsyon ile yapılan ayırımında akış oranı 0,5 ml dak<sup>-1</sup> olarak belirlenirken oda sıcaklığında çalışılmıştır. Mass spektrometresinde yapılan scan taramasında *m/z* oranı 80-300 olan iyonlar seçilerek yapılmış olup prilocaine için *m/z* 86, mepivacaine için *m/z* 98.1, bupivacaine için 140.2, ropivacaine için 126.2 temel pik olarak gözlenmiştir. 0,4 ml serum 0,8 ml asetonitril ile seyreltilip 10 dakika santrifüjlenmiş. Sıvı fazın 0.8 ml' si 1.2 ml mobil faz ile seyreltilip 10 µl LC-MS-MS sistemine enjekte edilmiştir.

Storms ve ark.<sup>12</sup>; Prilocaine ve procaine ilaç kombinasyonlarının belirlenmesi için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Analizde, 1 ml dak<sup>-1</sup> akış hızı fenil kolon, hareketli faz olarak da fosfat tamponu ile pH 3' e ayarlanmış heptanosülfonik asit sodyum tuzu-asetonitril (80:20 v/v) ve 254 nm dalga boyunda çalışmışlardır. Prilocaine için 8-200 µg ml<sup>-1</sup> derişim aralığında çalışmışlar ve gün içi, günler arası tekrarlanabilirlik RSD değeri verilmiş, bu değer % 3.23' den düşük bulunmuş.

Watanabe ve ark.<sup>13</sup>; GC-MS ve katı faz mikro ekstraksiyon kullanarak insan kanında lokal anestetikleri analiz etmişlerdir. Analizde, I.D. (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm) silika kapiler kolon kullanılmış. Kolon sıcaklığı 100 °C' de 5 dakika tutulduktan sonra dakikada 20 °C artacak şekilde 280 °C' ye çıkarılmış. Splitless enjeksiyon

kullanılırken taşıyıcı gaz olarak kullanılan helyum dakikada 1.8 ml olarak geçirilmiş. Prilocaine için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değeri RSD % 4.3' den daha küçük bulunmuş olup doğrusal aralık 1-20  $\mu\text{g}^{-1}$  olarak belirlenmiş.

## 2.7. 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 ışınla madde arasındaki etkileşimlerle ilgilenilirdi; ancak bugün için spektroskopinin kapsamı madde ve diğer enerji türleri arasındaki etkileşimleri de içerecek şekilde genişletilmiştir. Elektromanyetik ışın uzayda çok büyük bir hızla hareket eden dalga ve parçacık yapısında bulunan, pek çok yapıya girebilen bir enerji şeklidir.

Elektromanyetik ışının 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 stereokimyasal özelliklerinin bulunması, tanınması ve saflık kontrolü gibi çok geniş bir alanda uygulanmaktadır. Spektroskopik çalışmalarda madde üzerine dalga boyu 110 nm den 3000 nm' ye kadar değişen çeşitli ışınlar gönderilir. Bütün bu dalga boylarını verecek ve hangi dalga boylarının absorplandığını tespit edecek tek bir cihaz yapmak

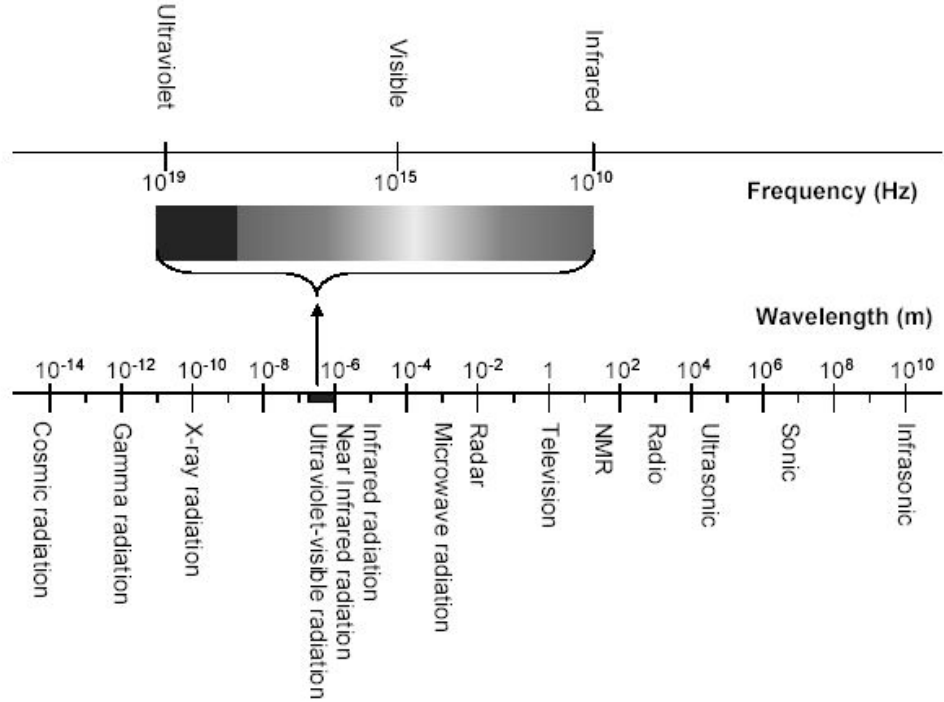
mümkün olmadığından, belirli dalga boyları arasında çalışan cihazlar geliştirilmiştir. 110-1000 nm dalga boylarındaki ışınlarla çalışan cihazlara ultraviyole ve görünür alan, 2500-25000 nm dalga boylarında çalışan cihazlara infrared ve dalga boyları yüzlerce metreye kadar değişen radyo dalgalarıyla çalışan cihazlara da nükleer manyetik rezonans cihazları denir. Bu cihazların geçerli oldukları alan spektroskopilerine de sırasıyla Ultraviyole ve Görünür (UV-Visible), Infrared (IR titreşim) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopileri adı verilir <sup>14, 15</sup>. Analitik amaçlar için önemli spektral bölgelerin dalga boyu ve dalga sayısı aralıklarını gösteren diyagram Şekil 2.1' de verilmiştir.

### **2.7.1. 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.

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>16</sup>.

1. Atomik Absorpsiyon Spektrumları
2. Moleküler Absorpsiyon Spektrumları



Şekil 2.1: Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması

### 2.7.1.1. 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.

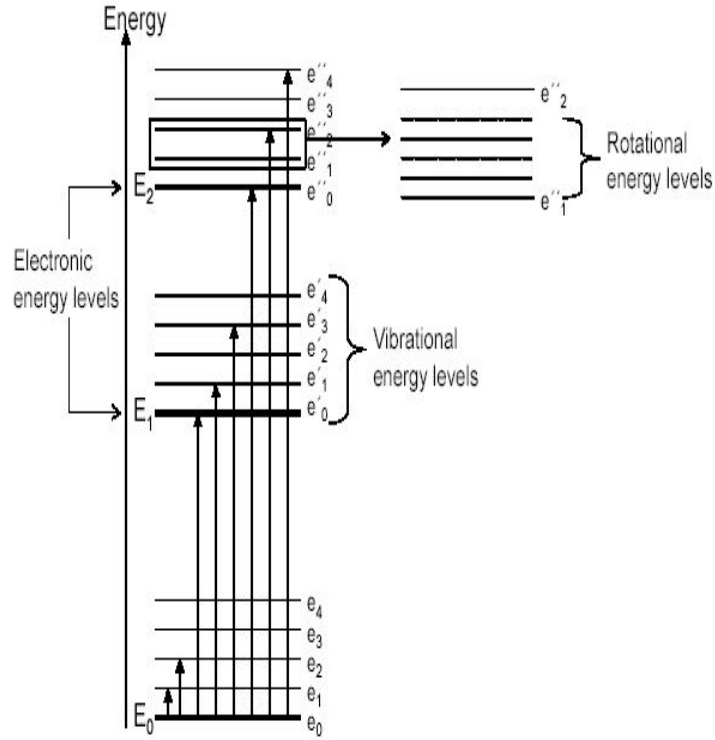
Atomların en dış tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına atomik absorpsiyon, en iç tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına da X-ışınları spektroskopisi denir.

### 2.7.1.2. 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>15,16</sup>. Titreşim ve dönme geçişleri çok atomlu moleküller için geçerlidir (Şekil 2.3).

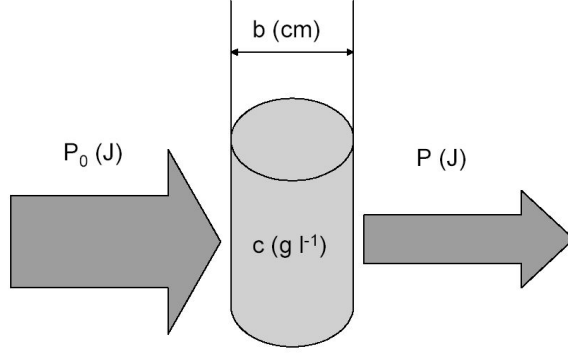


Şekil 2.3: Bir molekül için elektronik, titreşimsel, rotasyonel enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı

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 polikromatik bir ışın demeti geçirildiğinde, demette bulunan bazı ışınlar madde tarafından absorplanır ve ışın demeti çözeltiden şiddetinden bir miktar kaybederek çıkar<sup>15,16</sup> (Şekil 2.4) .



Şekil 2.4: 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>14-16</sup>.

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

Şeklinde gösterilir.

Geçirgenliğin eksi logaritması absorpsiyon (A) olarak adlandırılır ve absorpsiyon

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

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

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

Bir çözeltilinin absorpsiyonu, 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  $\epsilon$  *molar absorpsiyon* ya da *molar absorptivite* olarak adlandırılır.

Lambert Beer Kanunu aşağıdaki denklem ile de ifade edilebilir <sup>14-16</sup>.

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

### 2.7.2. 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 absorpsiyon kabiliyeti çok değişir. Bu da derişimle absorpsiyon arasındaki lineer bağıntının bozulmasına neden olur. Absorpsiyon yapan maddenin derişimi düşük olabilir fakat yanında bulunan maddelerin derişimi yüksek olursa yine sapma gözlemlenebilir. Kanundan sapmalar ortamda yüklü tanecikler bulunduğu zaman daha da büyük olur. Sapmalar <sup>14,15</sup>;

1- Cihazdan gelen sapmalar

2- Kimyasal maddelerden gelen sapmalar

3- Analizci hatasından gelen sapmalar

şeklinde üçe ayrılabilir.



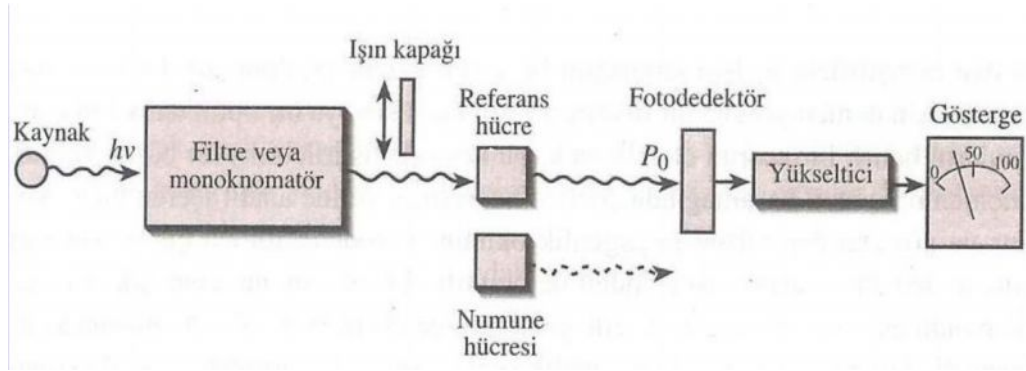
### 2.7.3. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri

Spektrofotometre, elektromanyetik ışının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak numunenin absorbans ya da geçirgenliğini ölçmek için kullanılan bir cihazdır. Ultraviyole-Görünür Bölge spektrofotometreleri, 110 nm' den 1000 nm arasında değişen dalga boylarında çalışırlar. Ancak 110 nm ile 200 nm dalga boyu aralığında çalışan cihazlar vakum tertibatlı ve oldukça pahalı cihazlardır. Bundan dolayı laboratuvarlarda kullanılan spektrofotometri cihazları 200 nm ile 800 nm dalga boyu aralığında çalışmaktadırlar. Spektrofotometrelerde elektromanyetik ışın kaynağı olarak döteryum ve tungsten olmak üzere iki lamba kullanılmaktadır. 160-375 nm aralığında ışın üretmek için döteryum lambası, 350-2500 nm arasında ışın üretmek için tungsten lambası kullanılmaktadır<sup>14-16</sup>. Ultraviyole-Görünür Bölge spektrofotometreleri yapılarına göre iki kısma ayrılır;

- 1- Tek ışınlı spektrofotometreler
- 2- Çift ışınlı spektrofotometreler

#### 2.7.3.1. Tek Işınlı Spektrofotometreler

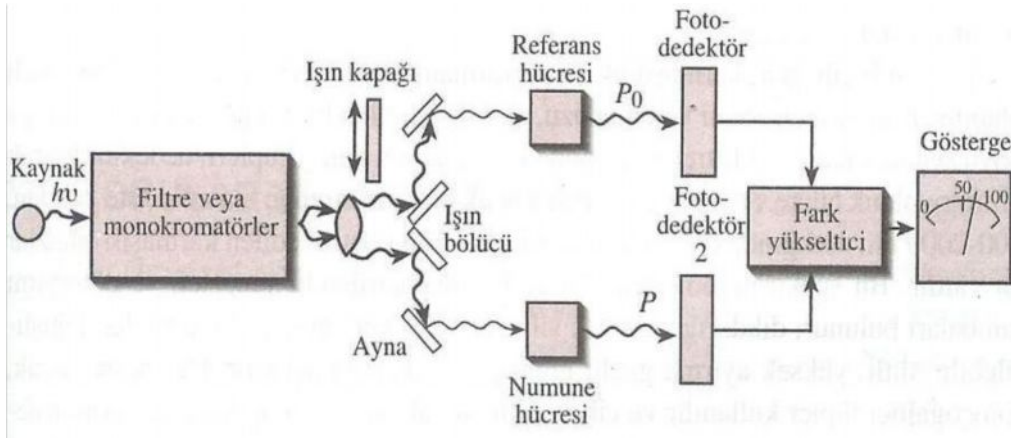
Absorbsiyon ve % geçirgenlik ölçümlerinde kullanılan basit, ucuz ve bakım kolaylığı olan bir cihazdır. Tek ışınlı spektrofotometreler aşağıda gösterildiği gibi ışın kaynağı, dalga boyu seçici, filtre veya monokramatör, ışın yoluna konacak eşlenik iki hücre, dedektör, yükseltici ve bir gösterge aletinden oluşur. Absorbsiyon ve % geçirgenlik okumak için önce numune bölmesine referans madde konularak alet ve referans hücreye göre cihaz sıfırlanır. Daha sonra numune hücresi konur ve ölçüm yapılır<sup>15</sup>. ( Şekil 2.5)



Şekil 2. 4: Tek ışınli spektrofotometre cihazının şematik gösterimi

### 2.7.3.2. Çift Işınli Spektrofotometreler

Modern spektrofotometrelerin pek çoğu çift ışınli tasarıma sahiptir. Bu cihazlar tek ışınli cihazlara göre hem optik hem de elektronik yönden daha karmaşıktırlar. Çift ışınli spektrofotometreler 190-800 nm aralığında çalışmak üzere tasarlanmışlardır. Cihaz sıra ile devreye giren tungsten ve döteryum lambaları, yansıtmalı grating monokromatörü ve bir fotoçoğaltıcı dedektörü ile donatılmıştır. Bu cihazlardaki ışın bölücü, motorla dönen, üç bölmeli bir diskdir ve “çöpri” adını alır. Çöpriin üç bölmelerinden biri saydam, ikincisi yansıtıcı, üçüncüsü ise opakdır. Her dönüşte dedektör, üç ayrı sinyal alır. Bu sinyallerin ilki  $P_0$ 'a, ikincisi  $P'$ 'ye, üçüncüsü de karanlık akıma karşılık gelir. Üç sinyal, elektronik olarak işlenerek numunenin geçirgenliğı veya absorbanlı göstergeden okunur. Çift ışınli cihazlar, ışık kaynağındaki bütün dalgalanmaları giderebilme, kaçak ışınları ve saçılan ışınlardan gelen sapmaları minimize etme ve yükselticideki voltaj değışikliklerinden fazla etkilenmeme gibi üstün özelliklere sahiptirler (Şekil 2.6). Günümüz modern optoelektronik teknolojisinin ürünlerinden olan çok kanallı veya diod serili spektrofotometrelerdir. Bu cihazlar, çok kısa zamanda bütün Ultraviyole, Görünür Bölge spektrumunun kaydını mümkün kılar<sup>15</sup>.



Şekil 2.6: Çift ışınlı spektrofotometre cihazının şematik gösterimi

#### 2.7.4. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları

1. Kalitatif Analiz
2. Kantitatif Analiz
3. Molekül Yapısını Aydınlatma

##### 2.7.4.1. Kalitatif Analiz ve Molekül Yapısını Aydınlatma

Bilinmeyen bir madde saflaştırıldıktan sonra UV spektrumu alınır. Bu spektrum, her yönüyle aynı şekilde daha önce alınmış olan spektrumlarla karşılaştırılır. Bilinmeyen maddenin spektrumu daha önceki madde spektrumlarından hangisine uyuyorsa, bilinmeyen madde o maddedir. Bilinmeyen madde, bilim dünyası tarafından bilinmeyen yeni bir madde değil, sadece analizi yapan kişi tarafından bilinmeyen maddedir. Bundan başka maddenin ne olduğu biliniyor fakat saf olup olmadığı bilinmiyorsa, maddenin spektrumu alınır. Spektrumda beklenmedik piklerin görünmesi maddenin saf olmadığını gösterir. Ayrıca, ultraviyole ışınlarla yapılan spektrofotometrik ölçümlerde benzer kromofor grupların kalitatif tayininde de yararlı olur. Çok karmaşık yapıli organik moleküllerin bile, fonksiyonel gruplar dışında kalan kısımları, 180 nm' den daha uzun dalga boylarına karşı geçirendir. Onun için, 200-400 nm aralığında bir veya daha çok pik gözleniyorsa bu, molekülde doymamış grupların veya kükürt, halojen

gibi hetero atomların varlığını gösterir. Çoğu zaman, analitin spektrumu, çok sayıda kromofor grup içeren ve yapısı bilinen başka bir molekülün spektrumu ile karşılaştırılarak, analitteki fonksiyonel grup hakkında bir fikir edinilebilir. Fakat genel bir kural olarak, analitin kesin yapısını anlamak için yeterli ayrıntılı bilgileri, ultraviyole spektrumlarında bulamayız. Bu yüzden, ultraviyole spektrumlarından elde edilen kalitatif veriler, NMR, MS gibi başka fiziksel ve kimyasal verilerle desteklenmeli mümkünse çözünürlük, erime noktası, kaynama noktası gibi bilgilerle birleştirilmelidir.

Kalitatif analiz amaçlı ultraviyole spektrumları genelde analitin seyreltik çözeltileri kullanılarak elde edilir. Fakat uçucu bileşiklerin gaz halindeki spektrumları alınabilirse, daha ayrıntılı ve dolayısıyla daha yararlı spektrumlar ele geçer. Ultraviyole-Görünür Bölge spektroskopisinde kullanılacak çözücünün bu bölgedeki ışınlar için geçirgen olması ve numuneyi, belirgin pikler verebilecek derişimlerde çözmesi gerekir. Ayrıca çözücü ile absorpsiyon yapan tür arasındaki mümkün etkileşmeleri de hesaba katmak gerekir. Örneğin, su, alkol, ester ve keton gibi polar çözücüler, spektrumdaki titreşim ayrıntılarını örtme etkisi gösterirler. Polar çözücüler, hem spektrumun titreşimlerinden ileri gelen küçük piklerin kaybolmasına, hem de absorpsiyon bandlarının ve dolayısıyla piklerin esas yerlerinden kaymasına neden olurlar <sup>15</sup>.

#### **2.7.4.2. Kantitatif Analiz**

Ultraviyole ve Görünür Bölge absorpsiyon spektroskopisi, kimyacıların kantitatif analizlerde en çok faydalandıkları tekniklerden biridir. Kantitatif analizde, ilk önce analizi yapılacak maddenin en iyi absorbans yaptığı dalga boyu bulunur ve bu dalga boyunda spektrumu alınır. Belirlenen dalga boyu sabit tutularak, artan derişimlerde hazırlanan çözeltilerin absorbansları okunur. Derişime karşı absorbans grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Sonra bilinmeyen maddenin derişimi

kalibrasyon eğrisi yardımıyla bulunur ve ayrıca seçilen dalga boyu sabit tutularak absorbtivite katsayısı da belirlenmeye çalışılır.

## **2.8. Türev Spektrofotometrisi Yöntemi**

Türev spektrofotometresi, türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir. UV-Görünür Bölge çalışmalarından çok daha geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Bunun nedeni UV-Görünür Bölge spektrumlarında üst üste binen, çakışan bantlar daha çok görünür ve ayırım gücü zayıftır. Bunun yanında sinyal /gürültü (S/G) oranı da düşüktür. Türev uygulamaları bu sorunlara belli oranlarda çözüm getirmiş ve karakteristik pikleri az olan ve çözülmemiş bantları içeren spektrumların ayırım gücünü artırmıştır.

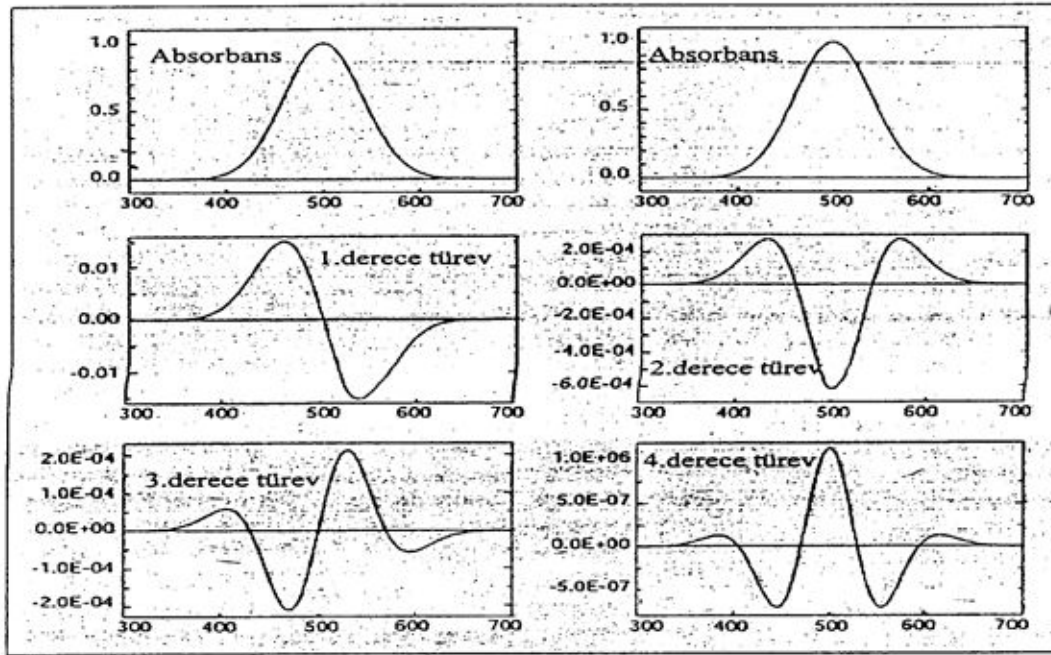
Türev tekniği orijinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi vererek bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böylece bir bileşik daha kolay ve daha kesin olarak tanımlanabilir. Orijinal spektrumlarda üst üste binen çakışan bantlar varsa, bu spektrumların bantları alınarak bantların belli oranda birbirinden ayrılması sağlanır. Bu yöntemle karışımların analizleri de yapılabilmektedir. Spektrofotometrede bulanık çözeltiler ile çalışırken çökme hızı tanecik büyüklüğü gibi etkenlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılırken türev alınarak bulanıklığın oluşturduğu bu etki ortadan kaldırılabilir.

Yöntemin dezavantajı ise, yüksek türev derecelerinde S/G oranının bozulması, pik şekillerinde bozulma ve dönüm noktası kaymasıdır. Bu nedenle uygulanacak türevin derecesi iyi seçilmelidir <sup>17</sup>.

### 2.8.1. Teorik Temelleri

UV spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Orijinal spektrum veya sıfırıncı derece spektrum  $A=f(\lambda)$  fonksiyonudur. Bir fonksiyonu gösteren eğrinin herhangi bir noktasındaki teğetinim eğimi, fonksiyonun bu noktadaki türevidir. Bu fonksiyonun her noktasındaki türevi  $(dA/d\lambda)$  hesaplanabilir. Eğer bu türev değerleri grafiğe geçirilecek olursa "türev spektrumu" elde edilir. 1' den n' e kadar derecede olabilir.

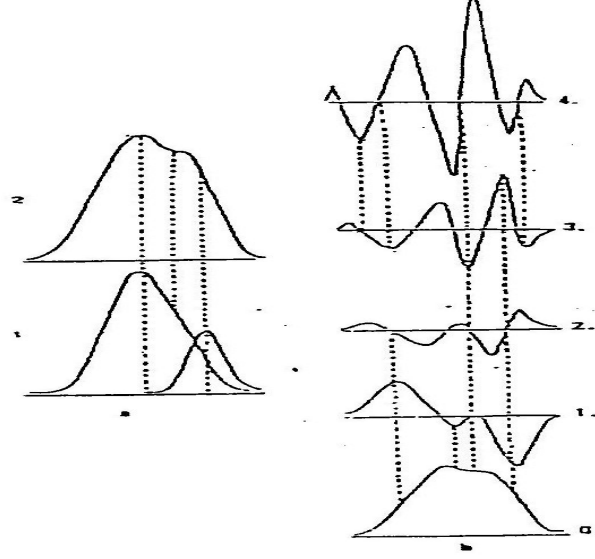
Şekil 2.7' de görüldüğü gibi bir çan eğrisinin 1. derece türev eğrisi orijinal spektrumdaki eğrinin teğetlerinin eğimini göstermektedir. Böylece türevlendirme ile spektrum daha ayrıntılı ve net bir görünüm kazanır<sup>17</sup>.



Şekil 2.7: Absorbans ve Türev Spektrumları

Türev almanın bir diğer avantajı da türev derecesi arttıkça geniş bantların dar bantlara göre daha fazla baskılanmasıdır. Bu özellikten faydalanılarak numune

matriksinden ileri gelen ve bozucu etki gösteren bantlar elimine edilebilir. Bu da ikinci ve dördüncü türevde teşhis ve tayine imkan sağlar (Şekil 2.7).



Şekil 2.8: a-) Gauss eğrisinin 1. tek tek ve 2. karışım halindeki spektrumları, b-) Gauss eğrisinin karışım halindeki 1.- 4.türev eğrileri

Maksimum dalga boyları farklı, eşit olmayan iki Gauss eğrisinin tek tek ve karışım halindeki spektrumları Şekil 2.8.a' da görülmektedir. Maksimum dalga boyları farklı yani merkezleri aynı olmadığından karışım halinde alınan spektrumları bir omuz verir. Bu bantların türevleri alınarak omuzlar düz noktalar haline dönüştürülür (Şekil 2.8.b)

Orijinal Gauss eğrisi tipindeki bir pike karşılık  $n$ . türevde  $n+1$  tane maksimum ve minimuma rastlanmaktadır. Yani birinci derece türev eğrisinde iki, ikinci derece türev eğrisinde üç, üçüncü derece türev eğrisinde ise dört tane maksimum ve minimum nokta görülmektedir. Teorik olarak türev absorbans değerleri ile bileşiğin derişimi arasında aşağıdaki bağıntılar mevcuttur <sup>17</sup>.

$$\begin{array}{l} \text{0. derece türev} \\ A = \epsilon b C \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{1. derece türev} \\ \frac{dA}{d\lambda} = \frac{d\epsilon}{d\lambda} \cdot bC \end{array}$$

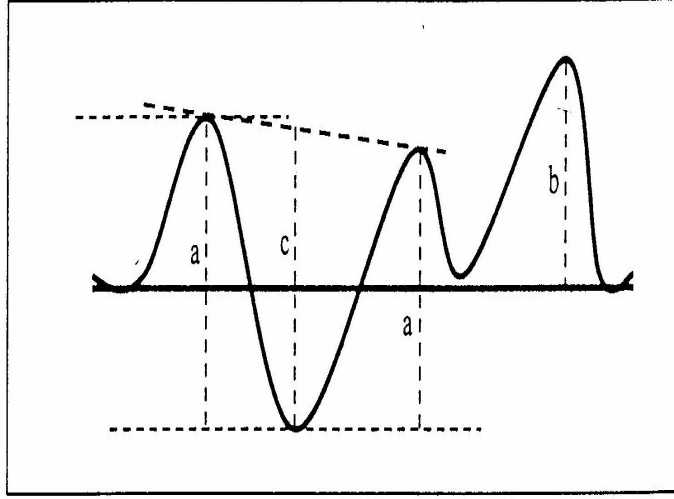
$$\begin{array}{l} \text{n. derece türev} \\ \frac{d^n A}{d\lambda^n} = \frac{d^n \epsilon}{d\lambda^n} \cdot bC \end{array}$$

Özellikle biyokimyasal analizlerde bu işlem saflık kriteri olarak iki dalga boyundaki absorpsiyon oranının oluşması açısından önemli olup tanıma ve saflaştırma işlerinde üstünlük sağlar.

### 2.8.2. Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Absorbansın türevi derişimle doğru orantılıdır. 1. ve 2. derece türev spektrumlarında ordinat değişimleri, orijinal spektrumun ordinat değerinin büyüklüğüyle değil, eğim değişimiyle ilgilidir. Bu nedenle türev eğrisinin apsisteki konumu ile dönüm noktalarının birbirine karşı durumları karakteristiktir. Spektrumlarda yalnızca bitişik, peş peşe gelen uç noktalar (maksimum ve minimum) değerlendirilerek bu iki noktanın mutlak değer olarak farkı ölçülür. Birkaç uç noktası varsa ordinat farkının en yüksek olduğu bir çift seçilir. Türev spektrumlarının değerlendirilmesinde üç yöntem vardır. Bunlar, pikten pike ölçüm, pikten sıfıra ölçüm ve teğet ile ölçümdür<sup>17</sup> (Şekil 2.9).





Şekil 2.9: Türev spektrumlarının değerlendirilmesi a) Piket pike ölçüm, b) Piket sıfıra ölçüm, c) Teğet ile ölçüm

### 2.8.3. Türev Spektroskopisi Yönteminin Uygulamaları

- İlaç analizlerinde
- Aynı spektral bölgede absorpsiyon yapan ilaç karışımlarının tayininde
- Etken maddenin bozunma ürünü varlığında tayininde
- Bozucu etki yapan matriks bileşenlerinin varlığında etken maddenin tayininde uygulanmaktadır.

### 2.9. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, karmaşık karışımlarda bulunan birbirine yakın özellik gösteren bileşenlerin ayrılmasında, tanınmasında ve tayininde yaygın olarak kullanılan birçok farklı yöntemi içeren bir analitik yöntemler topluluğudur<sup>14,18</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. Bu sebeple çok geniş ve verimli bir alana sahiptir.

Kromatografi ilk olarak yirminci yüzyılın başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuş ve onun tarafından isimlendirilmiştir. Tswett bu tekniği, toz kalsiyum karbonat doldurulmuş bir cam kolondan bitki pigmentleri çözeltisini geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmada kullanmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar şeklinde gözüktüğünden, yöntem için kromatografi adını kullanmıştır.

Bütün kromatografik ayırmalarda; numune gaz, sıvı veya süperkritik bir akışkan olan hareketli faz yardımıyla ile sabit bir faz üzerinden taşınır. Taşınma esnasında bileşenlerin farklı göç hızlarına bağlı olarak ayırma işlemi gerçekleşir. Kromatografik ayırmada seçilen sabit faz ile taşıyıcı fazın birbiri ile karışmaması gerekmektedir. 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 ortandan ayrılma yöntemlerine kromatografi denir.

### **2.9.1.Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması**

Kolon kromatografide sabit faz dar bir kolonda tutulur ve hareketli faz basınç altında iken bu sabit faz arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide ise, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz durgun faz arasından kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder. Bunun dışında kromatografik yöntemler ayırma işlemlerinin farklılığına göre çok daha değişik şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalar aşağıdaki şekilde verilebilir.

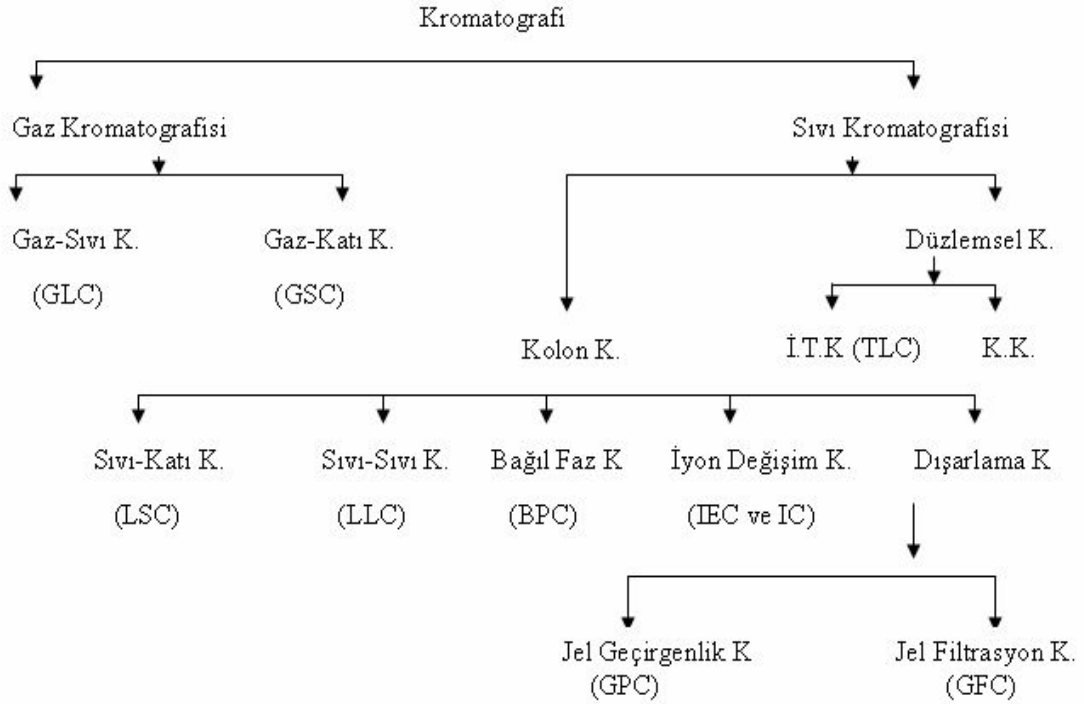
### 1. Teorik Sınıflandırma

- 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



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

Kromatografik yöntemlerde maddelerin ayrılmasında etkin olan dört ayrı mekanizma mevcuttur. Bunlar aşağıda özetlenmiştir<sup>14, 15, 18</sup>.

**2.9.2.1.Dağılma Kromatografisi:** Dört ayrı tip sıvı kromatografi içinde en yaygın kullanılanıdır. Dağılma çözünen maddenin hareketli faz ile katı faz üzerinde adsorplanmış sıvı fazdaki çözünürlüğüne veya hareketli faz gaz ise uçuculuğuna dayanan bir olaydır. Sıvı-Sıvı ve Bağlı-Sıvı faz kromatografi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. Bu teknikler arasındaki fark, destek katısına durgun fazın tutunma farkına dayanır. Sıvı-Sıvı kromatografisinde, sıvı faz sabit bir dolgu maddesinin yüzeyine fiziksel absorpsiyonla tutturulmuştur. Bağlı-Sıvı faz kromatografisinde ise katı destek yüzeye bağlı organik sıvı türler kimyasal olarak tutturulmuştur. Dağılma kromatografisinde hareketli ve sabit fazların bağli polarlıklarına bağli olarak iki kısma ayrılmaktadır. Sabit faz oldukça polar ve hareketli fazda apolar ise buna Normal-Faz kromatografisi, sabit faz apolar (çoğu zaman bir hidrokarbon) hareketli faz ise nispeten polar (su, asetonitril, metanol) ise buna da Ters-Faz kromatografisi denir.

**2.9.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi:** Bir karışımdaki maddelerin katı destek üzerinde farklı kuvvetlerde tutunması prensibine göre birbirlerinden ayrıldıkları kromatografi olarak adlandırılır ve ilk keşfedilen kromatografi çeşididir. Çözücü ve katı sabit fazın polarlıkları bir kolon boyunca veya bir yüzey boyunca çözünen maddenin hareketinin hızını tayin eder.

**2.9.2.3.İyon Değiştirme 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 moleküllü doğal

veya yapma maddelerdir. Bunlarda organik ve inorganik diye ikiye ayrılır. Organik iyon deęiřtiriciler (bunlara rećineler de denir) suda ve birćok organik ćözücüde hić ćözünmeyen, yapılarında sayılamayacak kadar ćok anyon ve katyon taşıyan büyük moleküllu maddelerdir. Bunlar hem anyon, hem katyon deęiřtirmede ve hatta selektif iyon deęiřtirmede kullanılır. İnorganik iyon deęiřtiricilerde en ćok bilineni zeolitlerdir. Bunlar genel olarak;  $\text{Na}_2 \text{Al}_2 \text{Si}_4 \text{O}_{12}$  formülündedir.

İyon değiştirme kromatografisi, ilaçlar ve bunların metabolitleri, serumlar, gıda koruyucu maddeler, vitamin karışımları, şekerler ve farmasötik preparatlar gibi birćok farklı organik ve biyokimyasal sistemlere uygulanabilmektedir.

**2.9.2.4.Boyut-Elleme Kromatografisi:** Jel-Gećirgenlik 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, ćözünen madde ve ćözücü 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.

## **2.10.Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)**

### **2.10.1.Gaz Kromatografisi Teorisi**

Gaz kromatografisi de, öteki kromatografi dalları gibi bir karışımda bulunan maddeleri ayırmaya yarar. Bu kromatografi dalında da sabit ve hareketli olmak üzere iki faz mevcuttur. Bu teknikte He, N<sub>2</sub>, Ne ve Ar gibi inert gazlar taşıyıcı gaz olarak kullanılır. Bundan dolayı, öteki kromatografi dallarında olanın aksine bu kromatografi dalında ayrılmaları istenen maddelerle sabit faz arasında hiçbir etkileşme olmaz. Hareketli fazın görevi sadece maddeleri taşımaktır. Bu bilgiler ışığında gaz kromatografisini tanımlayacak olursak, uçucu olan veya uçucu hale getirilebilen maddelerin belirli bir sıcaklıkta, bir taşıyıcı gaz yardımıyla, sabit bir faz içinde ayrılmaları esasına dayanan kromatografik bir yöntemdir. Maddelerin ayrılmasında gaz kromatografisini uygulayabilmek için maddelerin gaz ya da kolaylıkla gazlaştırılabilmesi gerekmektedir<sup>14, 15, 19, 20</sup>.

Sabit faz bir katı veya bir katı yüzeyine adsorplanmış (katıya emdirilmiş) bir sıvı olabilir. Buna göre gaz kromatografisi ikiye ayrılır.

1. Sabit fazlı katı olan gaz-katı kromatografisi (GSC)
2. Sabit fazlı sıvı olan gaz-sıvı kromatografisi (GLC)

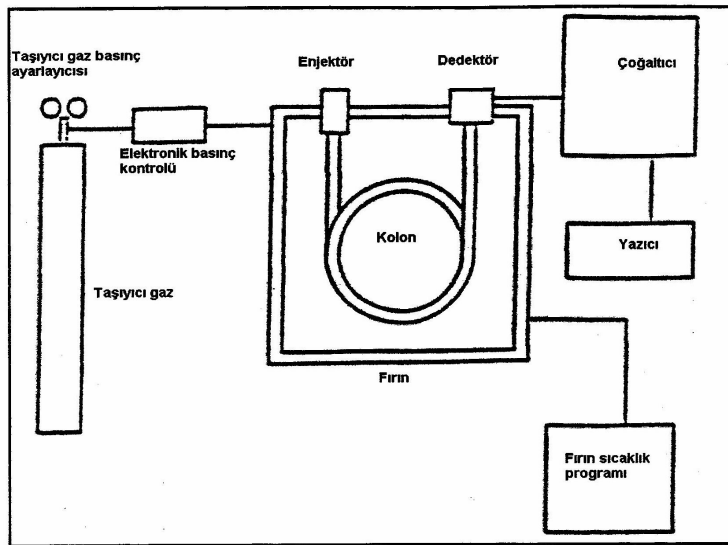
Gaz-sıvı kromatografisi, gözenekli inert bir yüzeye sıvı polimer veya siloksan bileşiğinin emdirilerek geniş yüzey alanı oluşturması ile meydana getirilen sıvı sabit faz ve hareketli fazı gaz olan, temeli dağılım dengesine dayanan bir kromatografi türüdür. Gaz-katı kromatografisinde ise, maddeler katı faz üzerinde ve belirli sıcaklıklarda adsorpsiyon-desorpsiyon esasına dayanarak ayrılırlar. Bu yöntemle elde edilen pikler genelde kuyrukludur. Kuyruklu piklerin genelde birbirlerinden ayrılması oldukça güçtür.

Bundan dolayı gaz-katı kromatografisi genellikle çok az kullanılır. Kullanılması da daha çok küçük moleküllü maddelerin ayrılmasında olur. Gaz-sıvı kromatografisi daha çok kullanılır. Bu kromatografi tekniğinde 0.3-0.5 mm çapında kapiler kolonların kullanılması da mümkündür.

### 2.10.2. Gaz Kromatografisi Cihazı

Gaz kromatografisi cihazı genel olarak altı kısımdan meydana gelir. Bunlar şöyledir.

- 1) Taşıyıcı gaz sistemi, silindir kısmı
- 2) Numune enjekte kısmı
- 3) Isıtma kısmı
- 4) Ayırma kolonu
- 5) Dedektör
- 6) Çoğaltıcı ve yazıcıdan oluşmaktadır.

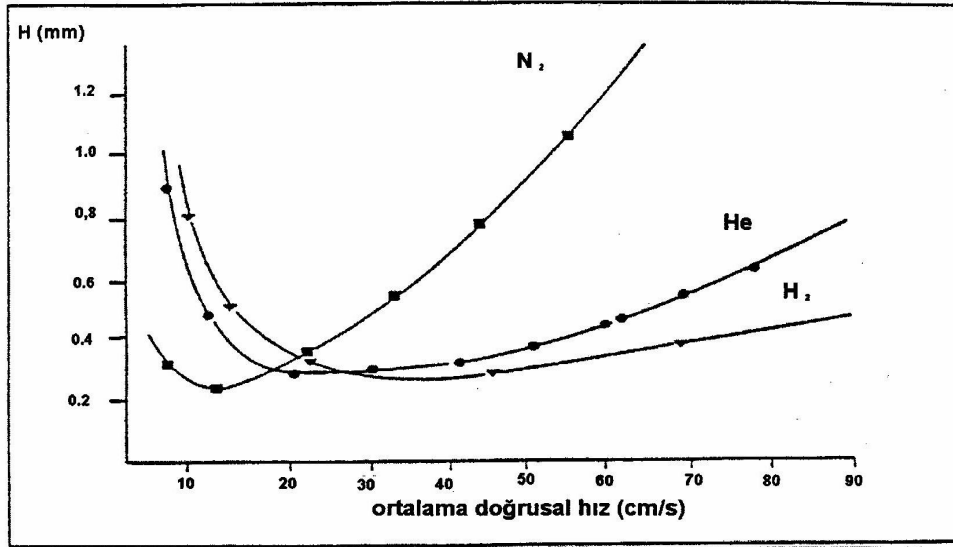


Şekil 2.10: Gaz Kromatografisi Cihazının Bölümleri

### 2.10.2.1. Taşıyıcı Gaz

Kimyaca inert olması gereken gaz, genelde helyum, hidrojen ve azottur. Gaz seçimi, kullanılan dedektör tipine göre yapılır. Taşıyıcı gaz tüpüne bağlı halde, basınç ayarlayıcılar, göstergeler ve akış sayaçları bulunur. Akış hızı kontrolü, normal olarak gaz silindirlerine bağlı iki basamaklı basınç regülatörleriyle yapılır. Taşıyıcı gaz, enjekte edilen bileşenlerin kolonda taşınmasını ve madde ya da maddelerin sabit fazla etkileşimini sağlar. En yüksek verimlilik  $N_2$  gazı (minimum H) kullanılarak elde edilmektedir. Bu minimum değer düşük taşıyıcı gaz doğrusal hızlarında görülmekte ve artan doğrusal hızla orantılı olarak, verimlilik de hızla düşmektedir. Bu nedenle  $N_2$  gazı, kılcal kolonun kullanıldığı GC' de çok sık hareketli faz olarak seçilmez. Diğer taraftan,  $H_2$  gazının daha düşük viskozitesine bağlı olarak, taşıyıcı gaz hızındaki değişiklikler kolon ayırıcılığını belirgin olarak etkilemeyecektir. Hidrojen verimlilik eğrisinin minimumu daha geniş bir aralıkta ve daha yüksek doğrusal hızlarda ortaya çıkabilmektedir. Ancak  $H_2$  gazının patlayıcı özelliği kısıtlayıcı bir etkidir. Bu nedenlerle çalışmalarda  $N_2$  ve  $H_2$ ' nin dezavantajlarını göstermeyen ve verimlilik eğrisinin minimumu  $N_2$ ' ye göre daha geniş aralıkta ve daha yüksek doğrusal hızlarda ortaya çıkan He gazı yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolon verimliliğini etkileyen taşıyıcı gaz; inert olmalı, toksik olmamalı, ucuz olmalı ve kullanılacak dedektöre uygun olmalıdır. Taşıyıcı gazın cinsinin kromatografik ayırım üzerine etkisi Şekil 2.11 de verilmiştir<sup>14,19-22</sup>.





Şekil 2.11: Kullanılan Taşıyıcı Gaz Cinsinin Kromatografik Ayırım Üzerine Etkileri

#### 2.10.2.2. Elektronik Basınç Kontrolü (EPC)

GC' de gaz akışı, performansı pek çok yönden etkileyeceği için, akışın kesin ve belirgin olarak kontrolü gerekmektedir. Diğer taraftan taşıyıcı gaz akışının kontrol altında olması alıkonma zamanlarındaki kararlılık için de gerekli olup miktar tayinlerini de hem pik şekilleri, hem de dedektör cevabı açısından etkileyebilir. Sabit basınçta çalışma, düşük kolon akış hızlarında iyi bir performans sağlayabilir. Ancak, sıcaklık programlı analizlerde kolon akışları değişecektir. Basıncın tekrarlanabilir şekilde ayarlanması mekanik basınç ayarlayıcıları ile zor olmaktadır.

Teknolojideki son gelişmeler, kılcal kolonlu GC için elektronik basınç kontrolü (EPC) sistemlerinin tasarımını sağlamıştır. EPC, basınç ve akış ayarlamalarında mükemmel bir kesinlik ve kararlılık sağlayarak elektronik basınç programlamasına (EPP) izin verir. Bu yolla taşıyıcı gazın akışı, sıcaklık artışı sırasında sabit tutulabilir veya basınç gerek duyulan ayırımları, analiz sürelerini veya çalışma sıcaklıklarını

sağlamak için ek bir yöntem parametresi olarak kullanılabilir. EPC sistemi, kolonların yanı sıra basınç düzenini sağlamak amacıyla dedektörlerde de kullanılmaya başlanmıştır.

Elektronik basınç kontrolü nitel ve nicel analizlerde alıkonma zamanını ve pik alanlarındaki tekrarlanabilirliği sağlar. GC sisteminde fırın sıcaklığının artışı ile birlikte taşıyıcı gazın viskozitesi de artar. Bu esnada eğer giriş basıncı sabit tutulursa sıcaklık programlı bir analizde kolon gaz akışı azalacaktır. Basıncı değiştirerek kolon gaz akışının sabit kalması veya akışı belli bir hızda değiştirerek basıncın sabit kalması sağlanabilir. Apolar kolonlarda sıcaklık artışı ayırımı azaltmaktadır. Ayrıca sabit akış veya basınç programı kullanılarak analiz süresinde kısalma sağlanmaktadır <sup>19-24</sup>.

### **2.10.2.3. Enjeksiyon Bloğu**

Enjeksiyon bölmesinde, kolona gidecek madde miktarı belirlenir. Bu belirleme çeşitli enjeksiyon tipleriyle sağlanır. Enjeksiyon bloğundan numune beş şekilde verilmektedir:

1. Bölmeli (split) enjeksiyon
2. Bölmesiz (splitless) enjeksiyon
3. Kolona enjeksiyon
4. Doğrudan enjeksiyon
5. Sıcaklık programlı buharlaşmalı enjeksiyon.

Bölmeli enjektör sisteminde, ani bir buharlaştırma gerçekleştirilir. Sıvı örnek, enjektörle sıcak enjeksiyon bloğuna girer ve burada hızlıca buharlaşır. Buharlaşan örneğin küçük bir miktarı kolona girerken, büyük miktarı atık olarak uzaklaştırılır.

Bölme oranı, kullanıcı tarafından kolon akışından kontrol edilir. Bölme oranları kolon özellikleri ve kapasitelerine göre ayarlanır.

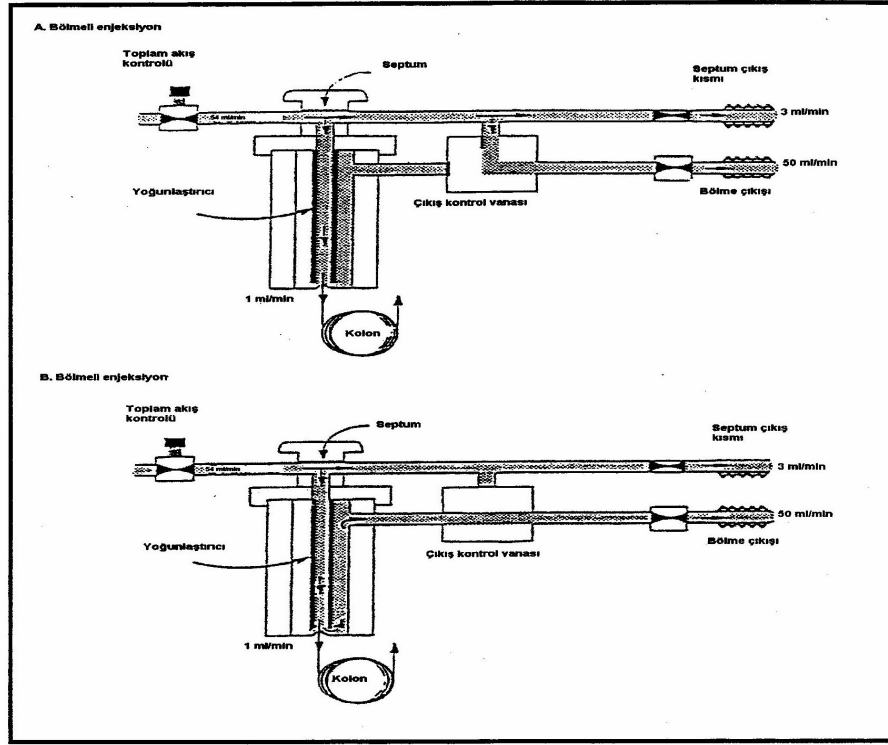
$$\text{Bölme oranı} = \text{Kolon akışı} / \text{Kolon giriş akışı}$$

Bu teknikte dar piklerin oluşma olasılığı yüksektir. Bölmeli enjeksiyon daha çok yüksek derişimlerde uygulanır. Böylece kolonun kirlenmesi önlenmiş olur.

Bölmesiz enjeksiyon sistemi, enjektörün bölme kapakçığının enjeksiyon sırasında kapatılması yoluyla çalışmaktadır. Örnek buharlaşma kısmında buharlaştırılıp hareketli faz akışı ile kolona gönderilmektedir. Bu tip enjeksiyon daha çok eser madde analizlerinde tercih edilmektedir.

Bölmeli ve bölmesiz enjeksiyonlarda akış yolları Şekil 2.12' de gösterilmiştir.

Kolona enjeksiyon, soğuk enjeksiyon tipidir. Numune kolon içine doğrudan sıvı halinde enjekte edilir. Enjeksiyon sırasında enjekte edilen kısım soğuktur. Fırın sıcaklığı arttıkça kolon girişinde bulunan madde yavaş yavaş buharlaşır. Bu tür enjeksiyon bütün kılcal kolonlara uygulanabilir<sup>20, 21</sup>.



Şekil 2.12: Bölmeli ve Bölmesiz Enjeksiyonlarda Akış Yolları

Doğrudan enjeksiyonda, enjektörün girdiği kısım fırından bağımsız olarak ısıtılır ve bu sıcaklık hızlıca buharlaşmaya neden olur. Bu teknik yalnızca çok geniş çaplı kolonlara uygulanabilir.

Sıcaklık programlı buharlaşmalı enjeksiyonda, numune cam yoğunlaştırıcı içine enjekte edilir. Enjektör bloğu soğuktur ve enjektör çekildikten sonra çözücü ve maddeyi uçurmak için hızlıca ısıtılır. Daha çok büyük hacimli enjeksiyonlarda kullanılır.

Enjektörün numuneyi deriştiriciye (lineer) sağlıklı bir şekilde bırakması için enjeksiyon bölmesinin üzerine yerleştirilen, enjektörün girmesini sağlayan ve özel bir maddeden yapılmış tıpayı septum denir. Septum, taşıyıcı gaz kaçağını, sisteme hava ve nem girişini önler. Septumdan sonra numune deriştiriciye (lineer) gelir. Lineer, enjekte edilen numunenin, aerosol oluşturmasını engelleyerek homojen buharlaşmayı ve taşıyıcı

gaz ile karışmasını sağlamaktadır. Lineer içine yerleştirilen, sililenecek deaktive edilmiş cam veya kuartz pamuğu, kolona girerek tıkanmaya sebep olabilecek küçük partiküllerin tutulmasını ve homojenizasyonu sağlamaktadır. Bu yolla pik şekillerinin düzgün eldesi, pik alanı hesaplamalarında ise tekrarlanabilirlik ve doğruluk artmaktadır<sup>25</sup>. Enjeksiyon ve taşıyıcı gazın hızı, elektronik basınç kontrolü (EPC) ile ayarlanmaktadır.

#### **2.10.2.4. Fırın**

GC' de alıkonma zamanının ayarlanması için kullanılan yöntem, fırın sıcaklığının değiştirilmesidir. Sıcaklıktaki 20-30 °C' lik bir artış alıkonma zamanında 2-3 kat azalmaya neden olur. Piyasada bulunan GC fırınlarının en yüksek sıcaklık sınırı 450 °C olduğundan, sıcaklık tek başına alıkonma zamanını 100 kat kadar değiştirebilecek güçtedir.

#### **2.10.2.5. Kolon**

Enjeksiyonla verdiğimiz bileşenlerin birbirinden ayrıldığı, nicel ve nitel analizin yapıldığı bölümdür. Dolgu ve kılcal kolon olmak üzere iki tip GC kolonu bulunmaktadır. Dolgu kolonlar cam veya metalden yapılmış, iç çapları 2-4 mm, uzunlukları 1-5 m olan kolonlardır. Teorik tabaka sayısı kılcal kolonlardan azdır. Kılcal kolonlarda ise dolgu materyali yerine sıvı faz kendisi veya destek maddesi ile birlikte kolon iç çeperlerine bağlanmıştır. İç çapları 0.1-0.5 mm, uzunlukları 10-100 m' dir. Kılcal kolonların çıkmasıyla dolgu kolonların kullanımı azalmıştır<sup>14, 26</sup>.

Eritilmiş silika kılcal kolonların geliştirilmesi ve çok çeşitli materyallerle iç çeperlerinin kaplanabilmesi nedeniyle kılcal kolonların kullanımları hızla artmaktadır.

Bu kolonlar saf SiO<sub>2</sub>' den yapılmış ve dıştan poliimid polimeri ile kaplanarak güçlü hale getirilmişlerdir.

GC kolonlarında 3 önemli özelliğin bulunması gerekmektedir <sup>25</sup>:

1. Sabit faz olabildiğince inert, destek yüzeyini tamamen kaplayan tekdüze kalınlıktaki film tabakası ile oluşturulmalıdır.
2. Kolon film tabakasının yüksek sıcaklıklarda bozunma ve buharlaşmaya karşı ısısız kararlılığı olmalıdır. Bu sabit faz moleküllerini destek materyaline kimyasal veya fiziksel olarak bağlayarak polimere benzeyen bir film tabakası oluşturarak gerçekleştirilir.
3. Geri dönüşümsüz olarak numune bileşenlerinin adsorpsiyonuna neden olan ve metalik elementleri, özgün bileşenlerin bozunması için katalitik kısımlar olarak rol oynayan aktif bölgelerin olmaması gerekmektedir.

Kolonlara yeni doldurulmuş sabit fazın, küçük molekül ağırlığına sahip sıvı faz bölümleri ile çözücülerin fazla kısımlarını tutmamaları için kullanmadan önce şartlanması gerekmektedir. Eğer şartlanma yapılmazsa bu ürünler kolondan geçip dedektöre ulaştıktan sonra temel çizgi (baseline) yükselmesi ve fazla piklere neden olacaktır. Eski kolonların da numune veya saf olmayan taşıyıcı gazdan dolayı kolonda tutulabilecek uçucu olmayan maddelerin birikmesini engellemek için aralıklarla şartlanması gerekmektedir. Şartlama sıcaklığının yüksek olması daha kararlı temel çizgilerin elde edilmesini sağlamakla birlikte kolon ömrünü kısaltacağından sıcaklığın dikkatli seçilmesi gerekmektedir. Ayrıca bu seçimde çalışma sıcaklığı da göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca, kolonlar saklanırken sıvı faza difüze olabilecek oksijen veya diğer kirlilikleri engellemek için uçları uygun bir şekilde kapatılmalıdır .

### 2.10.2.6. Dedektör

GC dedektörleri, taşıyıcı gaz ile sürüklenerek kolon çıkışına gelen numunelerin elektrik sinyaline çevrilip tanınmasına yardımcı olan elektronik sistemlerdir <sup>14, 15</sup>. Her maddeyi analiz eden dedektörlere evrensel dedektörler denir. Seçici dedektörler element seçici veya yapı/fonksiyonel grup seçici olabilirler. Özgün dedektörler ise, o kadar seçicidirler ki, özel yapıları veya elementleri yüksek kesinlikle ayırabilirler.

Dedektörlerin sinyalleri incelemesine ve değerlendirmesine dedektör performansı denir. Performansı belirleyen özellikler ise hassasiyet, seçicilik ve dinamik aralıktır <sup>15,21</sup>. En fazla kullanılan GC dedektörleri; kütle spektrometresi (MS), alev iyonizasyon dedektörü (FID), Azot-Fosfor dedektörü (NPD), elektron yakalama dedektörü (ECD)'dir <sup>14,27</sup>.

Çalıştığımız gaz kromatografisinde hem kütle spektrometresi hem de Azot-Fosfor dedektörü (NPD) dedektör olarak kullanıldığından, her iki dedektörde incelenecektir.

### 2.10.2.7. İdeal bir Dedektörden Beklenen Özellikler

Gaz kromatografisinde kullanılan ideal dedektörler aşağıdaki özelliklerde olmalıdır <sup>14, 15, 27, 28</sup>.

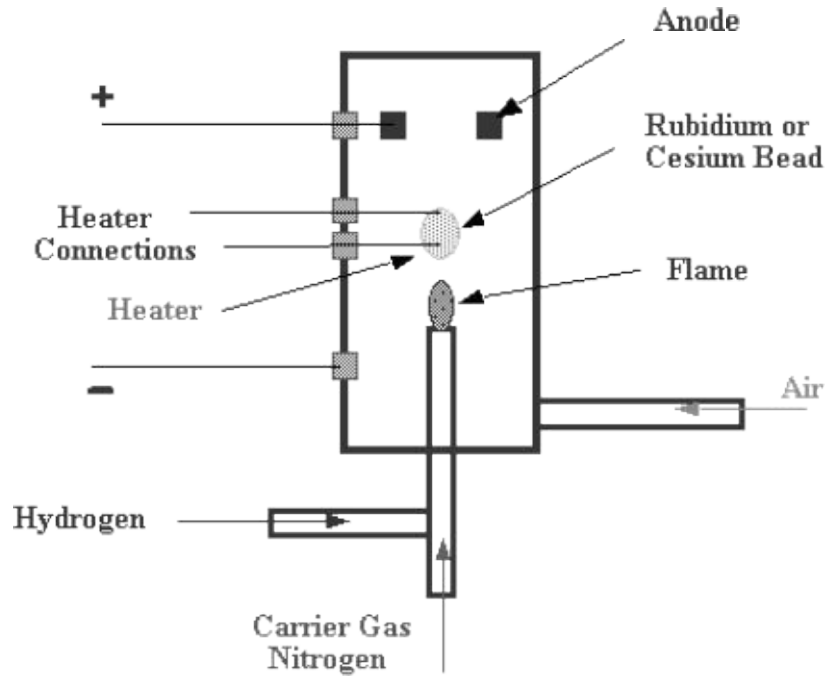
1. İyi bir karalılık ve tekrarlanabilirlik,
2. Geniş bir doğrusal çalışma aralığı,
3. Geniş bir doğrusal çalışma aralığı,
4. 400 °C 'ye kadar varan sıcaklık aralığı,
5. Akış hızından bağımsız küçük cevap zamanı,
6. Yüksek güvenilirlik ve kullanım kolaylığı,

7. Her türden analite benzer cevap alınmalı veya belirli sınıf maddelere karşı tahmini kolay ve seçici cevap verme özelliği olmalı,

8. Numuneyi parçalamamalı.

#### 2.10.2.7.1. Azot –Fosfor Dedektör (NPD)

NPD dedektör doğrudan FID' dan geliştirilmiştir ve yüksek hassasiyete sahiptir. Azot ve fosfor içeren organik bileşiklere güçlü cevaplar verirler. FID ile temelde çok benzer özellikleri var olmasına rağmen kurulumunda farklı özellikler vardır. Azot fosfor dedektör<sup>28</sup> (Şekil 2.13).



Şekil 2.13: NPD dedektörün şematik gösterimi



### 2.10.2.7.2. Kütle Spektrometresi (MS)

Kütle Spektrometresi (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. 1957 yılında Holmes ve Morrel tarafından GC ile birleştirilmiştir. MS' in 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.

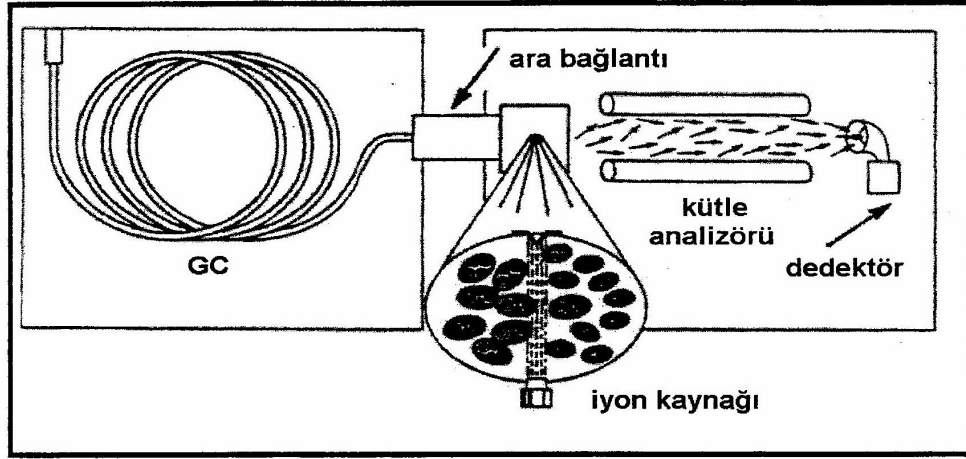
Kütle Spektrometresini temel şekilde açıklarsak; gaz fazındaki numune, yüksek enerjili elektronlarla çarpışarak elektronlarını kaybederek pozitif yüklü çeşitli iyonlar haline dönüşmektedir. Hızlandırılan bu katyonlar manyetik ve/veya elektrik alanında sapıtılmaktadır. İyonların sapması kütlelerine, yüklerine ve hızlarına bağlıdır. Eğer yük, hız ve saptırıcı güç sabit ise, sapma ağır parçacıklarda az hafif parçacıklarda çok olacaktır<sup>29-32</sup>.

Kütle Spektrometresi, evrensel, kütle bağımlı ve yıkıcı (parçalayan) bir dedektördür. MS, tek bir cihaz olarak kullanıldığı gibi, GC ve HPLC' ye bağlı olarak da kullanılmaktadır. Her numune için sinyal verir. Numunenin derişiminden bağımsızdır.

Kütle Spektrometresi şu kısımlardan oluşur (Şekil I2.14) .

1. Ara bağlantı
2. İyon kaynağı
3. Kütle analizörü
4. Dedektör

## 5. Vakum Sistemleri



Şekil 2.14: GC- MS Sisteminin Şematik Gösterilişi

## 2.10.2.7.3. GC-MS Ara Bağlantıları

GC ile MS arasındaki basınç farkından dolayı ara bağlantıya gerek vardır. GC atmosfer basıncında, MS ise çok düşük basınçta ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  torr) çalışmaktadır. MS' deki vakum koşullarının bozulmasını engellemek için GC' den gelen eluattan taşıyıcı gazın uzaklaştırılmasını ve bileşenlerin MS iyon kaynağına iletilmesini sağlamak için ara bağlantı kullanılır.

Kullanılan ara bağlantılar şunlardır:

- a. Effusif ara bağlantı
- b. Jet ayırıcılıklı ara bağlantı
- c. Geçirgen membranlı ara bağlantı
- d. Doğrudan bölmeli ara bağlantı
- e. Açık bölmeli ara bağlantı

f. Doğrudan kılcal kolon bağlantıları: Çalışmalarımızda bu sistem kullanılmıştır.

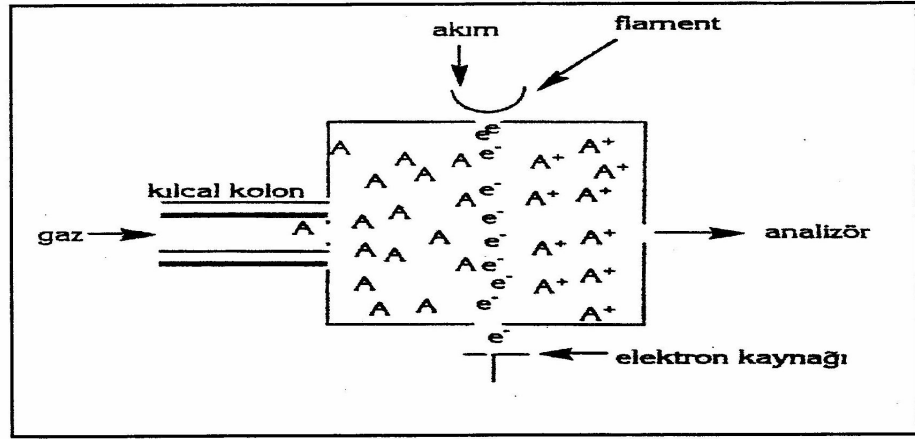
1-3 ml dak<sup>-1</sup> gibi düşük taşıyıcı gaz akış hızları söz konusu olduğunda gerekli basınç düşmesi, MS' in vakum sistemi ile sağlanabilir. Bu nedenle de doğrudan bir ara bağlantı kullanılabilir. Bu durumda hem taşıyıcı gaz hem de numune, taşıyıcı gazın numune moleküllerinden daha büyük hızda pompalandığı kütle spektrometresinin iyon kaynağına girerler. Yüksek taşıyıcı gaz akışlarından dolayı dolgu kolona uygulanmaz.

#### **2.10.2.7.4. 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 ısısız 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. Çalışmamızda elektron iyonizasyon (EI) tekniği kullanılmıştır.

Elektron iyonizasyon (EI): EI kısaca analit molekülünün enerjili elektronlarla bombardıman edildiği iyonizasyon yöntemi olarak tanımlanır (Şekil 2-15). 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 bağıl büyüklükleri, iyonize edici elektronların enerjileri ve iyonizasyonun olduğu sıcaklığa bağlıdır.



Şekil 2.15: Elektron Bombardımanı ile İyonizasyon (EI)

Kimyasal iyonizasyon (CI): Genellikle düz zincirli alkan, alken veya alkoller gibi homolog bileşikler EI ile kararlı moleküler iyonlara sahip pozitif tanımlama yapılamayacak kadar küçük bağıl 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 spektrometresinde (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>20, 30, 32</sup>.

### 2.10.2.7.5.Kütle Analizörü

İyon kaynağından çıkan iyonlaşma ürünleri analizöre yönlendirilir. Analizör, kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre maddelerin ayırımının sağlandığı bölümdür.

Bugün en çok kullanılan kütle analizörleri şunlardır;

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

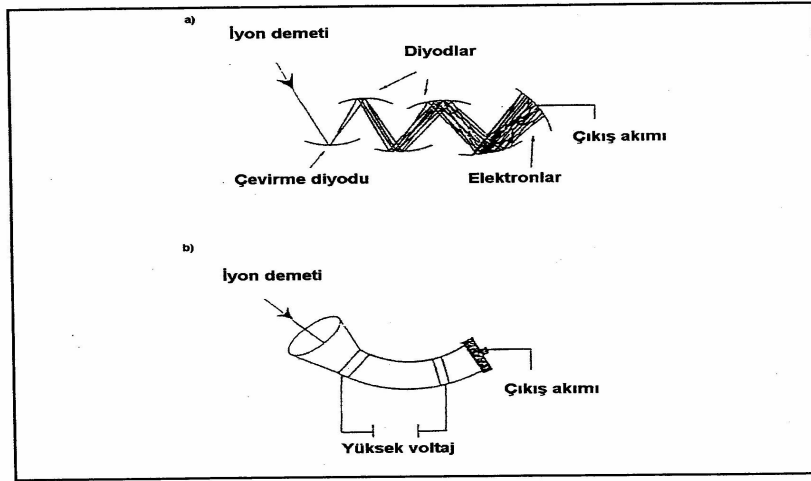
### 2.10.2.7.6. Dedektör

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 (Şekil 2.19: a) ve devamlı dinot elektron çoğaltıcılardır (Şekil 2.19: b). Bunlar sinyali  $10^7$  değerine kadar artırabilirler. Bu da femtoamper 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. GC-MS sistemi, 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>32,33</sup>.

Kütle spektrometresi 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.



Şekil 2.16 a-) Dizi Dinot, b-) Devamlı Dinot Elektron Çoğaltıcı Dedektörlerin Şematik Gösterilişi

#### 2.10.2.7.7. Vakum Sistemleri

MS cihazı  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  torr civarında çalışmaktadır. MS' de vakum sisteminin olmasını gerektiren nedenler şöyle sıralanabilir<sup>32-34</sup>:

1. Flaman yüksek basınçtaki oksijen altında ısıtılırsa yükseltgenip yanabilir.
2. Basınç arttıkça kütledeki çoğaltıcı, kaynak ve analizörde yüksek voltaj kırılmaları olabilir.

3. Kütle spektrometresinin iyon kaynağında bulunan gaz, spektral geri zemine katılabilir (örn; su, azot ve oksijenden gelebilecek m/z:18, 28 ve 32).
4. Kütle spektrometresinde 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.

### **2.11. 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>34, 35</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

Biyoyararlanım çalışmalarında farmakokinetik parametrelerin ve plazma ortamında maddelerin miktarlarının belirlenmesinde uygulanan yöntemlerin geçerlilik testlerinin yapılmış olması gerekmektedir.

#### **2.11.1. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik**

Doğruluk, bir analitik yöntemde sonuçların gerçek değere yakınlığı olarak ifade edilir. Bu da bağıl ve mutlak hata ile verilir. Kesinlik ise, analitik bir işlemde önceden belirlenmiş koşullar altında aynı homojen örnekten birçok örnekleme yapılır ve bu örneklerin her birinden alınan bir seri ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı olarak ifade edilir ve % RSD (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.

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



### **2.11.2. 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.

### **2.11.3. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi**

En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözelti hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralık belirlenme işlemine doğrusallık denir. Bu 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.

### **2.11.4. Duyarlılık**

Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür.

### **2.11.5. 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 10 olduğu derişim olarak belirlenir.

**2.11.6. 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.

**2.11.7. 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.

**2.11.8. Geri Kazanım**

Analiz sonucunda bulunan değerlerin gerçek değere oranı olarak ifade edilir.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

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

Metanol (HPLC grade, MERCK, Almanya)

Prilocaine HCl (Novagenix, Türkiye)

Lidocaine HCl (Hacettepe Üniversitesi, Türkiye Doping Kontrol Merkezi)

Sodyum Hidroksit (MERCK, Almanya)

Dietil Eter

Deiyonize Su

Azot gazı (N<sub>2</sub>) (%99,9 saflıkta BOSS)

Helyum gazı (He)(%99,9 saflıkta BOSS)

Deney tüpü

Vial ve insert

Pastör pipet

Otomatik pipet (5-50 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl ve 5000 µl)

Kuvartz Küvet

#### **3.2. Kullanılan Cihazlar**

NMR Variant 200 Mhz

Etüv (Dedeoğlu, Membert)

Ultrasonik banyo (Transsonic T 890/H,Elma LC 30)

Terazi (Sartorius,Research, Metler Toledo)

Santrifüj (Hettich, RPMX100)

Karıştırıcı (Vorteks, IKA )

**Spektrofotometre Sistemi:**

- UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi (ThermoSpectronic HeLIOS  $\beta$ )
- UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Thermospectronic Vision 32 Software
- Yazıcı (Lexmark)

**GC/MS Sistemi:**

- Gaz kromatografisi (Agilent 6890)
- Kütle spektrometresi (Agilent 5972)
- Yazıcı (HP Laser jet 1200 series)
- Software (Windows NT)

**3.3. Yöntemler****3.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması**

Spektrofotometrik çalışmalarda, 10 mg Prilocaine HCl doğru bir şekilde tartıldıktan sonra 10 ml analitik grade metanolde çözülerek  $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişimde Prilocaine HCl stok çözeltisi ve bu çözeltiden  $1.5-15 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişimlerinde standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Plazma deneylerinde, 0.5 ml boş plazmaya hazırlanan standart çalışma çözeltileri eklendi (spike edildi), karıştırıldı ve daha sonra belirlenen ekstraksiyon prosesi uygulanarak istenilen derişimler ( $2-15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) elde edildi. Hazırlanan stok çözelti  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de, standart çalışma çözeltileri  $+4^{\circ}\text{C}$ ' de buzdolabında saklandı.

**3.3.2. Spektrofotometrik Yöntem Koşulları**

Spektrofotometrik ölçümler 200-300 nm dalga boyu aralığında Thermospectronic çift ışınlı UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi kullanıldı. Çalışma, 1 cm kuvarz küvetlerde,  $600 \text{ nm dak}^{-1}$  dalga boyu tarama hızı ve 2 nm spektral bant genişliği kullanılarak gerçekleştirildi. UV-Görünür Bölge spektrumlar, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edildi.

### 3.3.3.Gaz Kromatografisi-Azot Fosfor Dedeksiyon (GC-NPD) ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Yöntem Koşulları

#### A. Standart Çözeltiler için uygulanan şartlar;

Kolon	: Ultra 2 (%5 fenil metilsilikon)
Kolon Film kalınlığı	: 0,33 $\mu\text{m}$
Kolon Uzunluğu	: 12,5 m
Kolon İç çapı	: 0,2 mm
Taşıyıcı gaz	: Helyum, 0,7 ml dak <sup>-1</sup> (fırın sıcaklığı:180°C)
Enjektör sıcaklığı	: 280 °C
Split oranı ve EPC	: 1:10 ; Sabit basınç
Sıcaklık programı	: 90 °C / 20 °C/ dak / 300 °C / 7 dak
Analiz süresi	: 17.50 dak
Dedektör	: NPD ve MS
Fırın Gazı	: Hidrojen (4 ml dak <sup>-1</sup> ) , Kuru hava (60 ml dak <sup>-1</sup> )
Yardımcı gaz	:Helyum (9 ml dak <sup>-1</sup> )
Dedektör sıcaklığı	: 280 °C
Enjeksiyon hacmi	: 3 $\mu\text{l}$

#### B. Plazma Çalışmalarında uygulanan şartlar;

Kolon	: Ultra 2 (%5 fenil metilsilikon)
Kolon Film kalınlığı	: 0,33 $\mu\text{m}$
Kolon Uzunluğu	: 12,5 m
Kolon İç çapı	: 0,2 mm
Taşıyıcı gaz	: Helyum, 1,6 ml/dak (fırın sıcaklığı:180°C)
Enjektör sıcaklığı	: 280 °C

Split oranı ve EPC	: 1:10 ; Sabit basınç
Sıcaklık programı	: 90 °C / 10 °C/ dak / 200 °C / 7 dak
Analiz süresi	: 18.00 dak
Dedektör	: NPD ve MS
Fırın Gazı	: Hidrojen (4 ml dak <sup>-1</sup> ), Kuru hava (60 ml/dak),
Yardımcı gaz	:Helyum (9 ml dak <sup>-1</sup> )
Dedektör sıcaklığı	: 280 °C
Kayıt tipi	: SIM (m/z: 86)
EI	: 70 EV (İyonizasyon voltajı)
Dedektör sıcaklığı	: 280 °C
Enjeksiyon hacmi	: 3 µl

#### **3.3.4.Prilocaine HCl' nin Plazmadan Ekstraksiyon Prosesi**

- 0,5 ml boş insan plazması santrifüj tüplerine koyuldu ve bu tüplerin herbirine 1 ml 1 M NaOH eklendi.
- 1 dakika vortekslendi
- 5 ml dietil eter eklendi
- 3 dakika vortekslendi
- Santrifüjlendi ( 4000 rpm, 8 dakika)
- Organik faz alındı
- Oda koşullarında azot gazı altında buharlaştırıldı

**GC -NPD ve GC-MS Yöntemi İçin**

- Kalıntı 1 ml metanolde çözüldü
- 30 saniye vortekslendi
- 45 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü
- Pastör pipetle viallere koyuldu
- 3 µl GC' ye enjekte edildi

**UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi için**

- Kalıntı 5 ml metanolde çözüldü
- 30 saniye vortekslendi
- Kuvartz küvetlere koyuldu ve ölçümler alındı

## 4.BULGULAR

### 4.1. Prilocaine HCl'nin Saflık Kontrolü

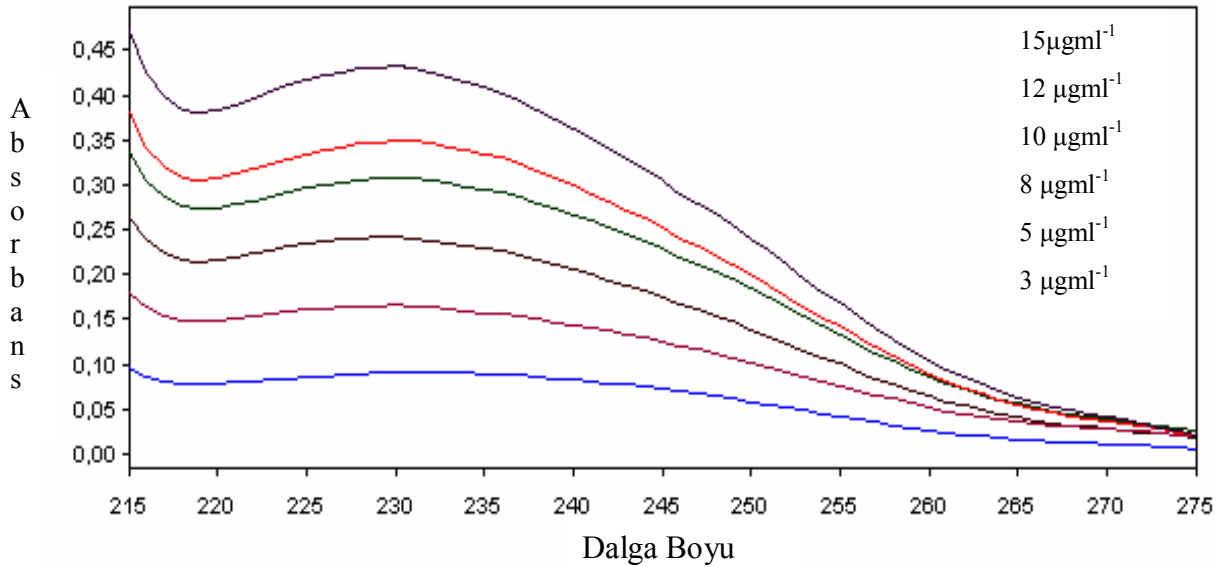
Novagenix' den elde edilen Prilocaine HCl' nin saflık kontrolü  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR 'ları çekilerek saflıkları teyit edildi (Ek 1. Şekil 1 ve 2).

### 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi Yöntemi

#### 4.2.1. İn-Vitro Çalışması

##### 4.2.1.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Prilocaine HCl' nin  $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişimde stok çözeltisi analitik grade metanolde hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli hacimlerde alınıp analitik grade metanol ile seyreltilerek  $3, 5, 8, 10, 12$  ve  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişimlerinde standart çalışma çözeltileri hazırlanarak  $230 \text{ nm}$ ' de UV-Görünür Bölge spektrofotometri absorbansları alındı (Şekil 4.1).



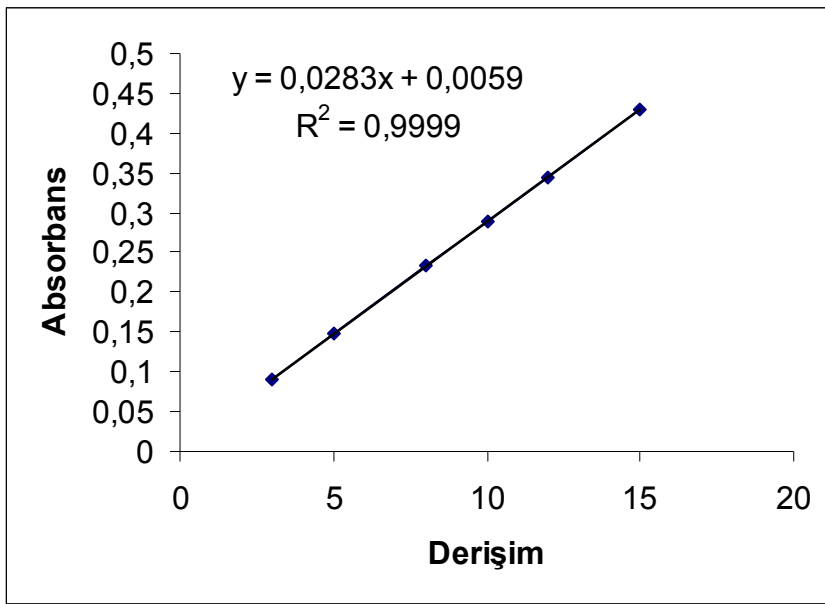
Şekil 4.1:  $3, 5, 8, 10, 12$  ve  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişimlerinde prilocaine HCl çözeltilerinin UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi absorpsiyon spektrumu.



### 4.2.1.3. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

#### 4.2.1.3.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

3-15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişim aralığında hazırlanan bir seri prilocaine HCl çözeltilerine karşı 230 nm dalga boyunda okunan absorbands değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.2' de verildi.



Şekil 4.2: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi yönteminde prilocaine HCl'in kalibrasyon eğrisi

UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi çalışmasında prilocaine HCl için regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1: Prilocaine HCl'ye ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistikî bilgiler

Parametreler	UV-Gör.Böl. Spektrofotometri
Dalga Boyu ( $\lambda$ : nm)	230
Doğrusal Aralık ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	3-15
Regrasyon Doğrusu Denklemi	$A=0,0283x + 0,0059$
$S_a$	$2,4 \times 10^{-3}$
$S_b$	$8,3 \times 10^{-2}$
Korelasyon katsayısı (r)	0,9999

**S<sub>a</sub>: Kaymanın standart sapması, S<sub>b</sub>: Eğimin standart sapması**

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

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ , den daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı. LOD değeri için  $1,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , LOQ değeri için  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  olarak belirlendi.

#### 4.2.1.3.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Gün-içi ve günler-arası deney sonuçları, kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde hazırlanan Prilocaine HCl çözeltileri için bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi. Prilocaine HCl' nin gün içi ve günler arası deney sonuçları Tablo 4.2' de verildi.

Tablo 4.2: Prilocaine HCl'nin gün-içi ve günler-arası kesinlik, doğruluk ve tekrarlanabilirlik değerleri

Eklenen ( $\mu\text{g m}^{-1}$ )	Gün-İçi				Günler-Arası			
	Bulunan değer ( $\mu\text{g m}^{-1}$ )	X	S	%RSD	Bulunan değer ( $\mu\text{g m}^{-1}$ )	X	S	% RSD
5	5,42	5,03	0,25	4,97	4,842	5,006	0,34	6,80
	4,85				5,511			
	4,77				5,315			
	4,86				4,560			
	5,07				4,940			
	5,19				4,869			
8	7,86	7,95	0,36	4,52	7,951	7,875	0,37	4,70
	7,56				8,305			
	8,25				7,777			
	8,33				7,216			
	8,21				7,866			
	7,51				8,138			
10	10,23	10,36	0,59	5,69	9,722	10,318	0,56	5,42
	11,07				10,562			
	10,81				10,425			
	10,59				9,544			
	9,42				10,691			
	10,07				10,969			

X: Ortalama Değer, S : Standart Sapma, RSD: Bağıl Standart Sapma

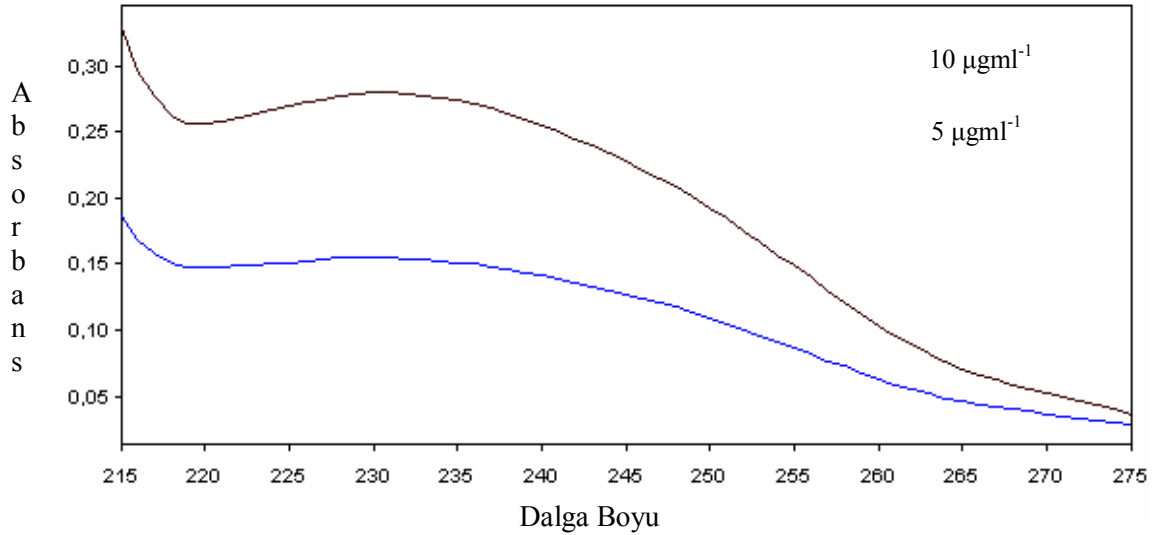
#### 4.2.1.3.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Yöntem prilocaine HCl içeren farmasötik preparatlara uygulandı. Etken maddesi 400 mg prilocaine HCl olan 20 ml citanest flakondan uygun miktarlarda alınarak metanolde  $1000\mu\text{g ml}^{-1}$  derişimde olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra bu stok çözeltilerden 5 ve  $10\mu\text{g ml}^{-1}$  çalışma çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin UV-Görünür Bölge spektrumları alındı ve elde edilen değerler yüzde geri kazanım olarak

belirlendi. UV-Görünür Bölge spektrumları Şekil 4.3' de ve elde edilen yüzde geri kazanım değerleri Tablo 4.3' de verildi.

Tablo 4.3: Farmasötik Preparat Citanest flakondan elde edilen Geri Kazanım Değerleri

Eklenen ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bulunan( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	% Geri Kazanım
5	5,13	102,60
10	10,04	100,40

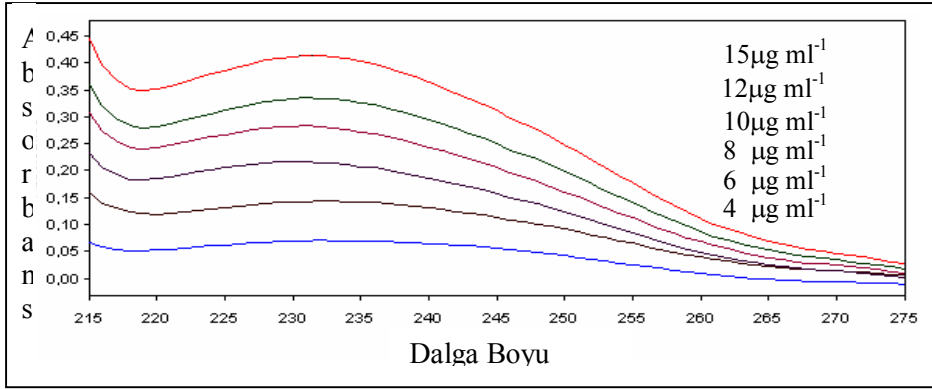


Şekil 4.3: UV-Görünür Bölge spektrofotometrik çalışmalarda prilocaine HCl içeren citanest flakonun 230 nm de  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  ve  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişimlerdeki çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları

#### 4.2.2. Plazma Çalışması

##### 4.2.2.1. Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Erzurum Kızılay kan bankasından temin edilen boş plazmanın 0,5 ml' sine kalibrasyon eğrisini elde edebileceğimiz 4, 6, 8, 10, 12 ve 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişimlerde hazırlanan prilocaine HCl çözeltilerinden uygun miktarlarda eklendi (spike edildi). Bölüm 3.3.4.'de belirtildiği şekilde ekstraksiyon yapıldı ve her bir çözeltilinin absorpsiyon spektrumları alındı ve spektrumlar Şekil 4.4'de verildi.

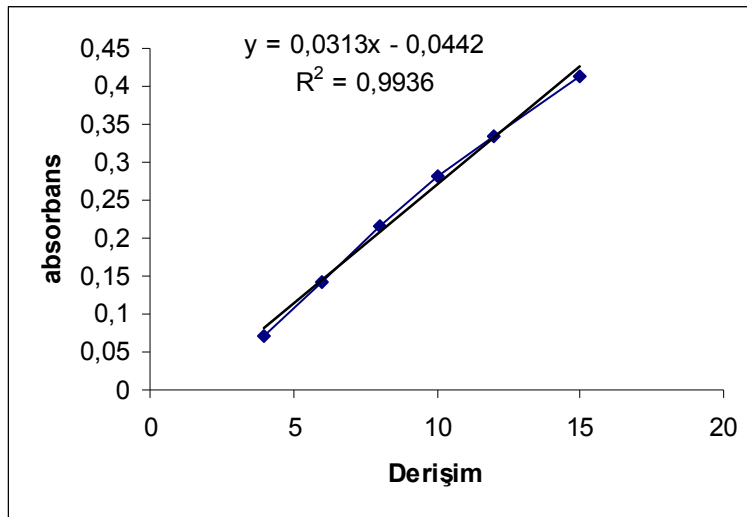


Şekil 4.4: UV-Görünür Bölge spektrofotometrik çalışmalarında prilocaine HCl'nin plazmadan geri kazanımla elde edilen çözeltilerin 230 nm de 4,6,8,10,12,15 µg ml<sup>-1</sup> derişimdeki absorpsiyon spektrumları

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

##### 4.2.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

Prilocaine HCl' nin plazmadan ekstraksiyonu ile elde edilen 4-15 µg ml<sup>-1</sup> derişim aralığında prilocaine HCl'nin derişimine karşılık okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.5'de verildi.



Şekil 4.5: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi yönteminde prilocaine HCl'in plazma kalibrasyon eğrisi

UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi plazma çalışmasında prilocaine HCl için elde edilen regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.4' de verildi.

Tablo 4.4: Plazma çalışmasında prilocaine HCl' ye ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistik bilgileri

Parametreler	UV-Görünür Bölge.
Dalga Boyu ( $\lambda$ : nm)	230
Doğrusal Aralık ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	4-15
Regrasyon Doğrusu Denklemi	$A=0,0313x-0,0442$
$S_a$	$8,3 \times 10^{-4}$
$S_b$	$7,3 \times 10^{-3}$
Korelasyon katsayısı (r)	0,996

Sa: Kaymanın standart sapması, Sb: Eğimin standart sapması

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

Plazma Çalışmasında kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan  $4 \mu\text{g ml}^{-1}$  den daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı. LOD değeri için  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ , LOQ değeri için  $4 \mu\text{g ml}^{-1}$  olarak belirlendi.

#### 4.2.2.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Plazma çalışmasında, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Gün-içi ve günler-arası değişken sonuçları, kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde ( $6, 8$  ve  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) hazırlanan Prilocaine HCl çözeltileri için bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Plazma çalışmasında prilocaine HCl' nin gün-içi ve günler-arası doğruluk, kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerleri

Eklenen ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Gün-İçi				Günler-Arası			
	Bulunan Değer ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	X	S	%RSD	Bulunan Değer ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	X	S	% RSD
6	6,231	6,548	0,45	6,88	6,078	6,018	0,07	1,16
	6,018				6,025			
	7,035				5,918			
	6,666				6,054			
	7,099				5,962			
	6,244				6,073			
8	9,304	9,056	0,34	3,75	8,266	8,246	0,30	3,60
	9,202				8,379			
	9,370				7,952			
	9,237				8,451			
	8,540				8,614			
	8,688				7,814			
10	10,936	10,864	0,33	3,03	10,264	10,555	0,49	4,64
	10,253				11,300			
	10,773				9,795			
	11,020				10,348			
	11,050				10,327			
	11,155				11,301			

X: Ortalama Değer, S : Standart Sapma, RSD: Bağıl Standart Sapma

#### 4.2.2.2.4. Plazmadan Geri Kazanım

Geri kazanım çalışması, belirli derişimlerde prilocaine HCl plazmaya eklenip sonra ekstraksiyonun yapılması sonucunda elde edilen değerler standart prilocaine HCl çözeltileriyle elde edilen değerler ile ilişkilendirilerek yüzde geri kazanım değerleri elde edildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Plazma çalışmasında Prilocaine HCl' ye ait geri kazanım değerleri (n=6)

Eklenen ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bulunan ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Geri Kazanım (%)
8	7,33	91,63
10	9,40	94,00
12	11,27	93,91

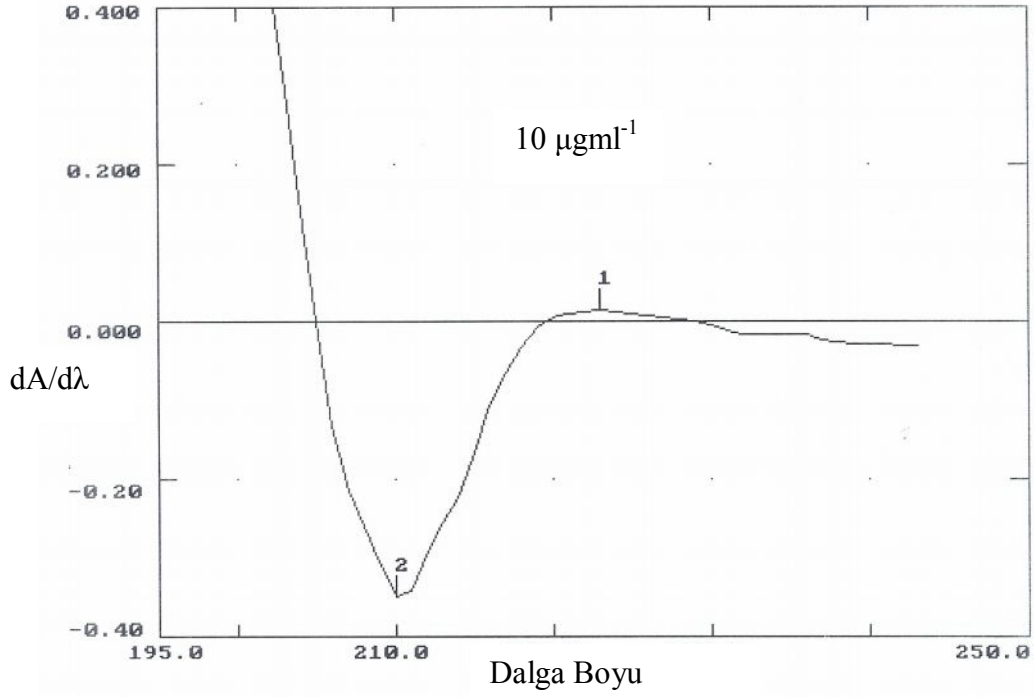
### 4.3. Birinci Derece Türev Spektrofotometrisi Yöntemi

#### 4.3.1. İn-Vitro Çalışması

##### 4.3.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Prilocaine HCl' nin  $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişimde stok çözeltisi analitik grade metanolde hazırlandı. Bu stok çözeltiden belirli hacimlerde alınıp analitik grade metanol ile seyreltilerek 2, 4, 6, 8, 10 ve  $12 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişimlerinde standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Birinci türev spektrumunda bir minimum  $210 \text{ nm}$ ' de, maksimum  $225 \text{ nm}$ 'de olmak üzere iki pik gözlemlendi. Birinci türev spektrumu Şekil 4.6' da verildi.



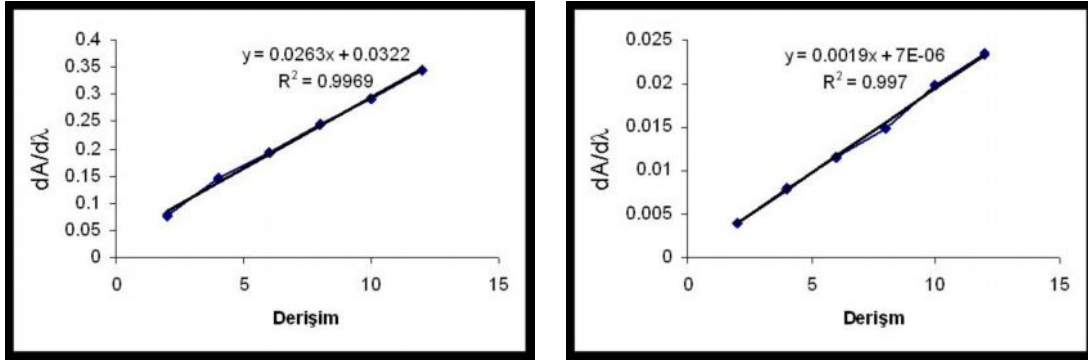


Şekil 4.6:  $10\mu\text{g ml}^{-1}$  derişimindeki Prilocaine HCl çözeltisinin Birinci derece türev spektrofotometrisi spektrumu.

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

##### 4.3.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri

2-12  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişim aralığında hazırlanan bir seri prilocaine HCl çözeltilerinin derişimine karşılık 210 nm ve 225 nm dalga boylarında okunan değerlerin grafiğe geçirilmesiyle iki kalibrasyon eğrisi elde edildi. Elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.7 a ve b'de verildi.



-a-

-b-

Şekil 4.7: Birinci türev spektrofotometresi yönteminde -a- 210 nm , -b- 225 nm dalga boylarında elde edilen kalibrasyon eğrileri

Birinci türev spektrofotometresi çalışmalarında prilocaine HCl için 210 nm minimum ve 225 nm maksimum dalga boylarında elde edilen regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.7' de verildi.

Tablo 4.7: Prilocaine HCl' ye ait 210 ve 225 nm dalga boyundaki kalibrasyon eğrilerinin istatistiki bilgileri

Parametreler	Birinci Türev Spektrofotometre Minimum Pik Değerleri	Birinci Türev Spektrofotometre Maksimum Pik Değerleri
Dalga Boyu ( $\lambda$ : nm)	210	225
Doğrusal Aralık ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	2-12	2-12
Regrasyon Doğrusu Denklemi	$A=0,263x+0,0322$	$A=0,0019x+7E^{-06}$
$S_a$	$8,5 \times 10^{-4}$	$6,5 \times 10^{-3}$
$S_b$	$1,5 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-4}$
Korelasyon katsayısı (r)	0,9984	0,9984

**S<sub>a</sub>**: Kaymanın standart sapması, **S<sub>b</sub>**: Eğimin standart sapması

#### 4.3.1.2.2. Gözlenebilme Alt Sınırı (LOD) ve Tain Alt Sınırı (LOQ)

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  den daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı. Maksimum ve minimum noktalarda LOD değeri  $1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , LOQ değeri  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  olarak belirlendi.

#### 4.3.1.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Gün-içi ve günler-arası çalışma sonuçları, kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde hazırlanan prilocaine HCl çözeltileri için bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi. Prilocaine HCl'nin 210 nm minimum dalga boyu ve 225 nm maksimum dalga boyu gün-içi ve günler-arası doğruluk, kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları sırasıyla Tablo 4.8 ve Tablo 4.9' da verildi.

Tablo 4.8: Birinci türev spektrofotometresi çalışmalarında prilocaine HCl' nin 210 nm minimum dalga boyunda gün-içi ve günler-arası kesinlik, doğruluk ve tekrarlanabilirlik değerleri

Eklenen ( $\mu\text{g m}^{-1}$ )	Gün-İçi				Günler-Arası			
	Bulunan değer ( $\mu\text{g m}^{-1}$ )	X	S	% RSD	Bulunan değer ( $\mu\text{g m}^{-1}$ )	X	S	% RSD
6	5,850	5,833	0,13	2,22	5,971	6,210	0,21	3,38
	5,915				6,454			
	5,772				6,385			
	5,961				6,065			
	5,611				6,003			
	5,893				6,383			
8	8,472	8,239	0,31	3,76	8,122	8,023	0,15	1,87
	7,891				7,922			
	8,564				7,990			
	8,047				7,904			
	8,516				8,288			
	7,946				7,917			
10	9,715	10,155	0,51	5,02	9,804	9,804	0,37	3,77
	10,173				9,422			
	10,873				10,186			
	10,522				9,484			
	10,194				9,610			
	9,454				10,321			

**X: Ortalama Değer, S : Standart Sapma, RSD: Bağıl Standart Sapma**

Tablo 4.9: Birinci türev spektrofotometresi çalışmalarında prilocaine HCl' nin 225 nm dalga maksimum boyunda gün-içi ve günler-arası kesinlik, doğruluk ve tekrarlanabilirlik değerleri

Eklenen ( $\mu\text{g m}^{-1}$ )	Gün-İçi				Günler-Arası			
	Bulunan değer ( $\mu\text{g m}^{-1}$ )	X	S	%RSD	Bulunan değer ( $\mu\text{g m}^{-1}$ )	X	S	% RSD
6	6,042	6,124	0,27	4,41	6,073	6,017	0,065	1,08
	6,514				6,024			
	5,857				5,914			
	6,219				6,051			
	5,813				5,965			
	6,303				6,076			
8	9,011	8,638	0,24	2,78	8,269	8,321	0,37	2,70
	8,581				8,309			
	8,325				8,374			
	8,712				8,347			
	8,444				8,326			
	8,757				8,303			
10	11,146	10,906	0,28	2,56	10,580	10,433	1,12	2,02
	11,028				11,552			
	10,913				8,370			
	10,577				10,408			
	10,555				10,385			
	11,,220				11,307			

X: Ortalama Değer, S : Standart Sapma, RSD: Bağıl Standart Sapma

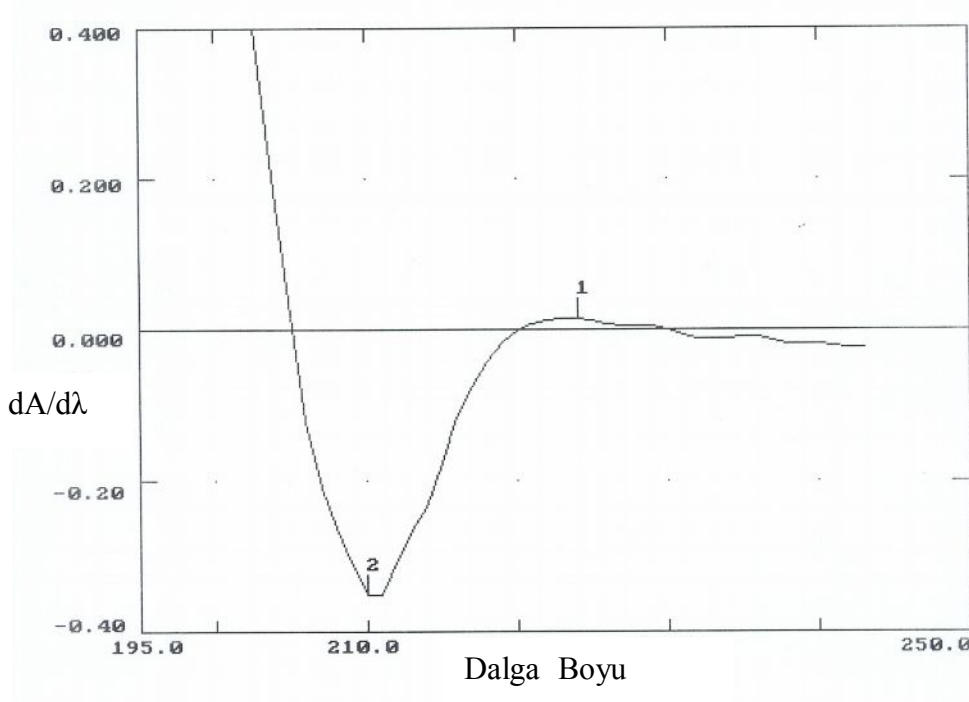
#### 4.3.1.2.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Yöntem prilocaine HCl içeren farmasötik preparatlara uygulandı. Etken maddesi 400 mg prilocaine HCl olan 20 ml citanest flakondan uygun miktarda alınarak metanolde çözülerek  $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişimde stok çözelti ve daha sonra bu stok çözülden 5 ve  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  çalışma çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin birinci derece türev spektrumları alındı ve elde edilen değerler yüzde geri kazanım

olarak belirlendi. Birinci derece türev spektrumları Şekil 4.8’de ve elde edilen yüzde geri kazanım değerleri Tablo 4.10’ da verildi.

Tablo 4.10: Farmasötik Preparat Citanest flakondan elde edilen Geri Kazanım Değerleri

Eklenen ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bulunan( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	% Geri Kazanım
5	5,13	102,6
10	10,04	100,4



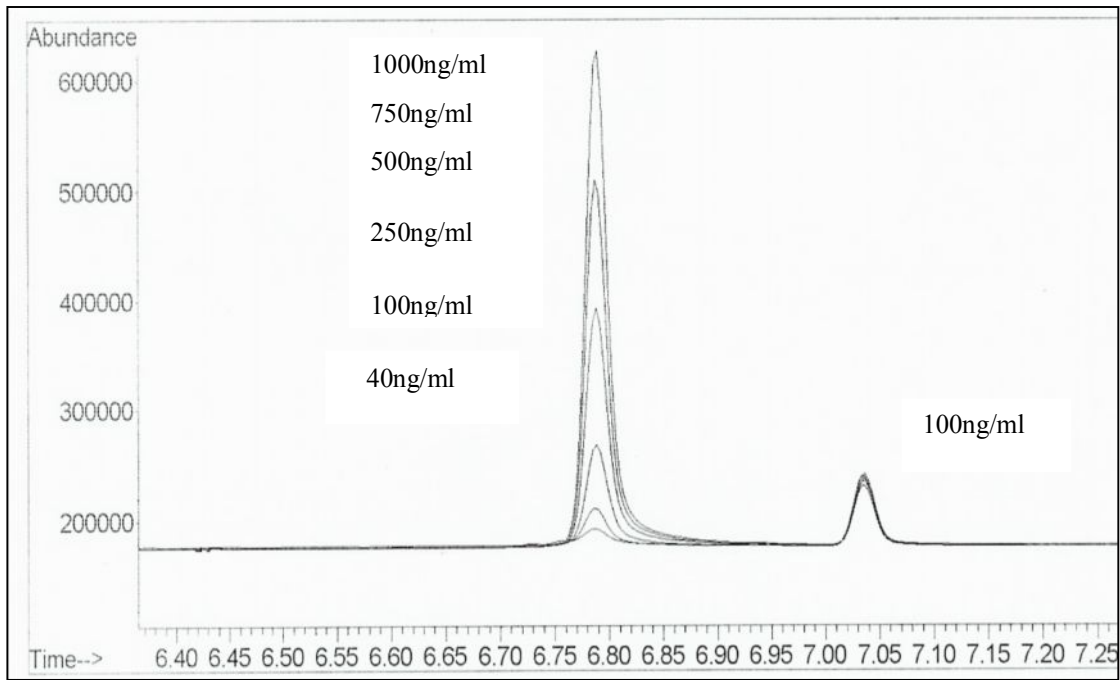
Şekil 4.8:  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişimindeki prilocaine HCl içeren citanest flakonun birinci türev spektrofotometresi spektrumu

#### 4.4. Gaz Kromatografisi- Azot Fosfor Dedeksiyon (GC –NPD) Yöntemi

##### 4.4.1. İn-Vitro Çalışması

###### 4.4.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Prilocaine HCl' nin 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişimde stok çözeltisi HPLC grade metanolde hazırlandı. Bu stok çözeltiden belirli hacimlerde alınıp HPLC grade methanol ile seyreltilerek 40, 100, 250, 500, 750 ve 1000  $\text{ng ml}^{-1}$  derişimler de standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çalışmada internal standart olarak 100  $\text{ng ml}^{-1}$  lidocainen çözeltisi de kullanıldı. Hazırlanan çözeltilerin sinyalleri Azot-Fosfor dedektöründe kaydedildi. GC-NPD de elde edilen kromatogramlar Şekil 4.9' da verildi.

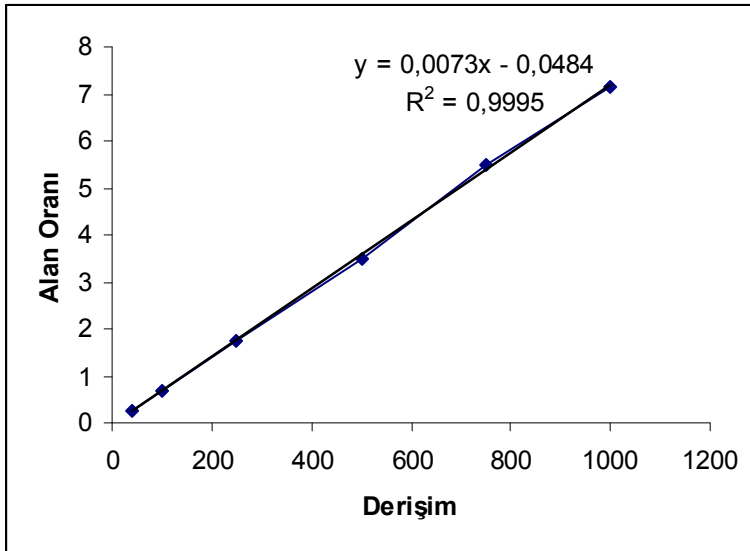


Şekil 4.9: GC-NPD sisteminde, 100  $\text{ng ml}^{-1}$  derişiminde internal standart lidocaine içeren 40, 100, 250, 500, 750 ve 1000  $\text{ng ml}^{-1}$  derişimlerinde prilocaine HCl çözeltilerinin kromatogramları

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

##### 4.4.1.2.1.Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

Prilocaine HCl' nin doğrusal olduğu 40-1000 ng ml<sup>-1</sup> derişim aralığında bir seri standart (50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 ng ml<sup>-1</sup>) çözeltiler hazırlanarak GC-NPD sisteminde kromatogramları alındı.. Her bir çözeltilerin derişimine karşı GC-NPD sisteminde prilocaine HCl pik alanının internal standart (lidocaine) pik alanına oranının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: GC-NPD Sisteminde in-vitro koşullarda internal standart lidocaine içeren prilocaine HCl' nin kalibrasyon eğrisi

GC- NPD çalışmalarında 100 ng ml<sup>-1</sup> derişiminde lidocaine içeren standart prilocaine HCl çözeltilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.11' de verildi.



Tablo 4.11: Prilocaine HCl' ye ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiki bilgiler

Parametreler	GC-NPD Yöntemi
Doğrusal Aralık (ng ml <sup>-1</sup> )	40-1000
Regrasyon Eğrisi Denklemi	0,0073x-0,0484
S <sub>a</sub>	5,4x10 <sup>-4</sup>
S <sub>b</sub>	2,8x10 <sup>-2</sup>
Korelasyon Katsayısı ( r )	0,9998

**Sa: Kaymanın standart sapması, Sb: Eğimin standart sapması**

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

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan 40 ng ml<sup>-1</sup> den daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı. LOD değeri için 30 ng ml<sup>-1</sup>, LOQ değeri için 40 ng ml<sup>-1</sup> olarak belirlendi.

#### 4.4.1.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Gün-içi ve günler-arası elde edilen sonuçlar, kalibrasyon eğrisi içine düşen 100 ng ml<sup>-1</sup> derişiminde lidocaine içeren üç farklı derişimde hazırlanan prilocaine HCl çözeltileri için bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi (Tablo 4.12).

Tablo 4.12: 100 ng ml<sup>-1</sup> derişiminde lidocaine içeren prilocaine HCl' nin 3 farklı derişimdeki gün-içi ve günler-arası kesinlik, doğruluk ve tekrarlanabilirlik değerleri

Eklenen (ng mL <sup>-1</sup> )	Gün-İçi				Günler-Arası			
	Bulunan Değer (ng mL <sup>-1</sup> )	X	S	%RSD	Bulunan Değer (ng mL <sup>-1</sup> )	X	S	% RSD
100	106,362	107,378	2,873	2,67	117,714	102,603	5,018	4,82
	110,204				93,642			
	105,279				95,283			
	103,495				107,709			
	110,895				97,730			
	108,037				103,544			
250	251,572	251,893	2,647	1,05	234,981	246,164	8,630	3,44
	248,280				230,637			
	255,683				228,874			
	251,576				298,310			
	250,209				225,414			
	254,042				258,781			
500	475,000	480,855	10,574	2,19	466,902	486,366	11,300	2,28
	485,824				444,985			
	475,067				459,783			
	471,161				569,346			
	499,795				471,508			
	478,285				505,677			

X: Ortalama Değer, S : Standart Sapma, RSD: Bağlı Standart Sapma

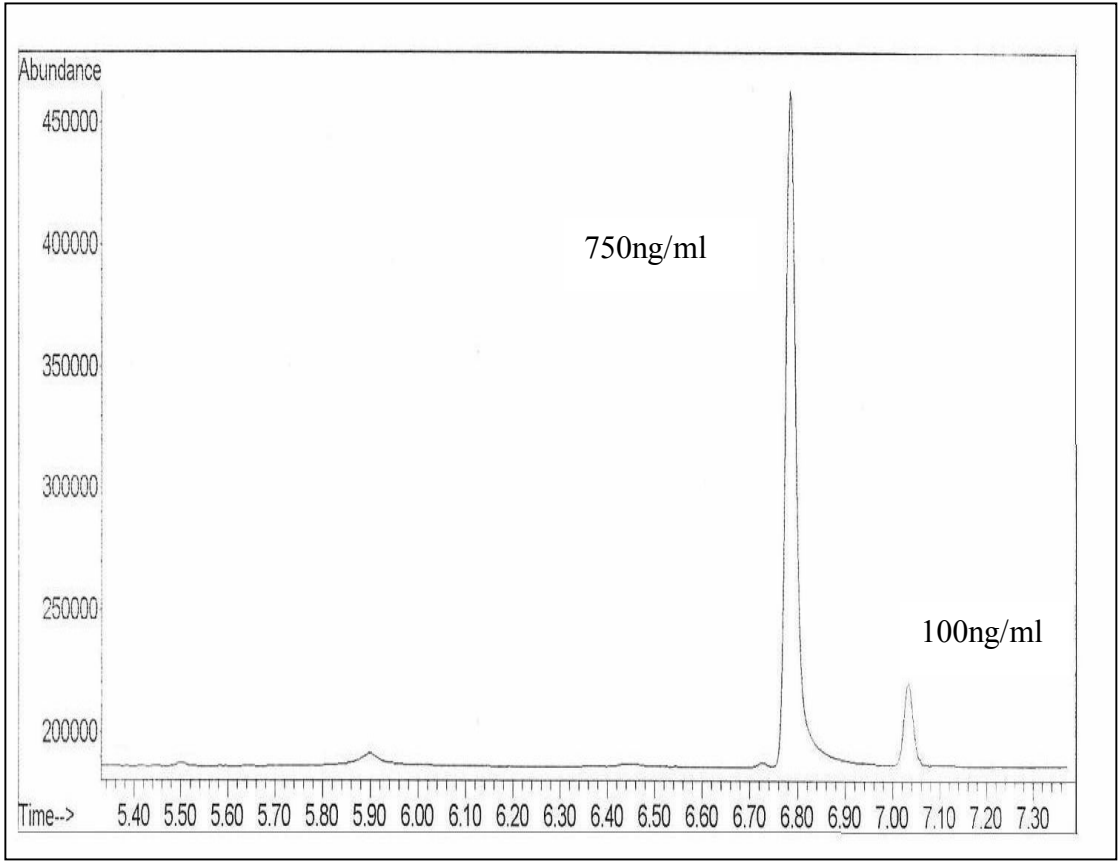
#### 4.4.1.2.4.Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Yöntem prilocaine HCl içeren farmasötik preparatlara uygulandı. Etken maddesi 400 mg prilocaine HCl olan 20 ml citanest flakondan uygun miktarlarda alınarak metanolde 1000 µg ml<sup>-1</sup> derişimde olacak şekilde stok çözelti hazırlandı. Daha sonra bu stok çözülden 750 ng ml<sup>-1</sup> lik çalışma çözültisi hazırlandı. Hazırlanan bu çözültinin GC-NPD sisteminde kromatogramı alındı ve elde edilen değerler yüzde geri kazanım

olarak belirlendi. GC-NPD kromatogramı Şekil 4.11’de ve elde edilen yüzde geri kazanım değerleri Tablo 4.13’de verildi.

Tablo 4.13: Farmasötik preparat içindeki prilocaine HCl’nin geri kazanımı (N=3)

Eklenen ( $\text{ng ml}^{-1}$ )	Bulunan ( $\text{ng ml}^{-1}$ )	Geri kazanım (%)
750 $\text{ngml}^{-1}$	738,4	98,45

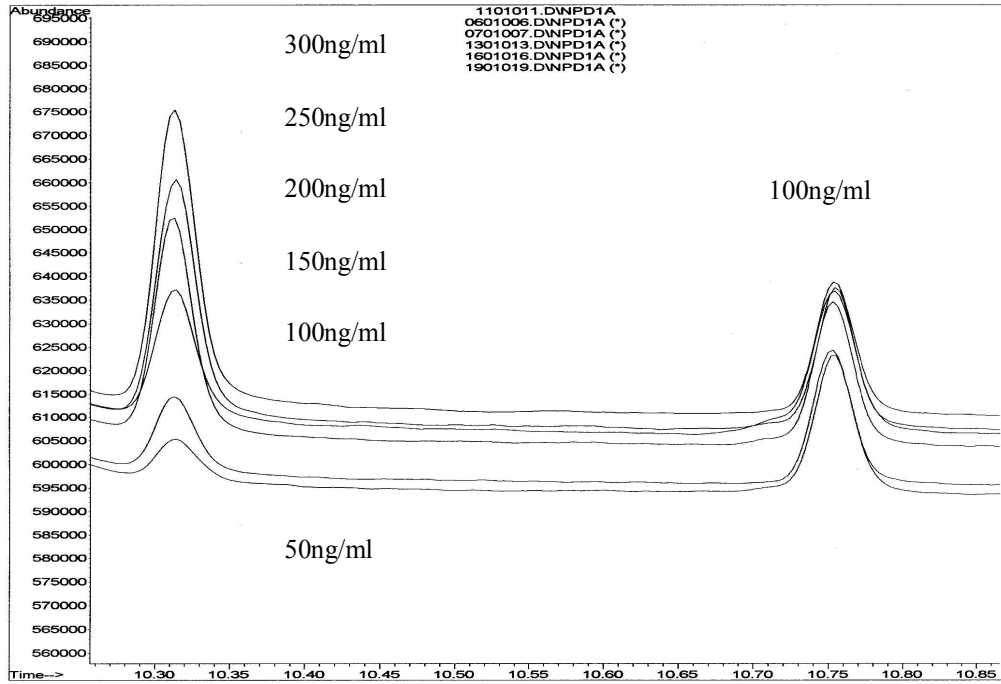


Şekil 4.11: GC-NPD Sisteminde 100  $\text{ng ml}^{-1}$  derişimde internal standart lidocaine içeren citanest flakondan hazırlanan 750  $\text{ng ml}^{-1}$  derişimdeki Prilocaine HCl’ nin kromatogramı

#### 4.4.2. Plazma Çalışması

##### 4.4.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinden temin edilen plazmanın 0,5 ml'sine kalibrasyon eğrisini elde edebileceğimiz 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 ng ml<sup>-1</sup> derişimlerde hazırlanan prilocaine HCl çözeltilerinden uygun miktarlarda ve 100 ng ml<sup>-1</sup> derişimde internal standart olarak kullanılan lidocaine' den eklendi (spike edildi). Karıştırıldı ve Bölüm 3.3.4' de belirtildiği şekilde ekstraksiyon yapıldı. Ekstraktlar GC-NPD sistemine enjekte edildi ve kromatogramları alındı (Şekil 4.12).

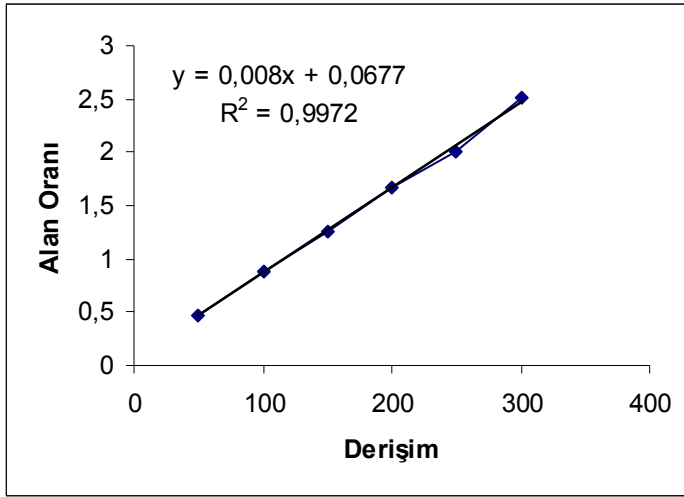


Şekil 4.12: GC-NPD sisteminde plazmadan ekstraksiyonla elde edilen 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 ng ml<sup>-1</sup> derişimlerinde prilocaine HCl ve 100 ng ml<sup>-1</sup> derişimde eklenen internal standart lidocaine çözeltilisinin kromatogramları

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

##### 4.4.2.2.1.Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

100 ng ml<sup>-1</sup> derişimde lidocaine içeren Prilocaine HCl' nin plazmadan ekstraksiyonu ile elde edilen çözeltilerin derişimine karşı prilocaine HCl çözeltileri için okunan pik alanlarının lidocaine pik alanına oranlanmasıyla elde edilen değerlerin grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.13' de verildi.



Şekil 4.13: GC-NPD sisteminde plazmadan ekstrakte edilen prilocaine HCl' nin kalibrasyon eğrisi

GC-NPD sisteminde plazmadan ekstrakte edilen 100 ng ml<sup>-1</sup> derişiminde lidocaine içeren prilocaine HCl çözeltilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.14' de verildi.

Tablo 4.14: Plazma çalışmasında prilocaine HCl' ye ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistikî bilgiler

Parametreler	GC-NPD Yöntem
Doğrusal Aralık (ng ml <sup>-1</sup> )	50-300
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y= 0,008x+0,0677$
S <sub>a</sub>	$3,5 \times 10^{-4}$
S <sub>b</sub>	$2,9 \times 10^{-2}$
Korelasyon Katsayısı ( r )	0,999

S<sub>a</sub>: Kaymanın standart sapması, S<sub>b</sub>: Eğimin standart sapması

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

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan 50 ng ml<sup>-1</sup> den daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı. LOD değeri için 40 ng ml<sup>-1</sup>, LOQ değeri için 50 ng ml<sup>-1</sup> olarak belirlendi.

#### 4.4.2.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisi içine düşen 100 ng ml<sup>-1</sup> derişiminde lidocaine içeren üç farklı derişimde hazırlanan prilocaine HCl çözeltileri plazmaya eklendi, ekstrakte edildi ve elde edilen çözeltiler için GC-NPD çalışmasında bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile gün-içi ve günler-arası kesinlik, doğruluk ve tekrarlanabilirlik değerleri verildi (Tablo 4.15).

Tablo 4.15: Plazma çalışmasında 100 ng ml<sup>-1</sup> derişiminde lidocaine içeren Prilocaine HCl' nin 3 farklı konsantrasyondaki gün içi ve günler arası kesinlik, doğruluk ve tekrarlanabilirlik değerleri

Eklenen (ng mL <sup>-1</sup> )	Gün-İçi				Günler-Arası			
	Bulunan Değer (ng mL <sup>-1</sup> )	X	S	%RSD	Bulunan Değer (ng mL <sup>-1</sup> )	X	S	% RSD
100	108,642	102,558	4,89	4,76	113,965	109,184	4,58	4,19
	105,841				109,234			
	101,779				108,379			
	96,526				103,497			
	105,150				114,893			
	97,234				105,136			
150	151,574	151,228	3,51	2,32	161,196	161,204	4,86	3,01
	148,289				165,536			
	155,687				159,158			
	151,577				167,457			
	146,200				153,784			
	154,046				160,093			
250	239,453	243,929	5,64	2,31	241,521	247,047	9,07	3,67
	247,633				238,124			
	245,688				253,453			
	242,361				247,560			
	251,964				261,588			
	236,479				240,037			

X: Ortalama Değer, S : Standart Sapma, RSD: Bağlı Standart Sapma

#### 4.4.2.2.4.Geri Kazanım

Geri kazanım çalışması, 100 ng ml<sup>-1</sup> derişiminde lidocaine ve üç farklı derişimde prilocaine HCl plazmaya eklendi, ekstraksiyonu yapıldı ve elde edilen değerler 100 ng ml<sup>-1</sup> derişiminde lidocaine içeren aynı derişimdeki standart prilocaine HCl çözeltilerine oranlanarak geri kazanım değerleri elde edildi. Değerler yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.16' da verildi..

Tablo 4.16: Plazma çalışmasında 100 ng ml<sup>-1</sup> derişiminde lidocaine içeren prilocaine HCl' ye ait yüzde geri kazanım değerleri (n=6)

Eklenen (ng ml <sup>-1</sup> )	Bulunan (ng ml <sup>-1</sup> )	Geri Kazanım (%)
100	86,85	86,85
150	136,43	90,60
250	224,66	93,60

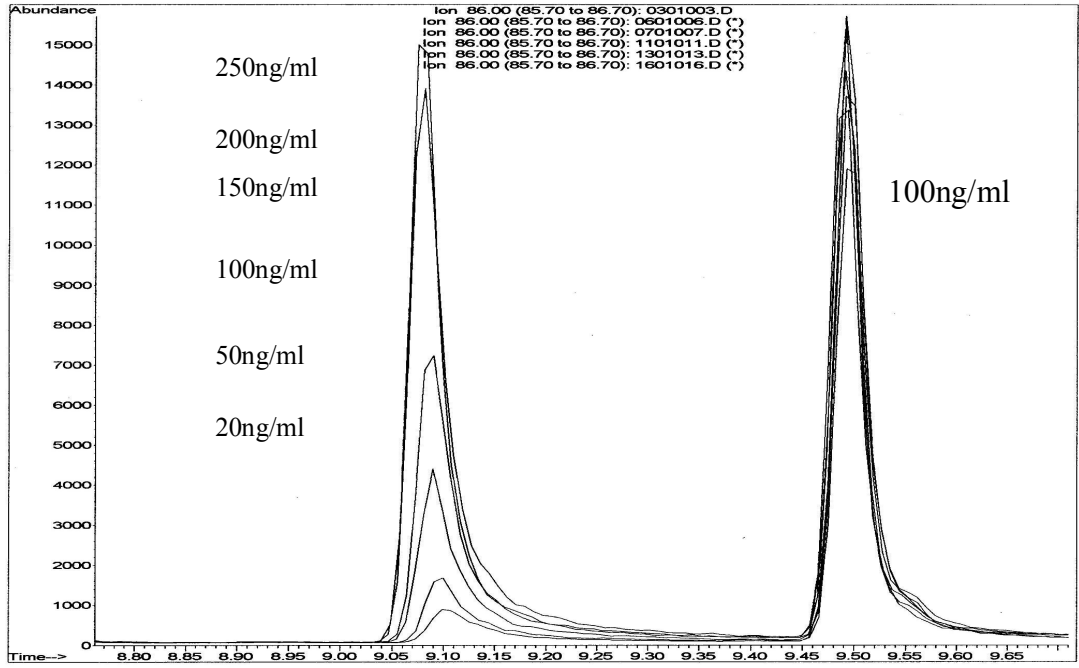
#### 4.5. Gaz Kromatografisi Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Yöntemi

##### 4.5.1. Plazma Çalışması

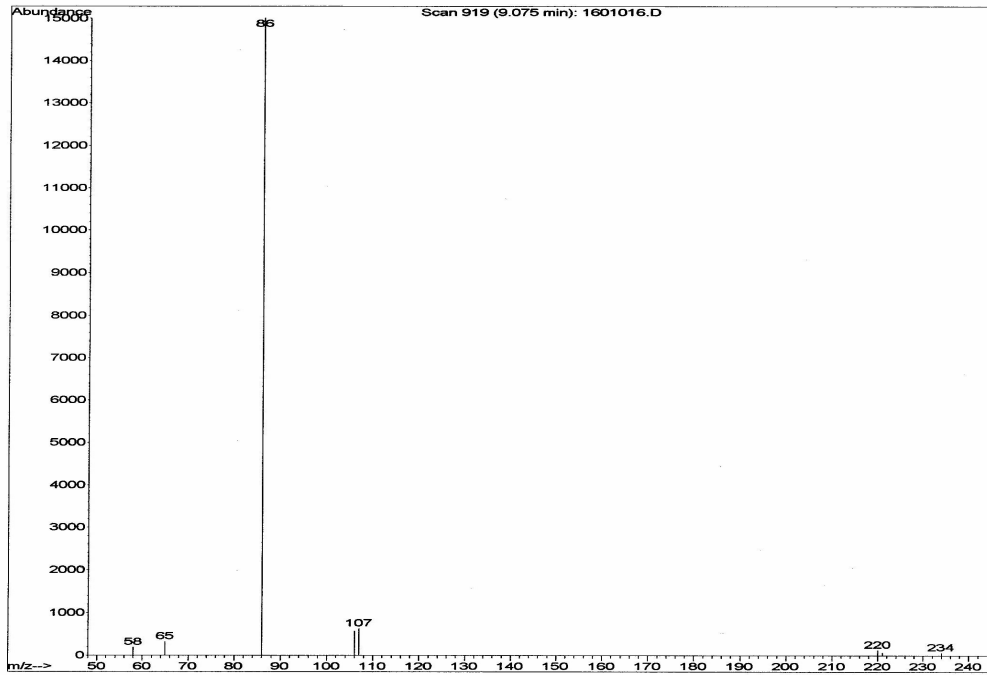
###### 4.5.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinden temin edilen plazmanın 0,5 ml'sine kalibrasyon eğrisini elde edebileceğimiz 20, 50, 100, 150, 200 ve 250 ng ml<sup>-1</sup> derişimlerde hazırlanan prilocaine HCl çözeltileri ve 100 ng ml<sup>-1</sup> derişimde internal standart olarak kullanılan lidocaineden uygun miktarlarda eklendi (spike edildi), karıştırıldı ve Bölüm 3.3.4' de belirtildiği şekilde ekstraksiyon yapıldı. Ekstarktlar GC-MS' e enjekte edilerek kromatogramları ve kütle spektrumları alındı. Kromatogramlar Şekil 4.13' de ve kütle spektrumu Şekil 4.14' de verildi.





Şekil 4.13: Plazma çalışmasında, 100 ng ml<sup>-1</sup> derişimde lidocaine içeren 20, 50, 100, 150, 200 ve 250 ng ml<sup>-1</sup> derişimlerinde prilocaine HCl çözeltilerinin GC-MS kromatogramları

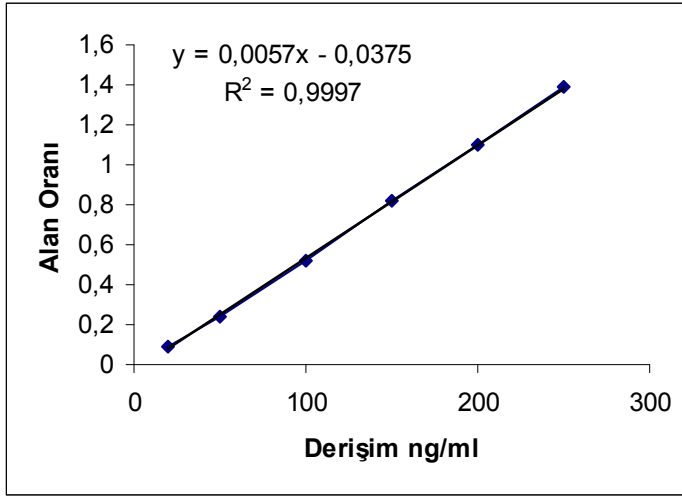


Şekil 4.14: Plazma çalışmasında 100 ng ml<sup>-1</sup> derişimde lidocaine içeren prilocaine HCl' ye ait MS spektrumu (temel iyonu olan 86 iyonu)

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

##### 4.5.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri

100 ng ml<sup>-1</sup> derişimde lidocaine içeren prilocaine HCl'nin plazmadan ekstraksiyonu ile elde edilen çözeltilerin derişimine karşı prilocaine HCl çözeltileri için okunan pik alanlarının lidocaine pik alanına oranlanmasıyla elde edilen değerlerin grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.15' de verildi.



Şekil 4.15: GC-MS Sisteminde plazmadan ekstrakte edilen prilocaine HCl' nin kalibrasyon eğrisi

GC-MS çalışmalarında plazmadan ekstrakte edilen prilocaine HCl' nin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.17' de verildi.

Tablo 4.17: Plazma çalışmasında GC-MS sisteminde prilocaine HCl' ye ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistik bilgileri

Parametreler	GC-MS Yöntem
Doğrusal Aralık (ng ml <sup>-1</sup> )	20-250
Regrasyon Eğrisi Denklemi	y= 0,0057x- 0,0375
S <sub>a</sub>	2,4x10 <sup>-3</sup>
S <sub>b</sub>	1,05x10 <sup>-1</sup>
Korelasyon Katsayısı ( r )	0,9998

**S<sub>a</sub>: Kaymanın standart sapması, S<sub>b</sub>: Eğimin standart sapması**

#### 4.5.1.2.2. Gözlenebilirlik Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan 20 ng ml<sup>-1</sup> den daha küçük derişimde bir seri çözelti hazırlandı ve GC-MS ölçümleri alındı. LOD değeri 10 ng ml<sup>-1</sup>, LOQ değeri 20 ng ml<sup>-1</sup> olarak belirlendi.

#### 4.5.1.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisi içine düşen 100 ng ml<sup>-1</sup> derişiminde lidocaine içeren üç farklı derişimde hazırlanan prilocaine HCl çözeltileri plazmaya eklendi, ekstrakte edildi ve elde edilen çözeltiler için GC-MS çalışması ile bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile gün-içi ve günler-arası kesinlik, doğruluk ve tekrarlanabilirlik değerleri verildi (Tablo 4.18).

Tablo 4.18: GC-MS sistemine plazma çalışmasında prilocaine HCl' nin 3 farklı derişimdeki gün içi ve günler arası kesinlik, doğruluk ve tekrarlanabilirlik değerleri

Eklenen (ng ml <sup>-1</sup> )	Gün-İçi				Günler-Arası			
	Bulunan Değer (ng ml <sup>-1</sup> )	X	S	% RSD	Bulunan Değer (ng ml <sup>-1</sup> )	X	S	% RSD
150	157,452	152,613	3,50	2,31	160,278	152,620	6,55	4,29
	152,173				155,715			
	147,110				147,914			
	153,239				145,457			
	154,753				159,212			
	150,954				147,146			
200	207,526	203,520	5,74	2,82	185,123	188,669	6,02	3,19
	201,792				179,190			
	195,217				196,571			
	210,717				188,511			
	206,428				190,202			
	199,441				192,422			
250	243,350	244,511	5,34	2,18	259,027	259,540	7,43	2,86
	241,203				270,286			
	239,636				264,458			
	254,627				248,172			
	243,833				258,145			
	244,414				257,156			

X: Ortalama Değer, S: Standart Sapma, RSD: Bağıl Standart Sapma

#### 4.5.1.2.4. Geri Kazanım

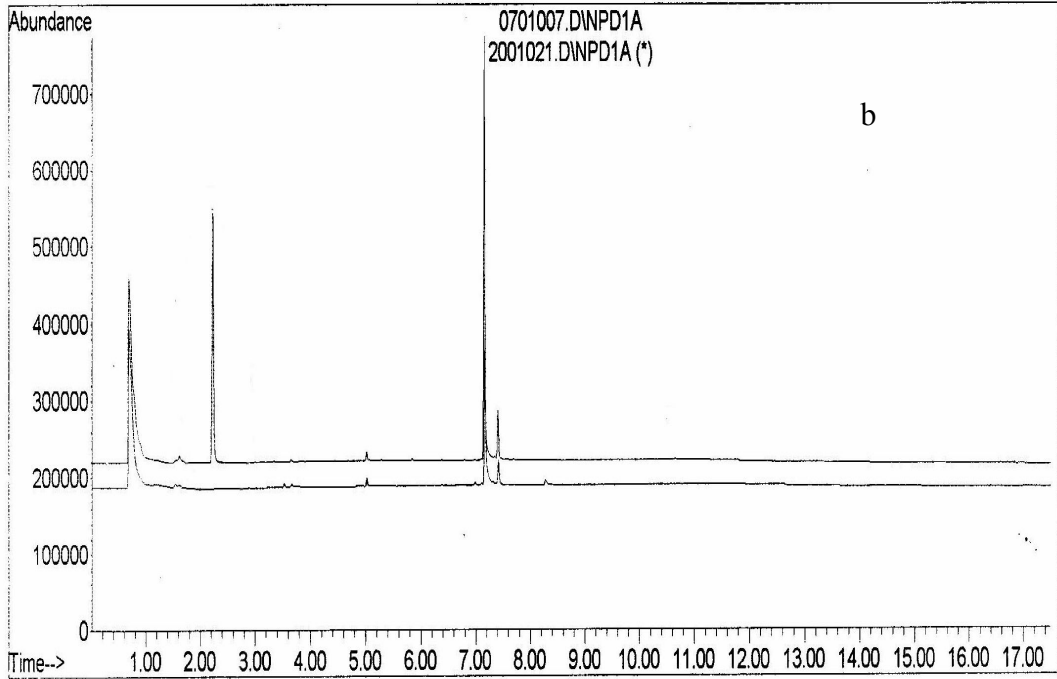
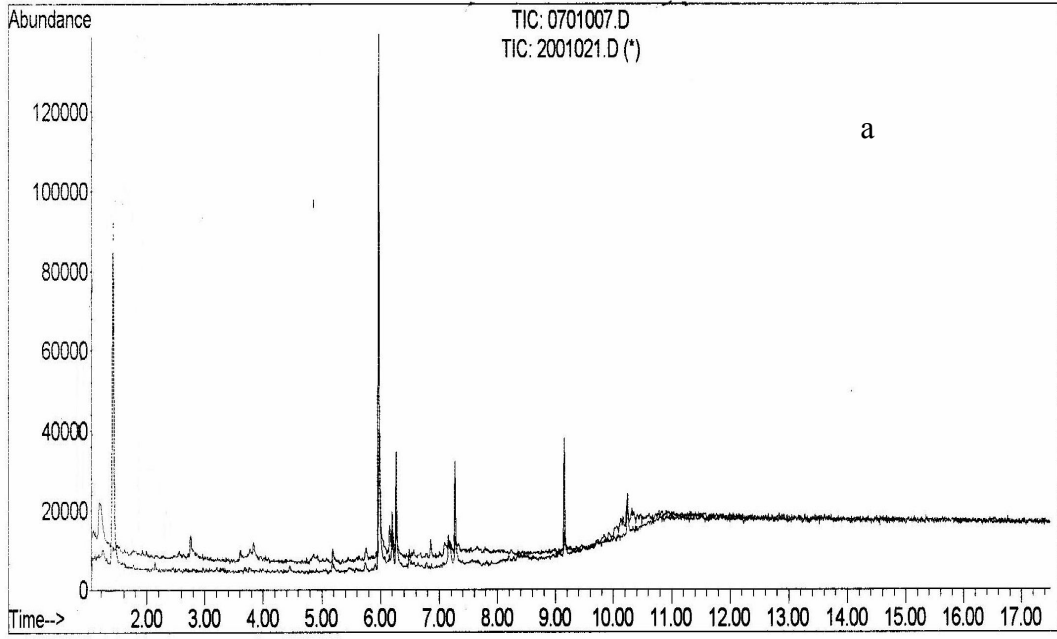
Geri kazanım çalışması, 100 ng ml<sup>-1</sup> derişiminde lidocaine içeren üç farklı derişimde prilocaine HCl plazmaya eklendi, karıştırıldı ve ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon yapılan çözeltiler için elde edilen değerler aynı derişimdeki standart prilocaine HCl çözeltileri için elde edilen değerlere oranlanarak geri kazanım değerleri elde edildi. Sonuçlar yüzde geri kazanım değerleri olarak verildi (Tablo 4.19).

Tablo 4.19: GC-MS çalışmasında prilocaine HCl' ye ait geri kazanım değerleri (n=6) değerleri

Eklenen (ng ml <sup>-1</sup> )	Bulunan (ng ml <sup>-1</sup> )	Geri Kazanım (%)
150	138,10	92,06
200	175,13	87,56
250	227,56	91,02

#### 4.5.1.2.5. Stabilite Testi

1000 µg ml<sup>-1</sup> olarak hazırlanan ana stok çözeltisi -20 °C derin dondurucuda çözelti bekletildi ve değişik sürelerde yapılan ölçümlerde elde edilen sonuçlardan 3 ay süreyle stabil olduğu belirlendi. 1 µg ml<sup>-1</sup> lik prilocaine HCl çözeltisi hazırlandı ve oda şartlarında bekletildi. 72 saate kadar stabil olduğu fakat 72 saatten sonra metaboliti olan o-toluidine parçalanmaya başladığı GC-MS ve GC-NPD kromatogramlarıyla tespit edildi. 1 µg ml<sup>-1</sup> lik prilocaine HCl çözeltisinin stabil olan GC-MS ve GC-NPD kromatogramları ile o-toluidine parçalandığı kromatogramları Şekil 4.16' da pikler üst üste çakıştırılarak gösterilmiştir.



Şekil 4.16:  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  prilocaine HCl' nin stabil ve bozunmuş olan GC-MS kromatogramları (a) ve GC-NPD kromatogramları (b)

#### 4.5.1.2.6. Plazma Çalışmasında GC-NPD ve GC-MS sitemlerinde sıcaklığın ve akış hızının etkisi

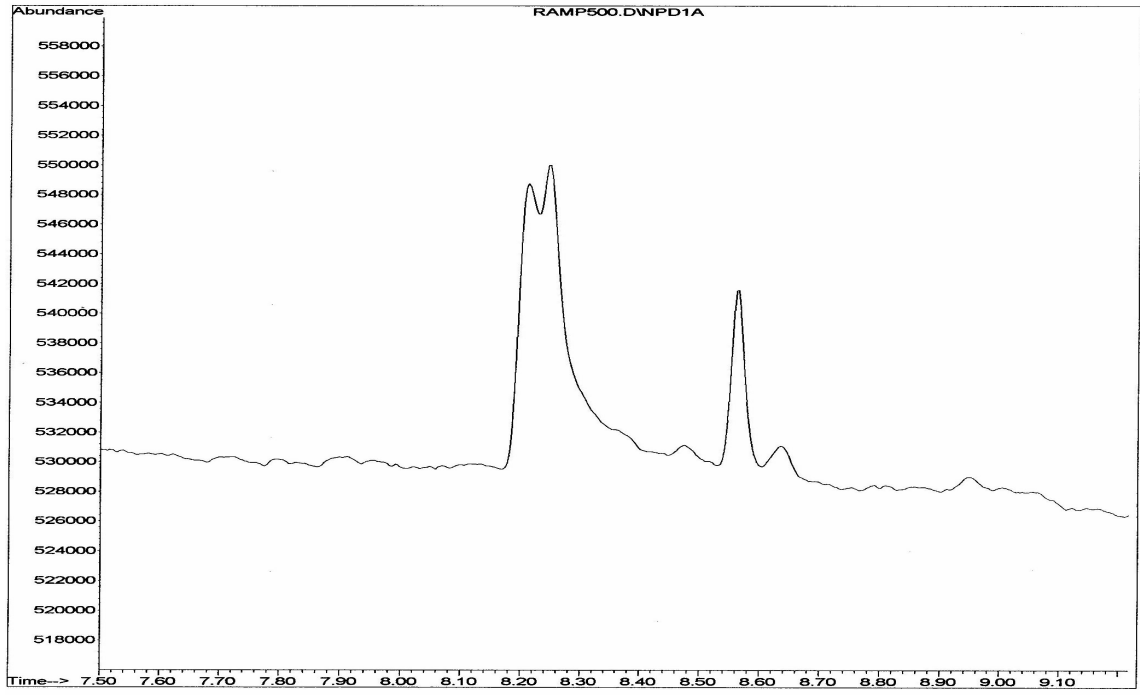
İn-vitro koşullarda yapılan analizlerde prilocaine HCl'nin alıkonma zamanı GC-NPD için 6.8 dk. ve lidocainenin alıkonma zamanı 7.1 dk. olarak belirlendi ve yöntem valide edildi. Fakat plazma çalışmalarında ekstraksiyon esnasında plazmadan gelen safsızlıklar girişim yaptığı için değişik sıcaklık programı ve akış hızları denendi ve en iyi program belirlendi. Sıcaklık programı ve akış hızları değiştiği için alıkonma zamanları da değişti. Kullanılan programda prilocaine HCl alıkonma zamanı 10.30 dk., lidocaine ise 10.75 dk. olarak belirlendi. Değişik sıcaklık programları ve bu programlarda elde edilen GC-NPD kromatogramları:

**1. Deneme:** Fırın sıcaklığı 90 °C' den başlatılıp dakikada 20 °C artacak şekilde ayarlanıp final sıcaklığı 300 °C' de 7 dakika tutulup taşıyıcı gazın akış hızı 0,7 ml dk<sup>-1</sup> olacak şekilde analiz yapıldı. Bu analiz sonucunda, prilocaine HCl için tek bir pik değil çatallı (çift) bir pik elde edildi (Şekil: 4.18). Bu da safsızlıkların olacağını gösterir.

**2. Deneme:** Fırın sıcaklığı 90 °C' den başlatılıp dakikada 15 °C artacak şekilde ayarlanıp final sıcaklığı 200 °C' de 7 dakika tutulup taşıyıcı gazın akış hızı 1,4 ml dk<sup>-1</sup> olacak şekilde analiz yapıldı.(Şekil: 4.19). Bu sıcaklık programında da yine çift pik geldi. Fakat piklerde biraz daha ayrılma tespit edildi.

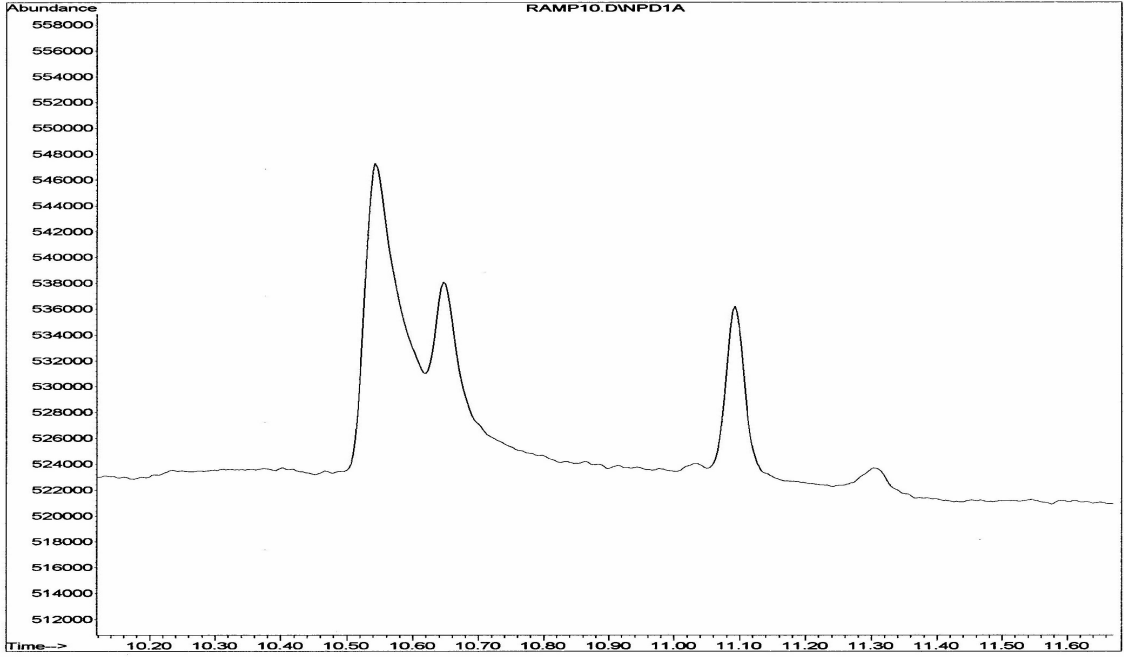
**3. Deneme:** Fırın sıcaklığı 90 °C' den başlatılıp dakikada 12 °C artacak şekilde ayarlanıp final sıcaklığı 200 °C' de 7 dakika tutulup taşıyıcı gazın akış hızı 1,6 ml dk<sup>-1</sup> olacak şekilde analiz edildi (Şekil 4.20). Bu sıcaklık programlamasında da pikler birbirlerinden ayrılmadığı fakat ikinci denemeye göre daha iyi olduğu belirlendi.

**4.Deneme:** Fırın sıcaklığı 90°C' den başlatılıp dakikada 10 °C artacak şekilde ayarlanıp final sıcaklığı 200°C' de 7 dakika tutulup taşıyıcı gazın akış hızı 1,6 ml dk<sup>-1</sup> olacak şekilde analiz edildi (Şekil 4.21) Bu sıcaklık programlamasında da piklerin en iyi şekilde ayrıldığı belirlendi.

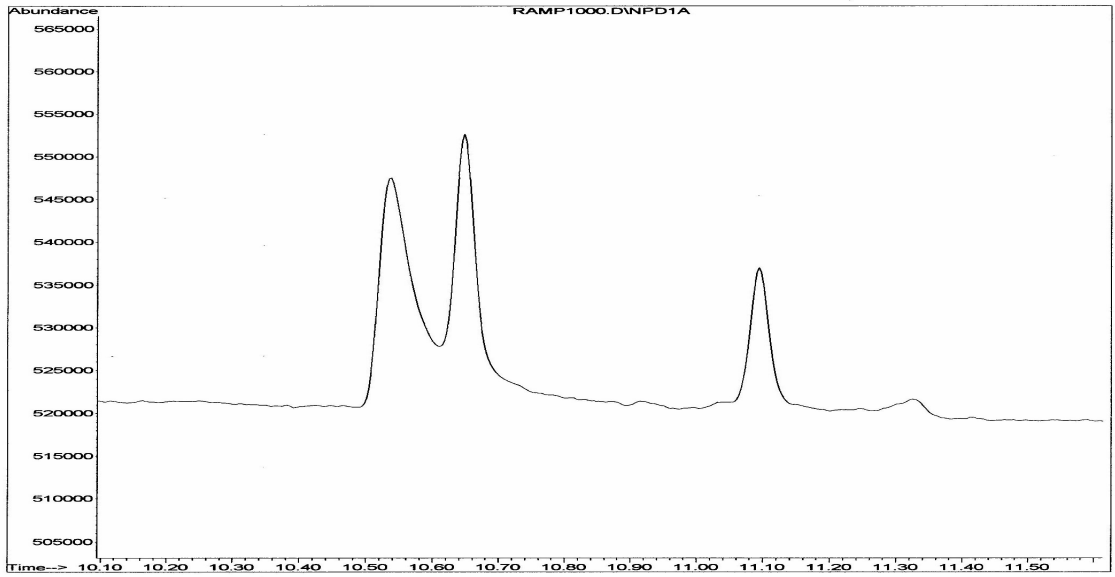


Şekil 4.18: Birinci denemede ki sıcaklık programında elde edilen kromatogram

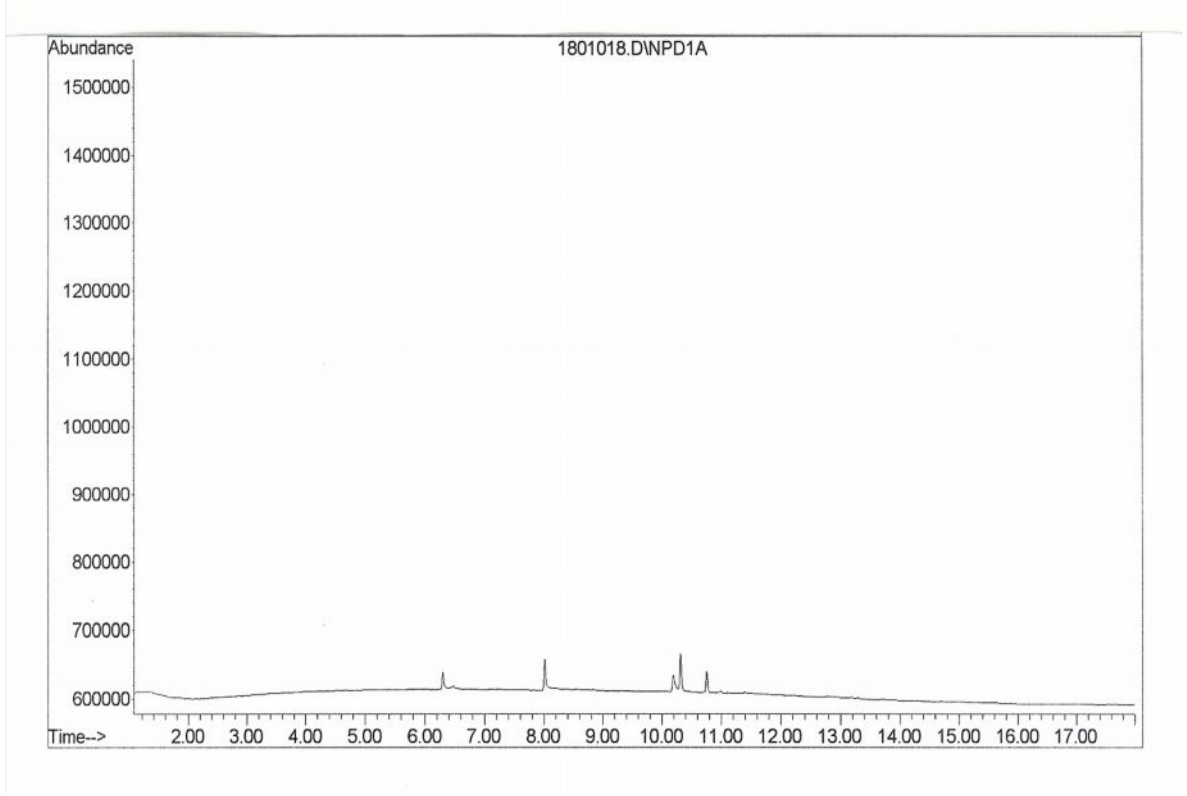




Şekil 4.19: İkinci denemede ki sıcaklık programında elde edilen kromatogram



Şekil 4.20: Üçüncü denemede ki sıcaklık programında elde edilen kromatogram



Şekil 4.21: Dördüncü denemedeki sıcaklık programında elde edilen kromatogram

## 5. TARTIŞMA

Analitik kimyada, herhangi bir maddenin analizi için kullanılacak analitik tekniklerin üstünlükleri ve sınırlamaları hakkında yeteri kadar bir bilgi donanımına ve iyi bir karar verme yetisine sahip olmak gerekir. Bunlara ilaveten de çalışılacak konu ile ilgili iyi bir literatür taramasının yapılmış olması gerekmektedir. Aslında analitik bir tekniğin nasıl seçileceği konusunda net bir şey söylemek mümkün değildir, çünkü koşullara bağlı olarak kullanılacak teknikler değişebildiğinden dolayı her zaman en iyi yol sadece bir tane olamayabilir. Analitik yöntem seçimi 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. Bu parametreler çalışılırken de bileşimi güvenilir bir şekilde bilinen bir veya daha fazla standart numune kullanılır. Kullanılan standart numunelerin hem bileşim bakımından hem de analit derişimi bakımından analizi yapılacak numune ile benzer olması gerekir.

İlaç analizlerinde, analizin yapılacağı ortama (farmasötik preparat veya biyolojik sıvılar) göre literatür bilgilerine de dayanarak analitik yöntem seçiminin yapılması gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında yöntem seçimini gerçekleştirmeden önce iyi bir literatür taraması yapılmaya çalışıldı. Literatür taramasında prilocaine HCl'nin farmasötik preparatlarda miktar analizine yönelik bir çalışmaya rastlanmadı. Biyolojik sıvılarda da diğer lokal anestezikler ile birlikte miktar analizi çalışmalarına ulaşıldı. Literatür çalışması ışığı altında lokal anestezik olarak kullanılan Prilocaine HCl' nin hem farmasötik preparatlarda hem de kan da miktar analizi için UV-Görünür Bölge

Spektrofotometrisi, Türev Spektroskopisi, GC-NPD ve GC-MS yöntemleri geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı.

Çalışmada kullanılan prilocaine HCl standart etken maddesi Novagenixden ve prilocaine HCl içeren citanest flakon Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinden temin edildi. Prilocaine HCl' nin saflık kontrolü  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları alınarak yapıldı (Ek 1. Şekil 1 ve Şekil 2). Bu çalışmalar sonucunda Prilocaine HCl' nin yeterli saflıkta olduğu belirlendi.

Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometresi, yüksek duyarlık, orta ve yüksek seçimlilik, yüksek doğruluk, kesinlik, kolaylık ve rahatlık bakımından ilaç endüstrisinde farmasötik preparatlarda ilaç etken maddelerinin miktar analizinde tercih edilen tekniklerden biri olarak söylenebilir. Bu teknikte, UV-Görünür Bölge spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Yani  $A = f(\lambda)$  fonksiyonudur.

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri çalışmasında, Prilocaine HCl' nin 230 nm de maksimum absorbans verdiği tespit edildikten sonra çalışmanın optimum koşulları belirlendi. Yöntemin doğrusal olduğu 3-15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişim aralığında bir seri standart (3, 5, 8, 10, 12 ve 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) prilocaine HCl çözeltilisinin derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi  $A = 0,0283x + 0,0059$  (A: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0,9999, gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri 1,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri 3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olarak belirlendi. Gün-içi ve günler-arası bağıl standart sapması (RSD), % 6,80'den küçük olduğu tespit edildi. Yöntem aynı zamanda Citanest flakondaki prilocaine HCl analizi için başarıyla

uygulandı ve farmasötik preparattan yöntemin geri kazanım değeri % 100 olarak belirlendi.

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri plazma çalışmasında, 4-15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişim aralığında hazırlanan bir seri prilocaine HCl çözeltilisinden uygun miktarlarda 0,5 ml plazma üzerine eklenip (spike edilip) karıştırıldı ve bölüm 3.3.4. de belirtildiği şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulandı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen çözeltilerin UV-Görünür Bölge Spektrofotometre spektrumları alındı. Her bir çözeltilinin derişimine karşı absorbansı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi  $A=0,0313x-0,0442$  (A: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0,996, gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olarak belirlendi. Gün-içi ve günler-arası kesinlik değerlerinin bağıl standart sapması (RSD), %6,88'den küçük olduğu ve plazmadan Prilocaine HCl' nin ortalama geri kazanımı değerini % 93,12 olarak tespit edildi.

Türev spektrofotometresi, türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir. UV-Görünür Bölge çalışmalarından çok daha geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Bunun nedeni UV-Görünür Bölge spektrumlarında üst üste binen, çakışan bantlar daha çok görünür ve ayırım gücü zayıftır. Türev uygulamaları bu sorunlara belli oranlarda çözüm getirmiş ve karakteristik pikleri az olan ve çözülmemiş bantları içeren spektrumların ayırım gücünü artırmıştır.

Birinci Türev Spektrofotometresi çalışmalarında, optimum koşullar belirlendikten sonra standart prilocaine HCl'nin 210 nm' de bir minimum 225 nm' de bir de maksimum olmak üzere iki pik verdiği tespit edildi. 2-12  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirlendikten sonra, bu derişim aralığında bir seri standart (2,

4, 6, 8, 10 ve 12  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) prilocaine HCl çözeltisi derişimine karşı okunan minimum ve maksimum absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrilerinin yapılan regrasyon analizinden, 210 nm minimum dalga boyu için regrasyon doğrusunun denklemi  $A=0,0263x+0,0322$  (A: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0,9984, 225 nm maksimum dalga boyu için yapılan regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi  $A=0,0019x+7E^{-06}$  (A: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9984 olarak belirlendi. Birinci türev spektroskopisi yöntemi için gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri 1,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olarak tespit edildi. Gün-içi ve günler-arası kesinlik değerlerinin bağıl standart sapması (RSD), 210 nm minimum dalga boyu için % 5,02'den, 225 nm maksimum dalga boyu için de % 4,41'den küçük olduğu belirlendi. Yöntem aynı zamanda Citanest flakondaki prilocaine HCl analizi için başarıyla uygulandı. Yöntemin farmasötik preparatlardaki geri kazanım değeri de % 100 olarak tespit edildi.

Kromatografi, karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşimlerin ayrılması, tanınması ve tayininde çok yaygın olarak kullanılan bir yöntemler topluluğudur. Gaz Kromatografisi (GC) doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, duyarlılık ve sonuçların hızlı elde edilebilmesi gibi diğer yöntemlere göre bir çok üstün yanlara sahip olması ve ayrıca nanogram seviyesinde bile miktar analizi yapılabilmesinden dolayı biyolojik materyallerde ilaç analizlerinde kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu yöntemin kullanılabilirliğini sınırlayan tek bir özelliği analizde kullanılan maddenin uçucu olması ya da uçucu hale getirilebilmesidir. Yüksek sıcaklığa dayanabilen maddelerin analizinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Prilocaine HCl sıcaklığa

dayanıklı ve uçucu olduğundan dolayı GC-NPD ve GC-MS yöntemleriyle miktar analizi gerçekleştirildi.

GC çalışmasında numune buharlaştırılır ve kromatografik kolonun girişine enjekte edilir. İnert bir hareketli gaz yardımıyla elüsyon yapılır. Diğer kromatografik yöntemlerin aksine gaz faz analitin molekülleriyle etkileşmez; gazın tek görevi analiti kolon boyunca taşımaktır. Seçilen analitik bir yöntemin geçerlilik testlerinin (validasyon) yapılmadan önce yöntem uygulanma koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir. GC-NPD ve GC-MS çalışmasında, prilocaine HCl ve internal standart olarak kullanılan lidocaine ayırmak için 0,33  $\mu\text{m}$  film kalınlığında, 12,5 m uzunluğunda, 0,2 mm iç çapında olan ultra 2 (%5 fenil metilsilikon) kolonu, 0,7 ml  $\text{dak}^{-1}$  akış hızıyla helyum taşıyıcı gazı ve 1:10 split enjeksiyon sistemi kullanıldı. İn-vitro çalışmalarında GC' de en iyi ayırımın sağlandığı sıcaklık programı, kolon sıcaklığı 90°C den başlayarak dakikada 20 °C artırılıp 300 °C' de 7 dakika bekletilme şeklinde belirlendi.

GC-NPD çalışmalarında, standart Prilocaine HCl' nin doğrusal olduğu 40-1000 ng  $\text{ml}^{-1}$  derişim aralığında 100 ng  $\text{ml}^{-1}$  derişiminde internal standart olarak lidocaine içeren bir seri standart (50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 ng  $\text{ml}^{-1}$ ) prilocaine HCl çözeltileri hazırlanarak GC-NPD sisteminde kromatogramları alındı. Her bir çözeltilinin derişimine karşı GC-NPD sisteminde prilocaine HCl pik alanın internal standart (lidocaine) pik alanına oranının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi  $y=0,0073x-0,0484$  (y: pik alan oranı, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0,9998 olarak belirlendi. Sinyal/gürültü (S / G) oranı 3 olduğunda saptanabilen en küçük prilocaine HCl derişimi olarak alınan gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri 30 ng  $\text{ml}^{-1}$ , sinyal/gürültü oranı (S/G) 10 olduğunda saptanabilen en küçük prilocaine HCl derişimi olarak alınan tayin alt

sınırı (LOQ) değeri  $40 \text{ ng ml}^{-1}$  olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin bağıl standart sapması (RSD) % 4,82' den küçük olduğu tespit edildi. GC-NPD yöntemi prilocaine HCl etken maddesine sahip ticari Citanest flakondaki miktar analizine başarıyla uygulandı ve farmasötik preparatta yöntemin geri kazanımı % 98,45 olarak tespit edildi.

Plazma çalışmalarında ekstraksiyon esnasında plazmadan gelen safsızlıklar prilocaine HCl piki ile girişim yaptığından ve çakışık iki pik şeklinde geldiğinden dolayı GC-NPD ve GC-MS çalışması için değişik sıcaklık programları ve akış hızları denendi. Ayrımın en iyi şekilde sağlandığı sıcaklık programı ve akış hızı belirlendi. Kullanılan sıcaklık programı: fırın sıcaklığı  $90^{\circ}\text{C}$ ' den başlatılıp dakikada  $10^{\circ}\text{C}$  artacak şekilde ayarlanıp final sıcaklığı  $200^{\circ}\text{C}$ ' de 7 dakika tutuldu ve akış hızı  $1,6 \text{ ml dak}^{-1}$  olarak belirlendi. GC-MS sisteminde elektron impakt modu ve iyonizasyon voltajı 70 EV kullanıldı ve SIM (seçilen iyon taraması) modu seçilerek çalışma gerçekleştirildi. Hem prilocaine HCl hem de lidocaine için temel iyonun 86 iyonu olduğu literatür çalışmalarından ve cihazın MS kütüphanesinden belirlendi. Yaptığımız çalışmada da 86 iyonu elde edildi. 86 iyonu Şekil 4.14 verilen spektrum da görülmektedir.

İnsan plazmasında prilocaine HCl miktar analizi için, kalibrasyon eğrisinin elde edilebilecek derişimlerde  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  derişimde internal standart lidocaine içeren bir seri prilocaine HCl çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerden uygun miktarlarda Araştırma hastanesinden temin edilen insan plazmasına (0,5 ml) eklendi (spike edildi). Karıştırıldı ve Bölüm 3.2.3' de belirtildiği şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulandı. Elde edilen ekstraktlar viallere konularak GC-NPD ve GC-MS sistemlerine enjekte edildi. GC-NPD sisteminde  $50\text{-}300 \text{ ng ml}^{-1}$  derişim aralığında kalibrasyon eğrisi elde edildi.  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  derişimde lidocaine içeren her bir prilocaine HCl çözeltilerinin



derişimine karşı prilocaine HCl pik alanını internal standart pik alanına oranlarını grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi türetildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi  $y = 0,008x + 0,0677$  (y: pik alan oranı, x: derişim) ve korelasyon katsayısı ( r ) 0,999, sinyal/gürültü ( S / G) oranı 3 olduğunda saptanabilen en küçük prilocaine HCl derişimi olarak alınan gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri  $40 \text{ ng ml}^{-1}$ , sinyal/gürültü oranı (S/G) 10 olduğunda saptanabilen en küçük prilocaine HCl derişimi olarak alınan tayin alt sınırı (LOQ) değeri  $50 \text{ ng ml}^{-1}$  olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin bağıl standart sapması (RSD), % 4,76' dan küçük olduğu ve Prilocaine HCl' nin plazmadan ortalama geri kazanımı % 90,35 olarak tespit edildi.

GC-MS plazma çalışmasında, internal standart içeren prilocaine HCl ekstraktlarının doğrusal olduğu  $20\text{-}250 \text{ ng ml}^{-1}$  derişim aralığında bir seri çözelti hazırlanarak GC-MS spektrumları alındı ve çözeltilerin derişimine karşı prilocaine HCl pik alanının internal standart pik alanına oranı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi  $y = 0,0057 x - 0,0375$  (y: pik alan oranı, x: derişim) ve korelasyon katsayısı ( r ) 0,9998, sinyal/gürültü ( S / G) oranı 3 olduğunda saptanabilen en küçük prilocaine HCl derişimi olan gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri  $10 \text{ ng ml}^{-1}$ , sinyal/gürültü oranı (S/G) 10 olduğunda saptanabilen en küçük prilocaine HCl derişimi olan tayin alt sınırı (LOQ) değeri  $20 \text{ ng ml}^{-1}$  ve plazmadan ortalama geri kazanım değeri % 90,22 olarak tespit edildi. Gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin bağıl standart sapması (RSD), % 4.29' dan küçük olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışmada lokal anestetik olarak geniş bir kullanım alanına sahip olan prilocaine HCl'nin miktar analizi için UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi,

Birinci Türev Spektrofotometrisi, GC-NPD ve GC-MS yöntemlerini geliştirip geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmış ve bu yolda çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmadan elde edilen sonuçlardan, yöntemlerin hassas, duyarlı, seçici, doğru, kesin ve tekrarlanabilir olduğu geçerlilik testleri ile gösterildiğinden dolayı bu yöntemler hem farmasötik preparatlarda hem de biyolojik sıvılarda Prilocaine HCl' nin klinik çalışmalarında rutin miktar analizlerinde ve kalite kontrol çalışmalarında uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

## 6.KAYNAKLAR

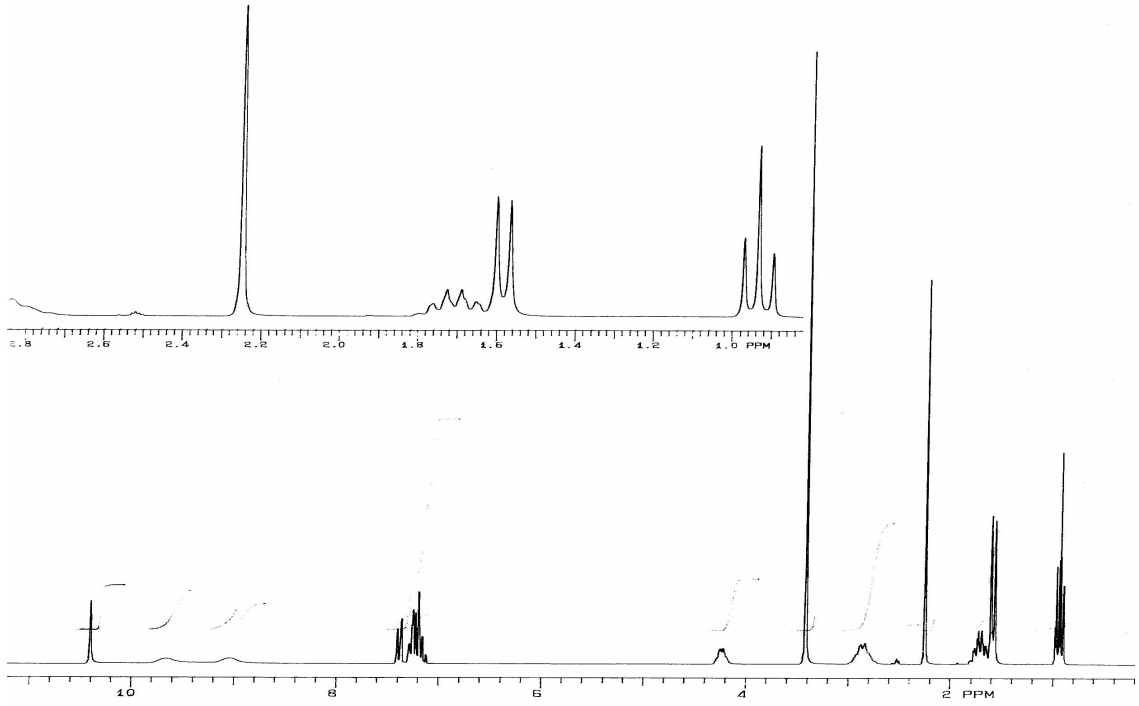
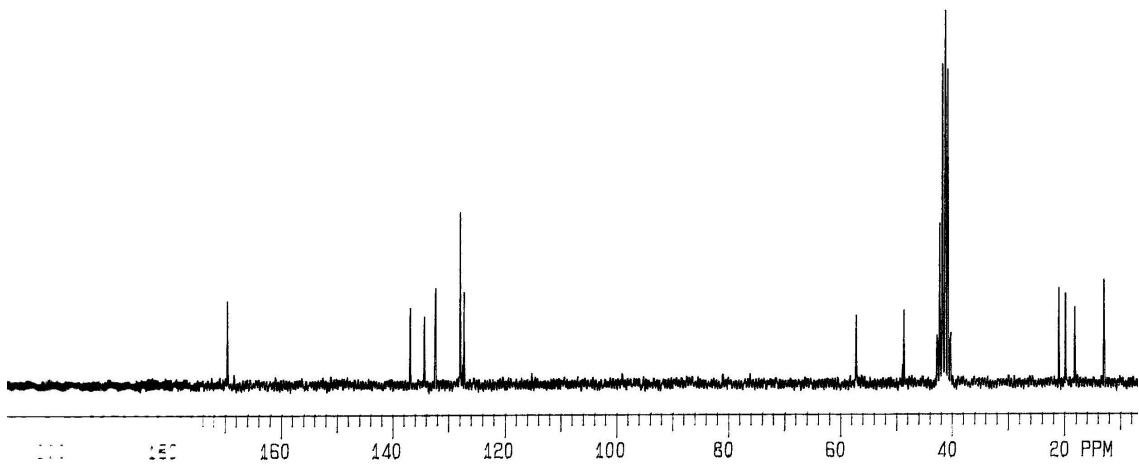
1. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 1 cilt, sekizinci baskı. Ankara: Hacettepe TAŞ, 1998: 808-809.
- 2.Dökmeci İ. Farmakoloji Temel Kavramlar. İstanbul: Nobel tıp kitapevleri, 2000: 590-591.
3. Ohshima T, Takayasu T. Simultaneous determination of local Anesthetics including ester-type anesthetics in human plasma and urine by gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction, *Journal of Chromatography* ,1999;726:185-194.
4. Rishiraj B, Epstein JB, Fine D, Nabi S, Wade N.K. Permanent vision loss in one eye following administration of local anesthesia for a dental extraction, *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 2005;34:220-223.
5. Klein J, Fernandes D, Gazarian M, Kent G and Koren G. Simultaneous determination of lidocaine, prilocaine and the prilocaine metabolite *o*-toluidine in plasma by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 1994; 655: 83-88.
6. Türkmen E, Kocabay G, Yavuz A. S., Öztürk S, Vatansever S, Akkaya V, Erk O, Güler K Epilasyon amacıyla prilokain uygulanan bir hastada gelişen methemoglobinemi, *İstanbul Tıp Fakültesi dergisi*, 2005; 68:19-21.
7. Abacıoğlu N, Onursal E, Hatunoğlu K, Abacıoğlu H. Türkiye Tıbbi İlaç rehberi Güncel Farmalist. Ankara: Palme Yayıncılık, 2004:189.
8. 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 kitapevleri, 1998:107.

9. Onat T, Emerk K, Sözmen E.Y. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002: 638-640.
10. The United States Pharmacopeia, USP24, Official from January 1, 2000, 1390.
11. Koehler A, Oertel R, Kirch W. Simultaneous determination of bupivacaine, mepivacain, prilocaine and ropivacain in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2005;1088:126-130.
12. Storms ML, Stewart J.T. Stability-indicating HPLC assays for the determination of prilocaine and procaine drug combinations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002; 30: 49-58.
13. Watanabe T, Namera A, Yashiki M, Iwasaki Y, Kojima T. Simple analysis of local anaesthetics in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry–electron impact ionization selected ion monitoring, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998; 709: 225-232.
14. Skoog DA, Leary JJ. Principles of Instrumental Analysis, 4th Edition. New York: Harcourt Brace College Publishers , 1998:116,134,135,139,674,679,705,706.
15. Gündüz T. İnrümental Analiz, Altıncı Baskı. Ankara :Gazi Kitapevi, 2002: 101.
16. 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.
17. Analitik Kimya II Laboratuvar Aletli Analiz Deneyleri Hacettepe Üniv., Ecz.Fak. Analitik Kimya A.B.D.,Ankara, 2005.

18. 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.
19. Burchfield, H.P. Storss, E.E. Biochemical Applications of Gas-Chromatography, Academic Pres, New York and London, Fourth printing, 1970: 1-239.
20. Tunçbilek İ. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi 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.
21. Simith R.M. Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry. New York: John Wiley and Sons Ltd.,1988: 37-51.
22. Frederic Douglas, “GC/MS Analysis “ Scientific Testimony An online journal, (<http://sites.netscape.net/dougfrm>) .
23. Electronic Pressure Control in Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Elseiver Science Publisher, 1988: 11-35 .
24. Stofford, S.S., Klein, K.J., Larson, P.A., Firror, R.L., Wylie, P.L., Aplication of Electronic Pressure Control in Capillar Gas Chromatography , 1991: 128-141.
- 25.Schomburg G., Behlau H., Dielmann R., Weeke F.,Husmann, H.Sampling Techniques in capiler GC, Journal of Chromatography , 1977;142: 87-102.
26. Willet, Gas Chromatography Analytical Chemistry by Open Learning ,5<sup>th</sup> Ed., Kealey,D.(Ed). London, 1991: 65-73.
27. Buffington, C.H., Watson, J.T.(Edts), Detectors for Gas Chromatography , Copyright Hewlett Packard Co.,1987:15-30.

28. Scott, R.P.W. General Chromatography, Chrom-Ed Series, Library 4 Science, Full text books online, UK, 2005.
29. Constantin E., Schnell, A. Mass Spectrometry. London: Ellis Horwood Ltd., 1990: 41
30. Suelter, C.H., Watson, J.T. (Eds) Practical Aspects of Gas Chromatography-Mass Spectrometry. New York: John Wiley and Sons Ltd., 1990: 2-42.
31. Chapman, J.R. Practical Organic Mass Spectrometry. London : John Wiley and Sons Ltd., 1985: 27-37.
31. James K. Hardey, "Mass Spectrometry for Chromatographers" , The University of Akron copyright (C) 2004 , ( <http://ull.chemistry.uakron.edu/gcms/> ).
32. Brian M. "Introduction to Mass Spectrometry (MS)" The Chemistry Hypermedia Project, Copyright © 2000 by Brian M. (<http://www.chem.vt.edu/chem-ed/>).
33. Constantin, E., Schnell, A. Mass Spectroscopy, Ellis Horwood Ltd. London, 1990: 41.
34. 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/4252fnl.htm>) .
35. Validation of Analytical Procedures. Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH). Commission of the European Communities, 1996.

## 7.EKLER

Prilocaine HCl' ye ait  $^1\text{H}$  NMR spektrumuPrilocaine HCl' ye ait  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu