

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

(DOKTORA TEZİ)

**MEMANTİNİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ**

ŞERİFE EVRİM TEKKELİ

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. SIDIKA TOKER**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2007

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

08 / 01 / 2008


Prof. Dr. Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Analitik Kimya
Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
Anabilim Dalı : Analitik Kimya Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Şerife Evrim Tekkeli
Tez Başlığı : "Memantinin Tayini İçin Yeni Bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi"
Sınav Yeri : İ.Ü.Eczacılık Fakültesi C Blok Seminer Salonu
Sınav Tarihi : 26 / 12 / 2007

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı _____

1. Prof. Dr. Sıdika Sungur (Tez İzleme Komitesi Üyesi) - (Yıldız Üniv., Fen-Edebiyat Fakültesi)

2. Doç. Dr. Sıdika Toker (Danışman) - (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi)

3. Doç. Dr. Serap Sağlık Aslan (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi)

4. Doç. Dr. Zeynep Aydoğmuş - (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi)

5. Yrd. Doç. Dr. Sevgi Tatar Ulu (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi)



BEYAN

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



Şerife Evrim Tekkeli

İTHAF

Kızım Ada'ya ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Aysel Öztunç'a, özveri ile yardımlarını eksik etmeyen çalışmalarımı bilgi ve tecrübesiyle yönlendiren Tez Danışmanım Doç. Dr. Sıdika Toker'e, yardımları için Anabilim Dalımız Öğretim Görevlilerine, Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma, etik kurulla ilgili konularda bana yön veren Prof. Dr. Öner Süzer'e, her zaman yanımda olan babam Ömer Kepekçi, annem Bige Kepekçi ile kardeşim Verim Kepekçi'ye ve bana daima destek olan eşim Engin Tekkeli'ye teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-779/27122005

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	14
2. GENEL BİLGİLER.....	16
2.1. Memantin Hidroklorür	16
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	16
2.1.2. Farmakolojisi	18
2.1.3. Analiz Yöntemleri.....	19
2.1.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik Analiz Yöntemleri.....	19
2.1.3.2. Gaz Kromatografik Analiz Yöntemleri	20
2.1.3.3. Diğer Yöntemler.....	21
2.2. Fmoc Hakkında Genel Bilgi ve Bu Belirteçle Yapılan Çalışmalar	21
2.2.1. Analiz Yöntemleri.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	28
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	28
3.1.2. Çözeltiler	29
3.2. Aletler ve Diğer Gereçler	31
3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi İle İlgili Çalışmalar.....	32
3.3.1. Türevlendirme için Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi	32
3.3.1.1. Isıtma Derecesi ve Reaksiyon Süresi	32
3.3.1.2. pH.....	32

3.3.1.3. Asetonitril Su Oranı.....	33
3.3.1.4. Belirteç Miktarı	33
3.3.1.5. Glisin Miktarı ve Bekleme Süresi	33
3.3.1.6. Türevin Dayanıklılığı	33
3.3.2. ME'nin HPLC ile Analizi.....	34
3.3.2.1. Hareketli Faz ve Dedektör Dalga Boyları Seçimi.....	34
3.3.2.2. İç Standart Seçimi.....	34
3.3.2.3. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	35
3.3.2.4. ME'nin Plazmadan Ekstre Edilmesi İşlemi	36
3.3.2.5. Plazmada Ölçü Eğrisi Hazırlanması.....	37
3.3.2.6. Geliştirilen Yöntemin Geri Kazanım Oranı.....	38
3.3.2.7. Geliştirilen Yöntemin Tekrarlanabilirliği	38
3.3.2.8. Geliştirilen Yöntemin Tanıma ve Tayin Sınırları	38
3.3.2.9. ME'nin Saklama Sırasındaki Dayanıklılığı.....	38
3.4. Tabletlerde ME Tayini	39
3.4.1. HPLC Yöntemi	39
3.4.2. Kıyas Yöntemi	39
3.5. Plazmada ME Tayini	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar.....	41
4.1.1. ME ile FMOC Arasındaki Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi	41
4.1.1.1. Isıtma ve Reaksiyon Süresi.....	41
4.1.1.2. pH.....	43
4.1.1.3. Asetonitril Su Oranı.....	44
4.1.1.4. Belirteç Miktarı	46
4.1.1.5. Glisin Miktarı ve Bekleme Süresi	48
4.1.1.6. Türevin Dayanıklılığı	48
4.1.2. ME'nin HPLC İle Analizi	48
4.1.2.1. Dedektör Dalga Boyları, Kolon, Hareketli Faz, Kolon Sıcaklığı, Akış Hızı ve Seçilmesi (Kromatografi Koşullarının Belirlenmesi)	49
4.1.2.2. İç Standart Seçimi.....	49
4.1.2.3. Sulu Çözeltide Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi.....	50
4.1.2.4. Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi	52

4.1.2.5. Plazmada Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi.....	55
4.1.2.6. Geliştirilen Yöntemin Geri Kazanım Oranı.....	57
4.1.2.7. Aynı Gün İçinde ve Farklı Günlerde Yapılan Plazma Analizlerinin Tekrarlanabilirliği	57
4.1.2.8. Geliştirilen Yöntemin Tanıma ve Tayin Sınırları	60
4.1.2.9. Saklama Sırasındaki Dayanıklılık	60
4.2. Geliştirilen Yöntemin Tabletlerde ME Tayinine Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemi İle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması.....	60
4.3. Geliştirilen Yöntem ile Plazmada ME Tayini ve Farmakokinetik Parametrelerinin Hesaplanması	62
5. TARTIŞMA	66
KAYNAKLAR	70
ETİK KURUL KARARI.....	76
ÖZGEÇMİŞ.....	77

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Plazmadan ekstraksiyon çalışmalarında denenen çözücü sistemleri.....	37
Tablo 4.1: ME-FMOC türevlerinin çeşitli sıcaklık ve sürelerdeki pik alanları.....	42
Tablo 4.2 :Çeşitli pH larda oluşan ME-FMOC türevlerinin pik alanları.....	43
Tablo 4.3: Değişik asetonitril su oranlarında oluşan ME-FMOC türevlerine ait pik alanları.....	45
Tablo 4.4: Çeşitli mol oranlarına göre türevin pik alanı değişimi.....	47
Tablo 4.5: Oda sıcaklığında gün ışığında ve karanlıkta, +4 °C de karanlıkta bekletilen ME-FMOC türevlerinin stabilitesi.....	48
Tablo 4.6: ME'nin 1-50 ng.mL ⁻¹ konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alan oranı değerleri ve istatistik verileri.....	51
Tablo 4.7: Tablo 4.6 daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler.....	51
Tablo 4.8: En yüksek verim değerleri ve bunların elde edildiği çözücü karışımları.....	53
Tablo 4.9:ME'nin 1-50 ng.mL ⁻¹ konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alan oranı değerleri ve istatistik verileri.....	55
Tablo 4.10: Tablo 9 daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler.....	56
Tablo 4.11: ME'nin plazmadan geri kazanımı	57
Tablo 4.12: Aynı gün içerisinde plazmada yapılan ME analizlerinin tekrarlanabilirliği.....	58
Tablo 4.13: Farklı günlerde plazmada yapılan ME analizlerinin tekrarlanabilirliği.....	59
Tablo 4.14: 10 mg memantin hidroklorür içeren tabletlerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki değerlendirilmesi.....	61
Tablo 4.15: Plazma ME konsantrasyonunun zamana karşı değişimi.....	64
Tablo 4.16: 2 adet Ebixa [®] tablet alımından sonra hesaplanan farmakokinetik parametreler.....	64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: ME'nin kimyasal formülü.....	16
Şekil 2.2: ME'nin çeşitli pH larda UV spektrumu.....	17
Şekil 2.3: ME'nin KBr diskinde alınan FT-IR spektrumu.....	17
Şekil 2.4: FMOC'un kimyasal formülü.....	21
Şekil 4.1: ME ile FMOC arasındaki reaksiyon.....	41
Şekil 4.2: ME-FMOC türevinin oluşumu üzerine sıcaklık ve zamanın etkisi.....	43
Şekil 4.3: ME-FMOC türevinin oluşumu üzerine pH'nın etkisi.....	44
Şekil 4.4: ME-FMOC türevinin oluşumu üzerine asetonitril su oranının etkisi.....	46
Şekil 4.5: ME-FMOC türevinin oluşumu üzerine FMOC/ME mol oranının etkisi.....	47
Şekil 4.6: Hareketli fazın zamana göre içerdiği asetonitril oranları.....	49
Şekil 4.7: Nortriptilinin kimyasal formülü.....	50
Şekil 4.8: ME'nin 1-50 ng.mL ⁻¹ konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisi.....	52
Şekil 4.9: Boş plazma örneğine ait kromatogram.....	53
Şekil 4.10: 50 ng.mL ⁻¹ ME ve 12 ng.mL ⁻¹ İS katılmış plazma örneğine ait kromatogram.....	54
Şekil 4.11 : 20 ng.mL ⁻¹ ME ve 12 ng.mL ⁻¹ İS katılmış plazma örneğine ait kromatogram.....	54
Şekil 4.12: ME'nin 1-50 ng.mL ⁻¹ konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrisi.....	56
Şekil 4.13: Plazmada ME konsantrasyonunun zamana karşı değişimi.....	63
Şekil 4.14: 20 mg tek doz memantin hidroklorür alan sağlıklı gönüllüden 7,5 saat sonra alınan plazma örneğine ait kromatogram.....	65
Şekil 4.15: 20 mg tek doz memantin hidroklorür alan sağlıklı gönüllüden 72 saat sonra alınan plazma örneğine ait kromatogram.....	65

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- NMDA: N-metil-D-aspartat
ME: Memantin Hidroklorür
HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
FMOC: 9-Fluorenilmetil kloroformat
C₁₈: Oktadesil silan
İS: İç standart
RSD: Bağlı standart sapma
C_{maks.} : Maksimum plazma konsantrasyonu
t_{maks.}: Maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşma zamanı
t_{1/2,el}: Eliminasyon yarılanma ömrü
EMA: Avrupa tıbbi ürünler değerlendirme ajansı
UV: Ultraviyole
FT-IR: Fourier dönüşümlü infrared
HCT: Hidroklorotiazid
NAC: 2-Naftoksi asetil klorür
ASC: Antrakinon-2-sülfonil klorür
LC-MS: Kütle spektrometrik dedektörlü likit kromatografisi
GC: Gaz kromatografisi
FID: Alev iyonlaşma dedektörü
GC-MS: Kütle spektrometrik dedektörlü gaz kromatografisi
CZE: Kapiler zon elektroforez
C₈: Oktil
EDDS : Etilendiamin disüksinik asit
OPA: o-Ftalaldehit
FDA: Fotodiyod array
İTK: İnce tabaka kromatografisi
ε: Molar absorptivite değeri
RME: Bağlı ortalama hata
AUC: Eğri altında kalan alan

ÖZET

Tekkeli, Ş.E. Memantin Tayini İçin Yeni Bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2007.

Memantin alzheimer hastalığının tedavisinde N-metil-D-aspartat (NMDA) antagonisti olarak kullanılan yeni bir ilaç etken maddesidir. Bu çalışmada, trisiklik doymuş halka yapısı nedeniyle yeterli ışık absorpsiyonu göstermeyen memantin hidroklorürün (ME) tabletlerde ve plazmada tayini için spektrofotometrik dedektörün kullanıldığı basit ve hassas bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem, ME'nin içerdiği primer amin grubunun 9-fluorenilmetil kloroformat (FMOC) belirteci ile verdiği reaksiyona dayanmaktadır. ME ile FMOC arasındaki reaksiyonun optimum koşulları; pH: 8,5, ısı ve bekletme süresi: 40 C de 20 dakika, FMOC/ME mol oranı: 1000, organik/sulu faz oranı: 4,5 olarak bulunmuştur. Kromatografik ayırma C₁₈ kolonda, 1,5 mL/dak akış hızında asetonitril/10 mM ortofosforik asit (pH 2,4)-%0,1 trietilamin karışımının gradient uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. İç standart (İS) olarak nortriptilin seçilmiş ve dedeksiyon 260 nm uyarma 315 nm emisyon dalga boylarında yapılmıştır. Plazmadan analizlerde örnekler hekzan-izoamil alkol (98:2) karışımı ile ekstre edilmiş ve ekstraksiyon geri kazanımı % 73,27 olarak bulunmuştur. Standart sulu çözeltilerde ve katkılı plazma örneklerinde konsantrasyona karşılık pik alan oranları kullanılarak elde edilen ölçü eğrileri 1-50 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış, plazmadan yapılan analizlerde gün-içi ve günler-arası bağıl standart sapma (RSD) değerleri sırasıyla %1,35-2,70 ve % 0,29-3,39 olarak bulunmuştur. ME'nin tabletlerdeki miktar tayini sulu standart çözeltilere ait doğru denklemi ile hesaplanmış ve sonuçlar firma yöntemi ile elde edilenlerle %95 olasılık düzeyinde kıyaslanmıştır. Yöntemin klinik uygulanabilirliğini test etmek amacıyla, sağlıklı bir gönüllünün 20 mg ilaç almasının ardından ME'nin farmakokinetiği incelenmiş ve ilacın maksimum plazma konsantrasyonu (C_{maks}), bu konsantrasyona ulaşma süresi (t_{maks}) ve eliminasyon yarılanma ömrü (t_{1/2,el}) sırasıyla 41,6 ng/mL, 7,5 ve 69,4 saat olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Memantin, 9-fluorenilmetil kloroformat, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, türetme, plazma

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-779/27122005

ABSTRACT

Tekkeli, Ş.E. A new high performance liquid chromatography method for the determination of memantine. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Ph D Thesis. İstanbul. 2007.

Memantine, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist is a new drug and used for the treatment of Alzheimer's disease. The molecule can not be quantified by spectrophotometric detection therefore it has no adequate light absorption because of tricyclic saturated ring structure. In this study a new, simple and sensitive high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the determination of memantine hydrochloride (ME) in tablets and plasma using spectrofluorimetric detector. The method based on derivatization reaction of the primary amino group of ME with 9-fluorenylmethyl chloroformat (FMOCl). Optimum conditions of the reaction between ME and FMOCl were found to be pH: 8.5; temperature and reaction time: 40 C in 20 minutes, the mol ratio of FMOCl/ME: 1000, the ratio of the organic/aqueous phases is 4.5. Chromatographic separation was carried out using a C₁₈ column at flow rate of 1.5 mL/min by gradient elution with acetonitrile-10 mM orthophosphoric acid (pH 2.4)-%0.1 triethyl amine. Nortriptilin was chosen as an internal standart (IS) and detection was carried out at 260 nm excitation and 315 nm emission wavelengths. Liquid-liquid extraction with hexane-isoamylalcohol (98:2) was used for the analyses of plasma samples by 73.27 % recovery. Calibration curves were prepared in the concentration range of 1-50 ng/mL from the aqueous standards and spiked plasma samples, separately and obtained by plotting the concentration against the peak area ratio. Relative standard deviations (RSD) for the within-day and between-day analyses were found to be 1.35-2.70 and 0.29-3.39 % respectively. The drug content in tablets was calculated from the regression equation constructed with aqueous standard solutions. The tablets were also analysed by the company method. The results obtained from two methods were compared statistically at 95 % confidence level. To check the clinical applicability of the developed method, the pharmacokinetics of ME was investigated in a healthy volunteer after a single oral administration of 20 mg of the drug. Maximum plasma concentration (C_{max}), reached period of C_{max} (t_{max}) and the elimination half-life (t_{1/2,el}) were found to be 41.6 ng/mL, 7.5 and 69.4 h respectively.

Key Words: Memantine, 9-fluorenylmethyl chloroformat, high performance liquid chromatography, derivatization, plasma

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. T-779/27122005

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı, başta hafıza olmak üzere, dikkat, lisan, beceriler, algılama, problem çözme gibi birçok fonksiyonda bozulma yaparak kişiyi entellektüel ve sosyal yeteneklerinde zayıflatan ve günlük hayatını olumsuz etkileyen bir hastalıktır. 65 yaşın üzerindeki kişilerde % 6-10, 85 yaşın üzerindeki kişilerde % 30- 47 gibi yüksek bir görülme sıklığına sahiptir [1].

Memantin, orta ve şiddetli alzheimer hastalığının tedavisinde NMDA antagonisti olarak kullanılan yeni bir ilaç etken maddesidir. Tedavideki etkisini, nöronal fonksiyon bozukluğuna yol açan yükselmiş glutamat düzeylerini bloke etmek yoluyla, intraselüler kalsiyum birikimini azaltarak gösterir. Alzheimer hastalığındaki etkisi Avrupa Tıbbi Ürünler Değerlendirme Ajansı (EMA) tarafından Mayıs 2002’de onaylanmıştır. Ayrıca dopaminerjik etkiyi arttırdığı için yardımcı ilaç olarak parkinson hastalığının tedavisinde ve influenzanın çeşitli suşlarına karşı gösterdiği antiviral aktivitesi sebebiyle influenza tedavisinde de etkilidir [2,3].

Memantin hidroklorür (ME) trisiklik doymuş halka yapısı nedeniyle yeterli ışık absorpsiyonu göstermemektedir. Bu nedenle analiz laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan Ultraviyole (UV)-görünür bölge ya da floresans dedeksiyonlu HPLC yöntemleri ile tayini mümkün olamamaktadır. Bu tip cihazlarla ancak türevlendirildikten sonra tayin edilebilir. Maddenin gerek türevlendirilerek gerekse türevlendirilmeden başka dedeksiyon yöntemleri ile yapılmış çalışmalarının sayısı da çok azdır. Bu yüzden bu ilaç maddesinin farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılardaki analizi için seçici, hassas ve güvenilir yeni yöntemlere ihtiyaç vardır.

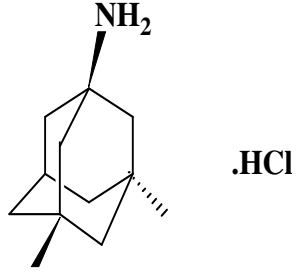
Bu çalışmanın amacı, ME’nin rutin ilaç laboratuvarlarında kolaylıkla analiz edilebilmesi için optik esaslara dayalı dedeksiyon yöntemleri ile tayinine olanak sağlayacak ve biyoyararlanım-biyoeşdeğerlik çalışmalarında kolaylıkla kullanılacak hassasiyete sahip yeni bir HPLC yöntemi geliştirmektir.

Bunun için trisiklik doymuş halkada primer amin sübstitüenti içeren ME'nin, FMOC belirteci ile fluoresans gösteren bir türev oluşturmasından yararlanılarak fluorimetrik dedeksiyona dayanan yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmesi ve bu yöntemin ME'nin farmasötik preparatlardaki ve biyolojik sıvılardaki analizlerine uygulanması düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Memantin Hidroklorür

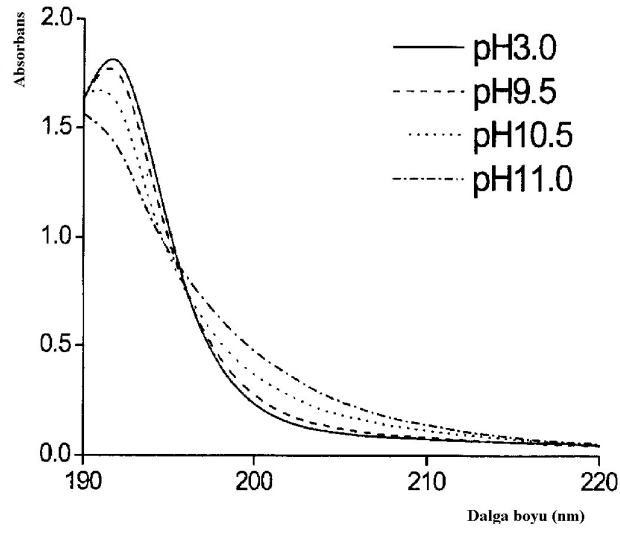
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



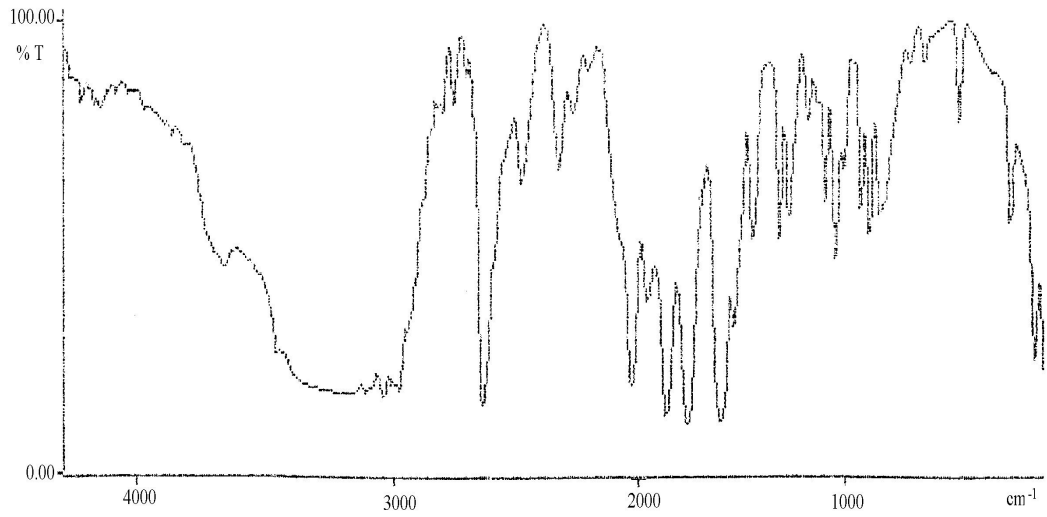
Şekil 2.1: ME'nin kimyasal formülü

Kimyasal adı 1-amino-3,5-dimetiltrisiklo (3,3,1,1) dekan hidroklorür veya 3,5-dimetil-1-adamantanamin hidroklorür veya 1-amino-3,5-dimetiladamantan hidroklorür olarak okunabilir (Şekil 1). Kapalı formülü $C_{12}H_{21}N.HCl$ olan ME'nin molekül ağırlığı 215,77 dir. Beyaz renkte, kokusuz, hafif kristalize bir tozdur. Suda, metanol ve etanolde kolay çözünür. Erime derecesi $258\text{ }^{\circ}C$ ve elementel analizine ait değerler C: % 66,8, H: % 10,28, N: % 6,49, Cl: % 16,43 olarak bildirilmiştir.

ME'nin çeşitli pH larda alınan UV spektrumları Şekil 2.2 de verilmiştir [4]. $50\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda alınmış UV spektrumları maddenin hiçbir pH ortamında direkt spektrofotometrik dedeksiyonunun yapılamayacağını göstermektedir. Maddenin fourier dönüşümlü infrared (FT-IR) spektrumu ise Şekil 2.3 de görülmektedir.



Şekil 2.2: ME'nin çeşitli pH larda UV spektrumu



Şekil 2.3: ME'nin KBr diskinde alınan FT-IR spektrumu

2.1.2. Farmakolojisi

ME orta ve şiddetli alzheimer hastalığının tedavisinde NMDA antagonisti olarak kullanılan yeni bir ilaç etken maddesidir.

Alzheimer hastalığı, kişinin entellektüel ve sosyal yeteneklerinin, günlük fonksiyonlarını etkileyecek şekilde kaybı olan demans durumunun ilerleyerek seyrettiği bir hastalıktır. Bilinci açık bir kişide başta hafıza olmak üzere dikkat, lisan, beceriler, algılama, problem çözme gibi birçok kognitif fonksiyonda bozulma yaparak bireyleri günlük aktivitelerini etkileyecek derecede entellektüel ve sosyal yeteneklerinde yıkıma götürür. Bu hastalık primer dejeneratif bir demans olarak da tanımlanır ve demansın en sık görülen nedenidir. Tüm demansların %50-70'ini oluşturmaktadır. 65 yaşın üzerindeki kişilerde %6-10, 85 yaşın üzerindeki kişilerde %30-47 gibi yüksek bir görülme sıklığına sahiptir [1].

Alzheimer hastalığında görülen nörodejenerasyonun beyinde bulunan glutamik asit seviyelerinin patolojik olarak artması ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir. Demanslı hastaların beyinde artmış olan glutamat seviyelerinin Mg^{+2} iyonlarının NMDA reseptörlerini bloke etmelerini engelleyerek Ca^{+2} iyonlarının hücre içine sürekli akışına neden olduğu ve böylece nöronal dejenerasyonun meydana geldiği düşünülmektedir. Fakat yine de hastalığın etiolojisi tam bilinmediği için ancak semptomatik tedavisi mümkündür [1]. Tedavide esas olarak kolinerjik sistemin etkileri artırılmaya çalışılır. ME de NMDA reseptörlerini non-kompetitif olarak bloke ederek yükselmiş glutamat düzeylerinin neden olduğu intraselüler kalsiyum birikimini azaltarak tedavide etkili olur [2,3,5-7].

ME'nin, alzheimer hastalığının tedavisi dışında başka kullanım alanları da vardır. Parkinson hastalığı tedavisinde dopaminerjik etkiyi arttırdığı için yardımcı ilaç olarak kullanılır. Ayrıca influenzanın çeşitli suşlarına karşı gösterdiği antiviral aktivitesi sebebiyle influenza tedavisinde de etkilidir [2,3,5].

ME'nin biyoyararlanım ve atılımına ait veriler şöyle özetlenebilir. Sağlıklı gönüllüler tarafından 20 mg tek doz ME alımını takiben C_{maks} 22-46 $ng.mL^{-1}$, t_{maks} 3-8 saat arasında gözlemlendiği bildirilmiştir. $t_{1/2,el}$ $64,6 \pm 9,6$ saat olarak bildirilen ME, %100 lük biyoyararlanıma sahiptir (2,3,6,7). İlaç % 45 oranında plazma proteinlerine bağlanır, çok az metabolize olur ve böbrekler yoluyla elimine edilir.

Normal böbrek fonksiyonuna sahip gönüllülerde toplam klirens 170 ml/dak/1,73m² dir ve toplam renal klirensin bir kısmı tübüler sekresyon ile elde edilmiştir [2,8].

ME ve plasebo alan hastalarla yapılmış çalışmalarda sık görülen yan etkiler sırasıyla halüsinasyon, baş dönmesi, baş ağrısı, konfüzyon, yorgunluk, nadir görülen yan etkiler ise anksiyete, hipertoni (kas tonusunun artması), kusma, sistit ve libido artışıdır [6,9,10].

Diğer NMDA antagonistleri, L-dopa ve dopaminerjik antagonistler ME ile birlikte kullanıldığında ilacın etkisini artırır. Antispazmodik ajanlar, dantrolen veya baklofen ile birlikte kullanımı ise ME'nin etkilerini modifiye edebilir ve doz ayarlaması gerektirebilir. Farmakotoksik psikoz nedeni ile ME'nin amantadin ile birlikte kullanımından sakınılmalıdır. ME hidrokloriazid (HCT) veya HCT li herhangi bir kombinasyon ile birlikte kullanılırsa, HCT serum seviyesinde azalma görülebilir [2,9].

2.1.3. Analiz Yöntemleri

2.1.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik Analiz Yöntemleri

ME'nin direkt spektrofotometrik izlenmesi mümkün olmadığı için HPLC ile yapılmış çalışmaları ya türevlendirmeye ya da kütle dedektörle tayine dayanan yöntemlerdir.

Higashi ve Fujii [11], sentetik melanine bağlanan amantadin ve içinde ME'nin de bulunduğu analogların dansil klorürle türevlendirerek HPLC ile tayinini yapmışlardır. Bu çalışmada ilaç maddelerini bazik ortamda ve 30 dakika, 50 °C de ısıtarak türevlendirmişlerdir. Maddelerin türevlerini C₁₈ kolonda, pH değeri NaOH ile 9'a ayarlanmış metanol ve % 0,2'lik asetik asit (9:1; h/h) karışımı hareketli faz ile ayırmış, 370 nm uyarma ve 506 nm emisyon dalga boylarında analiz etmişlerdir. Bu sayede ilaçların yan etki olarak saç, göz, deri gibi dokularda bulunan melanine hangi oranlarda bağlanabileceğini saptamışlardır.

Duh ve arkadaşları [12] ME ve amantadinin plazmadan tayini için türevlendirmeye dayanan bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. 2-naftoksi asetil klorür (NAC) fluoresans belirteci olarak ilk defa bu yöntemde kullanılmıştır. 30 °C de 6 dakika karıştırma ve daha sonra 6 dakika bekleme yapılarak elde edilen naftoksi türevleri C₁₈ kolonda metanol/tetrahidrofurano/su/trietilamin (75:10:15:0,02; h/h) hareketli fazı ile

ayrıldıktan sonra 227 nm uyarma ve 348 nm emisyon dalga boylarında tayin edilmiştir. Yöntemin tanıma sınırını her iki ilaç maddesi için 0,15 $\mu\text{M}/300 \mu\text{L}$ olarak bulmuşlardır.

Suckow ve arkadaşları [13] ME'yi dansil klorür ile türevlendirdikten sonra plazmada HPLC ile tayin etmişlerdir. Türevlendirme bazik ortamda, oda sıcaklığında 45 dakika bekletilerek yapılmıştır. Ardından C_{18} kolonda asetonitril, 0,025 M fosfat tamponu, o-fosforik asit ve bütül amin (73:27:0,5:0,6; h/h)'den oluşan hareketli faz sisteminde izokratik olarak ayrılma sağlanmış, 235 nm uyarma ve 470 nm emisyon dalga boylarında dedeksiyon yapılmıştır. Ayrıca, bu çalışmada İS olarak amantadin kullanılmış, çalışılan konsantrasyon aralığı 3-400 ng.mL^{-1} olarak belirlenmiştir.

Shuangjin ve arkadaşları [14] da amantadin, rimantadin ve ME'nin tavşan plazmasında tayini için antraknon-2-sülfonil klorür (ASC) ile türevlendirmeye dayanan yeni bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Oda sıcaklığında 10 dakikada gerçekleşen reaksiyonun ürünlerini C_{18} kolonda metanol/su (85:15; h/h) ile ayırdıktan sonra UV dedektör ile 256 nm de tayin etmişlerdir. Tanıma sınırını 20 ng.mL^{-1} , tayin sınırını ise 50 ng.mL^{-1} olarak bulmuşlardır.

Koeberle ve arkadaşları çeşitli melaninlere bağlanmış ME'nin tayinini kütle spektrometrik dedektörlü likit kromatografisi (LC-MS) ile yapmışlardır [15]. Bu yöntemde ME için doğrusal aralık 0,1-1200 nM olarak bulunmuştur.

Almeida ve arkadaşları [16] da ME'nin plazmada tayini için yeni bir LC-MS yöntemi geliştirmişler ve bu yöntemi 30 sağlıklı gönüllü üzerinde yaptıkları biyoeşdeğerlik çalışmasında kullanmışlardır. Bu çalışmada İS olarak amantadin kullanılmış ve yöntemin tayin sınırı 0,1 ng.mL^{-1} olarak bulunmuştur.

2.1.3.2. Gaz Kromatografik Analiz Yöntemleri

Wesemann ve arkadaşları [17], ME'nin gaz kromatografisiyle (GC) beyin ve karaciğer dokularında tayinini yapmışlardır. Bu çalışmada alev iyonlaşma dedektörü (FID) kullanılmış ve tayin sınırı 1 g dokuda 60 ng olarak belirlenmiştir. Yine Wesemann ve arkadaşlarına [18] ait bir çalışmada çeşitli dokularda kütle spektrometrik dedektörlü gaz kromatografisi (GC-MS) ile ME'nin analizi yapılmıştır. Çalışmada doğrusal aralık 15-300 ng.mL^{-1} olarak bulunmuştur.

Freudenthaler ve arkadaşları [19], GC-MS ile plazma ve idrarda ME'nin tayinini yapmışlardır. Yöntemin uygulanabilir olduğu konsantrasyon aralığı plazma için 8,4-267,0 ng.mL⁻¹, idrar için 0,08 µg.mL⁻¹ olarak belirlenmiştir.

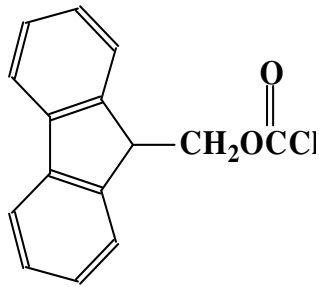
Leis ve arkadaşları [20] da yine GC-MS kullanarak ME'nin plazmada tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. Katılmış plazma örneklerinde memantin doğrusal olduğu konsantrasyon aralığını 0,117-30,0 ng ve tanıma sınırını 10 pg.mL⁻¹ olarak bulmuşlardır.

2.1.3.3. Diğer Yöntemler

Reichova ve arkadaşları [4] ME, rimantadin ve amantadinden oluşan adamantan türevlerinin birarada kapiler zon elektroforez (CZE) tekniğiyle tayinini gerçekleştirmişlerdir. Amantadinden sentezlenen diğer türevlerin saflık tayinini yapmak amacıyla geliştirilen yöntemde türevlerin çok yakın olan elektroforetik mobilitelerinde fark yaratmak için bunların siklodektrinle yaptıkları komplekslerden yararlanmışlardır. Örnekler hidrodinamik enjeksiyonla kapillere verilmiştir. Siklodekstrin ilavesi yapılmış tampona 20 kV gerilim uygulanması sonucu farklı zonlar oluşmuştur. Maddelerin izlenmesi 210 nm de indirekt olarak tampona 4-metilbenzilamin ilavesiyle gerçekleştirilmiştir. Yöntemin ME'ye ait tanıma sınırı 0,35 µg.mL⁻¹ dir.

2.2. Fmoc Hakkında Genel Bilgi ve Bu Belirteçle Yapılan Çalışmalar

Fmoc beyaz, kokusuz, hafif kristalize asetonitril ve asetonunda kolaylıkla çözünebilen bir tozdur. Molekül ağırlığı 258,70, kapalı formülü C₁₅H₁₁ClO₂ dir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Fmoc'un kimyasal formülü

Fmoc primer ve sekonder aminlerle genellikle kolon öncesi türevlendirmelerde kullanılarak birçok maddenin spektrofotometrik ve fluorimetrik dedeksiyonuna imkan sağlar.

2.2.1. Analiz Yöntemleri

FMOC ile yapılan HPLC çalışmalarında maddelerin tayini çoğunlukla fluorimetrik yapılmakla beraber az sayıda spektrofotometrik dedeksiyonlu tayine de rastlanmıştır.

Fluorimetrik dedektörle yapılan çalışmalar şunlardır:

Ptacek ve arkadaşları [21] idrarda alendronat adlı ilaç etken maddesinin tayini için geliştirdikleri yöntemde FMOC ile türevlendirme yapmışlardır. HPLC ile yapılan tayinde, elüsyon C₁₈ kolonda, asetonitril, metanol, sitrat-pirofosfat tamponundan oluşan bir hareketli faz sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon için 260 nm uyarma, 310 nm emisyon dalga boyları kullanılmıştır. Türevlendirme işleminin bazik ortamda, bekleme ve ısıtma gibi işlemler olmaksızın yapıldığı ve yöntemin tayin sınırının 3,5 ng.mL⁻¹ olduğu bildirilmiştir.

Aymard ve arkadaşları [22] efedrin ve metaboliti norefedrinin plazmada tayini için bildirdikleri bir çalışmada FMOC ile türevlendirme yapmışlardır. Plazma örnekleri baziklendirmenin ardından iki defa isopropanol, bütil metil eter karışımı ile ekstre edilmiştir. Daha sonra sulu fazda bazik ortamda FMOC ile reaksiyona giren maddeler C₁₈ kolonda, asetonitril-su (52:48) karışımında ayrılmış ve 264 nm uyarma, 313 nm emisyon dalga boylarında tayin edilmişlerdir. Yöntemin tayin sınırı efedrin için, 2 ng.mL⁻¹, norefedrin için 5 ng.mL⁻¹ olarak belirtilmiştir.

Bellagamba ve arkadaşları [23] sütte bulunan spermidin, spermin, cadaverin gibi bazı poliaminleri tayin etmek amacıyla bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Ekstre edilen poliaminler bazik ortamda, FMOC ile türevlendirildikten sonra, türevler C₁₈ kolonda su-asetonitril hareketli faz sisteminde ayrılmış ve 264 nm uyarma, 313 nm emisyon dalga boylarında tayin edilmiştir.

Kim ve arkadaşları [24] tarafından Morus alba bitkisinin yapraklarından ekstre edilen 1-deoksijirimisin adlı alkaloidin tayini için geliştirilen yöntemde madde, bazik ortamda 20 °C de 20 dakika bekletme sonucunda FMOC ile türevlendirilmiş, belirteç fazlasının etkisini önlemek için ortama glisin ilave edildikten sonra maddeler C₁₈ kolonda elüe edilmiş ve fluorimetrik olarak tayin edilmişlerdir.

Torano ve Guchelaar'a [25] ait bir çalışmada katılmış serum örneklerinde eritromisin, roksitromisin, azitromisin ve klaritromisin antibiyotiklerinin miktarları

belirlenmiştir. Serumdan ekstre edilen maddeler FMOC ile bazik ortamda 40°C de 40 dakika bekleme sonucu türevlendirilmiştir. Oluşan türevler 50°C sıcaklıkta, C₁₈ kolonda ayrılmış ve fluorimetrik dedektörle tayin edilmiştir.

Yuh ve arkadaşları [26] tavşanlar üzerinde geliştirdikleri bir yöntemde kandaki, galaktoz, glukoz, laktoz miktarını HPLC ile tayin etmişlerdir. Türevlendirme şekerlerin bazik ortamda, 65°C de 3 saat bekletilmeleri sonucu yapılmıştır. Geliştirilen bu yöntem daha sonra tavşanlarda in vivo olarak galaktozun farmakokinetiğinin araştırılması için kullanılmıştır.

Bahrami ve arkadaşları [27] antiepileptik bir ilaç etken maddesi olan topiramatin serumda tayini için FMOC ile bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada türevlendirme; pH 7,8 borat tamponuyla, asetonitril su oranının 5:1 olduğu ortamda yapılmış ve reaksiyonun sonunda ortama glisin katılmıştır. Türevler 62°C'de, CN kolonda asetonitril-pH 2,2 fosfat tamponu-trietilamin sisteminde ayrılmış, 260 nm uyarma ve 315 nm emisyon dalga boylarında tayin edilmiştir. Doğrusal konsantrasyon aralığı 20-5000 ng.mL⁻¹ olan bu yöntemde İS olarak amantadin kullanılmıştır. Bahrami ve Kiani'nin [28] diğer bir antiepileptik etkili madde olan gabapentinin serumda analizi için geliştirdikleri yöntemde ise, serumdan diklorometan-propanol ile yapılan ekstraksiyonun ardından pH 7 borat tamponlu ortamda 60 °C de 10 dakika bekletilerek FMOC ile türevlendirme yapılmıştır. Bu çalışmada da reaksiyondan sonra ortama glisin katılmıştır. Daha sonra C₁₈ kolonda, metanol-fosfat tamponu-trietilaminden oluşan hareketli faz ile elüsyon gerçekleştirilmiştir. İS olarak azitromisin kullanılmıştır.

Tandy ve arkadaşlarının [29] geliştirdikleri bir yöntemde, özellikle deterjanların içinde çok rastlanan, genelde koruyucu olarak diğer bazı ticari ürünlerde de bulunan etilendiamin disüksinik asit (EDDS) maddesi FMOC ile türevlendirilerek fluorimetrik dedektörlü HPLC ile tayin edilmiştir. Çalışmanın amacı toprakta, suda ve bitkilerde eser miktarda bulunabilecek olan EDDS yi tayin etmektir.

Kazachov ve Yu [30] sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, organizmada bazı patolojik durumlarda metilglioksal maddesinin ortaya çıkmasını sağlayan aminoasetonun miktarını tayin etmişlerdir. Sıçanların karaciğer dokusundan alınan numunelerden homojenizasyon, iyon değiştirme kromatografisi ve katı faz ekstraksiyonu gibi birtakım işlemlerden sonra aminoaseton izole edilmiş ve miktarı FMOC ile türevlendirmeyi takiben HPLC ile tayin edilmiştir. Türevlendirme pH 10

borat tamponlu ortamda yapılmıştır. Belirtecin fazlası hekzanla ekstraksiyon sonucu organik faza geçirilerek uzaklaştırılmış ve ardından fluorimetrik dedektörlü, ters faz HPLC ile tayin gerçekleştirilmiştir.

Hutson ve arkadaşları [31] sıçanların akciğer dokusunda astıma bağlı olarak artan hidrokspirolinin miktarını tayin etmek için aynı anda hem o-ftalaldehit (OPA), hem de FMOC ile kolon öncesi türevlendirme yapmışlardır. Türevlendirmenin ardından etil eterle ekstraksiyon yapılmış, sulu faz HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Hidrokspirolinin OPA ve FMOC türevleri 265 nm uyarma, 315 nm emisyon dalga boylarında tayin edilmiştir.

Bahrami ve Mohammadi [32] insan serumunda azitromisini tayin ettikleri otomatikleştirilmiş bir analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Serumdan ekstre edilen ilaç maddesi, reaksiyonu optimize etmek için kullanılan tampon çözelti ve türevlendirme reaktifi FMOC uygun ısıya ayarlanmış bir reaktif kolonunda peristaltik pompa yardımıyla ayrı ayrı biraraya getirilmiş ve ardından türev, pompalar ile C₈ kolona ulaştırılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril, fosfat tamponu ve trietilaminin kullanıldığı yöntemde tayin fluorimerik olarak yapılmıştır. FMOC ile yapılan türevlendirme reaksiyonları genellikle uzun sürdüğünden ve ısı, bekleme, reaktif miktarı gibi koşullar reaksiyon için çok belirleyici olduğundan bu reaktifi otomatikleştirilmiş bir sistem içinde kullanmak reaksiyonu daha iyi kontrol altında tutabilme bakımından oldukça yararlı olmuştur.

Pericas ve arkadaşları [33] amfetamin, metamfetamin ve 3,4 metilendioksi metamfetamin maddelerinin idrarda tayinini yapmışlardır. Bu çalışmada FMOC ile yapılan türevlendirmenin ardından katı faz mikroekstraksiyon yöntemiyle türevler izole edilmiş ve bu sayede ppm düzeyinde tayin gerçekleştirilmiştir. Fluorimetrik detektörün kullanıldığı çalışmada, mikroekstraksiyon oldukça sade kromatogramlar elde edilmesini sağlamış ve verimi arttırmıştır. Yine Pericas ve arkadaşları [34] tarafından geliştirilen bir yöntemde yeraltı sularındaki dimetilamin miktarı FMOC ile türevlendirilerek HPLC de tayin edilmiştir. Ayırma C₁₈ kolonda, asetonitril, asetat tamponundan (70:30) oluşan hareketli faz ile gerçekleştirilmiş ve tayin 265 nm uyarma, 310 nm emisyon dalga boylarında yapılmıştır.

Stead ve Richards [35] gentamisin sülfatın bakteri kültür ortamı, plazma gibi biyolojik matrikslerdeki miktarını tayin etmişlerdir. Öncelikle biyolojik matrikslerden

gentamisin sülfatı karboksipropil bağlı silika katı faz ekstraksiyon kartuşları ile izole etmişler ardından FMOC ile türevlendirmeyi takiben HPLC de fluorimetrik dedektörle tayin etmişlerdir.

Nedelkosta ve Low [36] sularda ve çimenlerde bulunabilen glifosat adlı herbisit maddenin miktarını tayin ettikleri yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde türevlendirme bazik ortamda 30 dakikada 20-30°C arasında beklemeyle gerçekleştirilmiştir. Oluşan FMOC-glifosat türevi polimerik amino kolonda asetonitril ve sudan oluşan hareketli fazla elüe edilmiş ve tayin fluorimetrik dedektörle yapılmıştır.

Llasera ve arkadaşları [37] matriks katı faz dağılma ekstraksiyonu tekniği ile domatesten glifosat ve ana metaboliti aminometilfosfonik asiti izole ettikten sonra FMOC ile türevlendirmişler ve ardından HPLC ile tayin etmişlerdir. Matriks katı faz dağılma ekstraksiyonu tekniğine göre numune ezilmiş, NH₂ – bağlı silika ile karıştırılarak homojenize edilmiş ve bu homojen yapı bir polipropilen kartuşa yerleştirilerek önce deiyonize suyla birinci fraksiyon, ardından NaH₂PO₄ ile ikinci fraksiyon toplanmıştır. Birinci fraksiyondan aminometilfosfonik asit, ikinci fraksiyondan ise glifosat elde edilmiştir. Bu fraksiyonları saflaştırmak için anyon değiştirici reçineler kullanılmasının ardından maddeler bazik ortamda 30 dakika, oda sıcaklığında bekletilerek FMOC ile türevlendirilmiş, belirtecin fazlası etil etere ekstre edilmiştir. Daha sonra maddeler C₁₈ kolonda asetonitril fosfat tamponundan oluşan hareketli faz ile gradient bir sistemde ayrılmışlar ve fluorimetrik dedektörle tayin edilmişlerdir.

Staffeldt ve arkadaşları [38] karboksimetilsistein, metilsistein ve N-asetilkarboksimetil sisteinin idrar ve plazmada analizini FMOC ile türevlendirmenin ardından fluorimetrik dedektörlü ters faz HPLC ile gerçekleştirmişlerdir.

Ekegren ve Trolin [39] poliaminlerden spermidin, spermin ve putreskinin serebrospinal sıvı, serebellum ve iskelet kaslarından HPLC ile tayinini yapmışlardır. Yöntemin otopsi çalışmalarında kullanılabileceğini belirten yazarlar, FMOC ile pH 9 borat tamponlu ortamda, bekleme olmaksızın yaptıkları türevlendirmenin ardından reaksiyonu durdurmak için ortama glisin ilave etmişlerdir. Türevler C₈ kolona enjekte edildikten sonra 35 dakika içinde ayrılmış ve 210 nm uyarma, 360 nm emisyon dalga boylarında tayin edilmiştir.

Sultana ve arkadaşları [40] keçiler üzerinde yaptıkları bir çalışmada geviş getiren hayvanların rumen sıvısındaki arginin ve benzer bazı proteinlerin HPLC ile tayinini yapmışlardır. Beslenmeden 1 saat sonra alınan numuneler pH 9 borat tamponlu ortamda FMOC ile türevlendirilmiş, ardından heptan ile ekstraksiyon yapılmış ve sulu faz enjekte edilmiştir. C₁₈ kolonda asetonitril-fosfat tamponu-tetrahidrofurandan oluşan hareketli faz sisteminde izokratik elüsyonla 33 dakika içinde ayrılan proteinler, 263 nm uyarma, 611 nm emisyon dalga boylarında tayin edilmişlerdir. Geliştirilen bu yöntemin birtakım hastalıkların teşhisinde kullanılması amaçlanmıştır.

Liu ve arkadaşları [41] vertilmisin adlı antibiyotik maddenin sıçan plazmasında tayinini sağlayan yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu HPLC yönteminde İS olarak netilmisin kullanılmıştır. Kromatografi aşamasından önce plazmadan ekstre edilen maddeler pH 8 borat tamponu ve FMOC çözeltisi ilavesiyle 15 dakika bekleme sonunda türevlendirilmiş, reaksiyonun hemen ardından glisin çözeltisi ilave edilmiştir. Maddeler C₁₈ kolonda asetonitril-su (95:5) hareketli fazı ile elüe edilmiş ve fluorimetrik dedektörle tayin edilmiştir.

Schwarz ve arkadaşları [42] plazmadaki tüm aminoasitleri tayin ettikleri bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde primer aminleri OPA ile türevlendirip fotodiodarray (FDA) dedektörle, sekonder aminleri FMOC ile türevlendirip fluorimetrik dedektörle tayin etmişlerdir. FMOC ile oluşan türevler 40 °C deki C₁₈ kolonda ayrılarak 266 nm uyarma, 305 nm emisyon dalga boylarında tayin edilmiştir. Çalışmada İS olarak S-karboksimetil-L-sistein kullanılmıştır.

Wheal ve arkadaşları [43] bitki köklerinden salınan ve topraktan demir iyonlarını bitkiye kazandırmaya yarayan fitometalofor denen bazı maddelerin (mugineik asit, hidroksi mugineik asit, nikotinamin gibi) tayinini yapabilmek için bir yöntem geliştirmişlerdir. Arpa köklerinden alınan salgılar üzerinde yapılan çalışmada maddeler FMOC ile pH 10 borat tamponlu ortamda türevlendirmenin ardından C₁₈ kolonda asetat tamponu-su-asetonitril-metanolden oluşan hareketli faz yardımıyla gradient elüsyonla ayrılmışlar ve 266 nm uyarma, 305 nm emisyon dalga boylarında pmol düzeyine kadar tayin edilmişlerdir.

Spektrofotometrik dedektörle yapılan çalışmalar şunlardır:

Zhu arkadaşları [44] tarafından yapılan bir çalışmada, doğada en sık karşılaşılan aminopolisakkarit olan kitinin saflığı, yapısındaki glukozaminin FMOC ile türevlendirildikten sonra HPLC ile tayin edilmesi sonucu saptanmıştır. Suda ve birçok çözücüde çözünmeyen kitin, asit ile hidroliz edilmiş, bu hidroliz sonucu açığa çıkan glukozamin pH 7 borat tamponlu ortamda, 20 °C de 30 dakika bekletilerek türevlendirilmiş, oluşan türev C₈ kolonda, asetonitril-su karışımı hareketli faz ile ayrıldıktan sonra 254 nm dalga boyunda tayin edilmiştir.

Liang ve arkadaşlarının [45] bir çalışmasında da sülfametazinin biyolojik sıvılarda ve dokularda FMOC ile bazik ortamda 30 dakika bekleme sonucu türevlendirilmesini takiben 254 nm dalga boyunda spektrofotometrik dedektör yardımıyla ters faz HPLC ile tayini yapılmıştır.

Hernandez ve arkadaşları [46] katı faz ekstraksiyonu kartuşlarının (C₁₈) içinde gerçekleştirdikleri reaksiyonda eser miktarda propilamin, dietilamin, dietanolamin, glutamik asit, p-aminobenzoik asit, β-fenilettilamin maddelerini FMOC ile türevlendirmişler, daha sonra ekstre edilen türevleri HPLC'ye enjekte etmişlerdir. Türevlendirme sırasıyla madde çözeltileri, reaktif çözeltisi ve bazik tamponun kartuşa ilavesiyle yapılmış, türevler asetonitril-su karışımıyla ekstre edilmiştir. Ayırmada C₁₈ kolon ve asetonitril-su karışımından oluşan hareketli faz ve tayinde FDA dedektör kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem katılmış idrar örneklerinde β-fenilettilamin tayinine uygulanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Çalışmada aşağıdaki kimyasal maddeler ve çözücüler kullanılmıştır:

ME¹,
Ebixa® tablet²,
Nortriptilin¹,
FMOC¹,
Borik asit (analitik saflıkta)³,
Potasyum klorür (analitik saflıkta)³,
Sodyum hidroksit (analitik saflıkta)³,
Susuz sodyum sülfat (analitik saflıkta)³,
Glisin (analitik saflıkta)³,
Kristal viyole (analitik saflıkta)¹,
Asetonitril (HPLC saflığında)³,
Trietilamin (HPLC saflığında)¹,
Ortofosforik asit (% 85 ağı/ağı) (analitik saflıkta)³,
n-hekzan (analitik saflıkta)³,
İsoamil alkol (analitik saflıkta)³
Ultra saf su (HPLC saflığında),
Formik asit (analitik saflıkta)¹,
Asetik asit anhidrit (analitik saflıkta)¹,
Perklorik asit (analitik saflıkta)³,
Glasial asetik asit (analitik saflıkta)³

¹ Sigma, St. Louis, MO, USA

² Lundbeck İlaç Tic. Ltd. Şti.

³ Merck, E. Merck A.G. Darmstadt, Almanya

3.1.2. Çözeltiler

1. ME Çözeltileri

Stok çözelti:

5 mg memantine hidroklorür tam olarak tartıldı, 50 mL lik balonjojede distile su ile çözüldürüldü ve hacmine tamamlandı (0,1 mg.mL⁻¹).

Stok çözeltinin su ile seyreltilmesi sonucu hazırlanan standart çözeltiler:

Türevlendirme reaksiyonunun ve HPLC koşullarının belirlenmesinde, sulu çözelti ve plazma ölçü eğrilerinin hazırlanmasında konsantrasyonu 1,0 µg.mL⁻¹, 0,5 µg.mL⁻¹ ve 0,05 µg.mL⁻¹ olan standart çözeltiler kullanıldı.

2. FMOC Çözeltileri

Türevlendirme reaksiyonunun optimum şartlarının ve kromatografik koşulların belirlenmesinde, sulu çözeltide ve plazmada ölçü eğrilerinin oluşturulmasında, tablet çözeltisi ve plazma örnekleriyle yapılan analizlerde günlük olarak asetonitril ile hazırlanmış 0,5 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda FMOC çözeltileri kullanıldı.

3. Nortriptilin Çözeltisi

Ölçü eğrilerinin oluşturulmasında, tablet çözeltisi ve plazma örnekleriyle yapılan analizlerde nortriptilin suda çözüldürülmesi ile hazırlanmış 0,5 µg.mL⁻¹ konsantrasyondaki çözeltileri kullanıldı.

4. Borat Tamponu Çözeltileri

pH 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 ve 10 olan 0,1 N tampon çözeltileri hazırlamak için 0,62 g borik asit ve 0,75 g potasyum klorür 50 mL suda çözüldürüldü, gerekli miktarda 0,1 M NaOH ilavesi ile çözeltinin pH'sı istenen değere getirildi ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı [47]. Bu çözeltiler türevlendirme reaksiyonu için en uygun pH değeri, ısıtma derecesi, reaksiyon süresi ve asetonitril:su oranının bulunması çalışmalarında kullanıldı. Belirteç miktarı ve glisin miktarı çalışmalarında katı maddelerin 2 kat fazla tartılmasıyla hazırlanmış 0,2 N tampon çözeltiler, ölçü eğrilerinin hazırlanması, plazma ve tablette yapılan analizlerde ise katı maddelerin 4 kat fazla tartılmasıyla hazırlanmış 0,4 N tampon çözeltiler kullanıldı.

5. Glisin Çözeltisi:

Isıtma derecesi ve reaksiyon süresi, pH, asetonitril:su oranı denemelerinde 4 mg.mL^{-1} , belirteç miktarı denemesinde $4,6 \text{ mg.mL}^{-1}$, glisin miktarı çalışmalarında 12 mg.mL^{-1} , türev stabilitesi çalışmasında 6 mg.mL^{-1} , diğer tüm çalışmalarda 14 mg.mL^{-1} konsantrasyonlardaki glisin sudaki çözeltileri kullanıldı. Uygun konsantrasyondaki glisin çözeltileri haftalık olarak hazırlandı.

6. Ortofosforik asit Çözeltisi:

$1,71 \text{ kg.L}^{-1}$ yoğunluğunda %85 (ağ./ağ)'lik o-fosforik asit çözeltisinden $700 \mu\text{L}$ alındı ve hacim 1000 mL ' ye suyla tamamlandı.

7. Perklorik Asit Çözeltisi:

Kıyas yöntemi çalışmalarında perklorik asidin yaklaşık $0,1 \text{ M}$ çözeltisiyle çalışıldı. Yoğunluğu $1,7$ olan % 70 (ağ./hac.) perklorik asidin $8,5 \text{ mL}$ ' si 500 mL glasial asetik asitle seyreltildi, buna 30 mL asetik anhidrit ilave edildi ve glasial asetik asitle 1 litreye tamamlandı. Birgün bekletildikten sonra çözeltinin faktörü tayin edildi [48].

Faktör tayini için 700 mg kadar potasyum hidrojen ftalat tartıldı, 50 mL glasial asetik asitte çözüldü ve endikatör olarak 2 damla kristal viyole çözeltisi ilave edildi. Çözeltinin rengi mordan yeşile dönünceye kadar yaklaşık $0,1 \text{ M}$ perklorik asit çözeltisi ile titre edildi. Ayrıca, glasial asetik asit ve endikatörle bir de boş deneme yapıldı ve böylelikle glasial asetik asit tarafından harcanan perklorik asit hacmi bulundu. Bu hacim esas titrasyonda harcanan perklorik asit hacminden çıkarılarak hesap yapıldı.

8. Kristal Viyole Çözeltisi:

Kıyas yönteminde $0,1 \text{ g}$, $0,1 \text{ M}$ perklorik asit çözeltisi ayarlanmasında $0,5 \text{ g}$ kristal viyolenin 100 mL glasial asetik asitte çözülerek hazırlanmış çözeltileri endikatör olarak kullanıldı.

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

1.HPLC aleti (Shimadzu RF-10 AXL)

CBM 10 A-Sistem kontrol ünitesi

LC 10 AT Pompa

RF-10AXL Fluorimetrik detektör

DGU-2A Helyumlu gaz giderme ünitesi

Ön kolon ve analitik kolon (C₁₈, 5µm, 250 x 4,6 mm I.D. Waters)

CTO-10A Kolon fırını

2. FT-IR Spektrometresi (Perkin-Elmer)

3.UV lamba

4.Ultra saf su cihazı (Young Lin Instrument, Kore)

5. Silikajel plak (Merck, Silikajel 60, 20 x 20 cm)

6. C₁₈ plak (Merck, RP-18, 0.25 mm, 5 x 10 cm)

7. pH metre (WTW pH 526)

8. Girdap karıştırıcı (Stuart Scientific Autovortex SA6)

9. Su banyosu (Memmert)

10. Isıtıcı blok (Lab-line Multi Blok Heater)

11.Teraziler (Mettler H20 ve Mettler Toledo AB-204)

12.Otomatik pipetler (Eppendorf 20-200 µL, Brand 10-100 µL ve 100-1000µL)

13.Santrifüj (Janetzki T5 ve Hettich EBA 8S)

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

15. Balonjojeler (İsolab 5, 10, 25 ve 50 mL)

16. Dereceli ve transfer pipetler (İsolab)

17. 50 mL lik büret

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

3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile ilgili Çalışmalar

3.3.1. Türevlendirme için Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi

Yapılan literatür incelemelerinde Fmoc ile alifatik amin grubu içeren maddeler arasındaki reaksiyonun alkali ortamda, ısıtılarak, belli bir su asetonitril oranında yürüdüğü, reaksiyonun durdurulması için bir aminoasit çözeltisi ya da ekstraksiyon işlemi kullanıldığı görülmüştür. Bu bilgilerden yola çıkarak ME'nin Fmoc ile arasındaki reaksiyonun kantitatif olarak hangi koşullarda yürüdüğünü saptamak amacıyla yapılan denemeler aşağıda belirtilmiştir.

3.3.1.1. Isıtma Derecesi ve Reaksiyon Süresi

0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki ME çözeltisinden 100'er μL kapaklı cam tüplere alındı. Üzerlerine 100'er μL pH 9 0,1 N borat tamponu, 100'er μL 0,5 mg.mL^{-1} Fmoc çözeltisi ve 500'er μL asetonitril ilave edilerek oda sıcaklığında, 30, 40, 50 ve 60 °C sıcaklıklarda 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ve 60 dakika süreyle bekletildi. Soğutulduktan sonra tüplere 200'er μL 4 mg.mL^{-1} glisin çözeltisi ilave edildi ve 5'er dakika bekletildikten sonra her bir karışımın 20 μL 'si HPLC aletine enjekte edilerek analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.1. de verilmiştir.

3.3.1.2. pH

0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki ME çözeltisinden 100'er μL kapaklı cam tüplere alındı. Üzerlerine 100'er μL pH değeri 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 olan 0,1 N borat tamponu çözeltilerinden, 100'er μL 0,5 mg.mL^{-1} Fmoc çözeltisi ve 500'er μL asetonitril ilave edildi. 40 °C de 20 dakika ısıtıldı ve çalışmaya Bölüm 3.3.1.1. deki gibi devam edildi. Alınan sonuçlar Bölüm 4.1.1.2. de verilmiştir.

3.3.1.3. Asetonitril Su Oranı

1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki ME çözeltisinden 50'şer μL kapaklı cam tüplere alındı. 50'şer μL pH değeri 8,5 olan 0,2 N borat tamponu çözeltisi, 100'er μL 0,5 mg.mL^{-1} FMOC çözeltisi ve her bir asetonitril su oranı 0,5, 1, 2, 3, 4, 4,5 ve 5 olacak şekilde değişen hacimlerde, toplam 600 μL su ve asetonitril ilave edildi. Çalışmaya Bölüm 3.3.1.1. deki gibi devam edildi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.1.1.3. de verilmiştir.

3.3.1.4. Belirteç Miktarı

0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki ME içeren çözeltiden 100'er μL lik hacimler üzerine 50'şer μL pH değeri 8,5 olan 0,2 N borat tamponu çözeltisi ve her bir tüpe 12,5-187,5 μL arasında değişen hacimlerde FMOC ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) çözeltisi ilave edildi. Çözeltilerin hacimleri asetonitril ile 675 μL 'ye tamamlandı. Reaksiyon sonunda soğutulan tüplere 175'er μL 4,6 mg.mL^{-1} glisin çözeltisi ilave edildi ve 5'er dakika bekletildi. Sürenin sonunda her bir karışımın 20 μL ' si HPLC aletine enjekte edilerek analiz edildi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.1.1.4 de verilmiştir.

3.3.1.5. Glisin Miktarı ve Bekleme Süresi

0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki ME içeren çözeltiden 100'er μL kapaklı cam tüplere alındı. 50'şer μL pH değeri 8,5 olan 0,2 N borat tamponu çözeltilerinden, 125'er μL 0,5 mg.mL^{-1} FMOC çözeltisi ve 550'şer μL asetonitril ilave edildi. Soğutulduktan sonra tüplere 10-175 μL arasında değişen hacimlerde 12 mg.mL^{-1} glisin çözeltisinden ilave edildi, toplam glisin çözeltisi hacmi su ile 175 μL 'ye tamamlandı ve 1-10 dakika bekletildi. Bekleme sonunda her bir karışımın 20 μL 'si HPLC aletine enjekte edilerek analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.5. de verilmiştir.

3.3.1.6. Türevin Dayanıklılığı

0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki ME içeren çözeltiden 100'er μL alındı. 50'şer μL pH değeri 8,5 olan 0,2 N borat tamponu çözeltilerinden, 125'er μL 0,5 mg.mL^{-1} FMOC çözeltisi ve 550'şer μL asetonitril ilave edildi. Soğutulan tüplere 175'er μL 6 mg.mL^{-1} glisin çözeltisinden eklendi. Bu şekilde 5 paralel deneme yapıldı. Elde edilen türevler oda sıcaklığında gün ışığında ve karanlıkta, +4 °C karanlıkta 12, 24, 48, 72, 96 saat bekletildikten sonra HPLC aletine enjekte edilerek analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.6. da verilmiştir.

3.3.2. ME'nin HPLC ile Analizi

3.3.2.1. Hareketli Faz ve Dedektör Dalga Boyları Seçimi

Hareketli faz seçimi için ince tabaka kromatografisi (İTK) ile yapılan ön denemelerde, reaksiyon ürünü, silikajel ve C₁₈ kaplı hazır plaklarda değişik hareketli faz sistemleri kullanılarak kromatografiye edildi. Çeşitli oranlarda hazırlanan metanol-su, asetonitril-su, metanol-10mM fosfat tamponu (pH 2,2), asetonitril-10 mM fosfat tamponu (pH 2,2), asetonitril-10 mM ortofosforik asit (pH 2,4) karışımları ile denemeler yapıldı.

İTK ile yapılan denemeler göz önüne alınarak HPLC çalışmaları, bazı ters faz kolonlarda (C₁₈, C₈, CN), çeşitli oranlardaki asetonitril/10 mM fosfat tamponu (pH 2,2)-triethylamin, asetonitril/10 mM ortofosforik asit (pH 2,4)-triethylamin hareketli faz sistemlerinde 20, 25, 30, 40, 50, 55 °C kolon sıcaklığında, izokratik ve çeşitli gradient programlar uygulanarak, değişik akış hızlarında denendi. Analiz edilen türevin alıkonma zamanı ve çalışılacak uyarma, emisyon dalga boyları belirlendi. Elde edilen veriler Bölüm 4.1.2.1. de verilmiştir.

3.3.2.2. İç Standart Seçimi

Ekstraksiyon, türevlendirme gibi ön işlemlerden ve enjeksiyonlardan kaynaklanabilecek hatalardan kurtulmak amacı ile aşağıdaki ilaç maddelerinin yöntemimizde İS olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı. Bu amaçla vigabatrin, gabapentin, maprotilin, metformin, desipramin, imipramin, fluoksetin, fluvoksamin, meropenem, teikoplanin, venlafaxine, baklofen, parasetamol, tizanidin, sertralın, nortriptilin, betahistidin, amantadin, doksazosin, lorakarbef, lisinopril, amlodipin, traneksamik asit gibi amin içeren çeşitli ilaç maddeleri denendi. Tüm maddeler ME için belirlenmiş reaksiyon koşullarında ayrı ayrı FMOC ile türevlendirilmeye çalışıldı. Reaksiyon karışımları, ME-FMOC türevine ait Bölüm 4.1.2.1.de belirlenen kromatografi koşullarında HPLC ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2.2. de verilmiştir.

3.3.2.3. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanan $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki ME çözeltisinden $20 \mu\text{L}$, $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki çözeltiden ise $20, 40, 60, 80, 100 \mu\text{L}$, içerisinde toplam hacim $100 \mu\text{L}$ olacak şekilde su içeren kapaklı cam tüplere alındı. Bu çözeltilerin üzerine $25 \mu\text{L}$ $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki İS çözeltisinden, $25 \mu\text{L}$ $0,4 \text{ N}$ pH $8,5$ borat tamponu, $125 \mu\text{L}$ $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki FMOC çözeltisinden ve $550 \mu\text{L}$ asetonitril ilave edilerek çözeltiler 30 saniye girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Su banyosunda $40 \text{ }^\circ\text{C}$ de 20 dakika süre ile ısıtılmasının ardından $75 \mu\text{L}$ 14 mg.mL^{-1} glisin çözeltisinden ilave edildi ve 30 saniye girdap karıştırıcıda karıştırılmasını takiben bir dakika bekletildi. Enjeksiyondan önce tüplere $100 \mu\text{L}$ 10 mM o-fosforik asit-% $0,1$ trietilamin karışımından ilave edildi. Karışımların 20 şer μL si $1,5 \text{ mL.dak}^{-1}$ akış hızında $40 \text{ }^\circ\text{C}$ deki C_{18} kolona uygulandı.

Asetonitril/ 10 mM ortofosforik asit (pH $2,4$)-% $0,1$ trietilamin hareketli faz sistemi ile gradient programlama uygulanarak yapılan analizlerde fluorimetrik dedektörle 260 nm uyarma, 315 nm emisyon dalga boylarında saptanan piklerin alanları ölçüldü. Her konsantrasyon için 6 kez çalışılarak bulunan ME-FMOC pik alanları, İS-FMOC pik alanlarına oranlandı. Ortalama pik alan oranı değerlerine karşılık konsantrasyon değerleri arasında ölçü eğrileri hazırlandı. Ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait sonuçlar Bölüm $4.1.2.3.$ de bildirilmiştir.

3.3.2.4. ME'nin Plazmadan Ekstre Edilmesi İşlemi

Plazma proteinlerinden gelebilecek girişimleri en aza indirmek için ME'nin plazmadan ekstraksiyonunu sağlayacak birtakım ön denemeler yapıldı.

ME'nin plazmadan sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ekstre edilip edilemeyeceği incelendi. Bunun için ME katılmış plazma örnekleri ile asidik, nötr ve bazik ortamlarda belirli çözücüler ve bunların belirli oranlardaki karışımları ile aşağıdaki şekilde çalışıldı.

Bu denemeler için 1 ml plazmaya $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki ME çözeltilisinden $100 \mu\text{L}$ ve ardından pH 7 fosfat tamponu, $0,1 \text{ N NaOH}$ ve $0,1 \text{ N HCl}$ çözeltilerinden ayrı ayrı $500 \mu\text{L}$ ilave edildi. Her bir örnek 1 dakika girdap karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra Tablo 3.1 de belirtilen ekstraksiyon çözücülerinden 5 mL ilave edildi. Örnekler 5 dakika 4500 rpm de santrifüj edildikten sonra ayrılan organik fazlar $40 \text{ }^\circ\text{C}$ de azot akımında kuruluğa kadar uçuruldu ve kalıntılar $100 \mu\text{L}$ suda çözüldükten sonra $50 \mu\text{L}$ $0,2 \text{ N}$ pH $8,5$ borat tamponu, $125 \mu\text{L}$ $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki Fmoc çözeltisi ve $550 \mu\text{L}$ asetonitril ilavesinden sonra 30 ar saniye girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Su banyosunda $40 \text{ }^\circ\text{C}$ de 20 dakika süre ile ısıtılmalarının ardından $75 \mu\text{L}$ 14 mg.mL^{-1} glisin çözeltilisinden ilave edildi ve 30 ar saniye girdap karıştırıcıda karıştırılmasını takiben bir dakika bekletildi. Enjeksiyondan önce tüplere $100 \mu\text{L}$ 10 mM o-fosforik asit-% $0,1$ trietilamin karışımından ilave edildi. Karışımların $20 \mu\text{L}$ si HPLC sistemine enjekte edildi.

Uygun ekstraksiyon sistemi belirlendikten sonra, bu yöntemin İS maddenin verimini nasıl etkilediği de araştırıldı. Bunun için 1 ml plazmaya $500 \mu\text{L}$ $0,1 \text{ N NaOH}$, $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki ME çözeltilisinden $100 \mu\text{L}$ ve $25 \mu\text{L}$ $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki İS çözeltilisinden ilavenin ardından 1 dakika girdap karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra 5 mL n-hekzan:izoamil alkole ekstre edilmiştir. Ekstraksiyon ve uçurma işleminin ardından kalıntı $125 \mu\text{L}$ suda çözülmüş ve işlemlere Bölüm 3.3.2.3.de anlatıldığı gibi devam edilmiştir.

Plazmadan ekstraksiyon ile ilgili yapılan tüm çalışmalara ait sonuçlar Bölüm 4.1.2.4. de verilmiştir.

Tablo 3.1: Plazmadan ekstraksiyon çalışmalarında denenen çözücü sistemleri

Ortam	Çözücü Sistemleri
0,1 N HCl 0,1 N NaOH 0,1 N pH 7 fosfat tamponu	CHCl ₃
	CHCl ₃ :n-butanol (3:1)
	CH ₂ Cl ₂
	CH ₂ Cl ₂ :propanol (3:1, 5:1)
	etil asetat
	n-hekzan:etil asetat (2:1, 1:1)
	n-hekzan
	n-hekzan:propanol (99:1, 98:2)
n-hekzan:izoamil alkol (99:1, 98:2, 97:3)	

3.3.2.5. Plazmada Ölçü Eğrisi Hazırlanması

1'er mL plazma örnekleri üzerine 0,05 µg.mL⁻¹ konsantrasyondaki ME çözeltilisinden 20'şer µL, 0,5 µg.mL⁻¹ konsantrasyondaki çözeltiden ise 20, 40, 60, 80, 100 µL ilavelerin ardından toplam ilave edilen sulu faz hacmi 100 µL olacak şekilde su, ardından da 0,5 µg.mL⁻¹ konsantrasyondaki nortriptilin çözeltilisinden 25'er µL ve 500'er µL 0,1 N NaOH ilave edildi. Her bir örnek 1 dakika girdap karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra 5'er mL n-hekzan:izoamil alkol ilave edilerek örnekler 5'er dakika 4500 rpm de santrifüj edildikten sonra ayrılan organik fazlar 40 °C de azot akımında kuruluğa kadar uçuruldu ve kalıntılar 125'er µL suda çözüldükten sonra 25'er µL 0,4 N pH 8,5 borat tamponu, 125'er µL 0,5 mg.mL⁻¹ konsantrasyondaki Fmoc çözeltisi ve 550'şer µL asetonitril ilave edilerek çözeltiler 30'ar saniye girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Su banyosunda 40 °C de 20 dakika süre ile ısıtılmanın ardından 75'er µL 14 mg.mL⁻¹ glisin

çözeltilisinden ilave edildi ve 30'ar saniye girdap karıştırıcıda karıştırmalarını takiben bir dakika bekletildi. Enjeksiyondan önce tüplere 100'er μL 10 mM o-fosforik asit-%0,1 trietilamin karışımından ilave edildi. Karışımların 20'şer μL 'si HPLC sistemine enjekte edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2.5. de bildirilmiştir.

3.3.2.6. Geliştirilen Yöntemin Geri Kazanım Oranı

Plazmadan mutlak geri kazanım oranı ME içermeyen plazmaya düşük (10 ng.mL^{-1}), orta (30 ng.mL^{-1}) ve yüksek (50 ng.mL^{-1}) konsantrasyonlarda ME katılması ile elde edilen örneklerin analiz edilmesiyle belirlendi. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, türevlendirme ve kromatografi işlemlerinden sonra elde edilen pik alanları, aynı konsantrasyondaki ME'nin sudaki çözeltileriyle elde edilmiş pik alanları ile kıyaslandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2.6. da verilmiştir.

3.3.2.7. Geliştirilen Yöntemin Tekrarlanabilirliği

Yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı günde ve farklı günlerde düşük (10 ng.mL^{-1}), orta (30 ng.mL^{-1}) ve yüksek (50 ng.mL^{-1}) konsantrasyonlarda ME içeren plazma örnekleri 8 kez analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2.7. de verilmiştir.

3.3.2.8. Geliştirilen Yöntemin Tanıma ve Tayin Sınırları

Tanıma ve Tayin sınırı görsel esaslara dayanarak sinyal/gürültü oranları sırasıyla 3:1 ve 10:1 olacak şekilde belirlendi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2.8. de verilmiştir.

3.3.2.9. ME'nin Saklama Sırasındaki Dayanıklılığı

ME katkılı plazma örneklerinde ilacın dayanıklılığını araştırmak üzere iki şekilde çalışılarak analizler yapıldı.

- 1- Örnekler $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de 5 ay süresince bekletildi.
- 2- $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de dondurulmuş örnekler çözündürüldükten sonra bu işlem ardarda üç kez tekrarlandı.

Bu örneklerdeki ME miktarı Bölüm 3.3.2.5. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Sonuçlar Bölüm 4.1.2.9.da bildirilmiştir.

3.4. Tabletlerde ME Tayini

3.4.1. HPLC Yöntemi

10 adet Ebixa[®] tablet tek tek tartılıp, ortalama bir tablet ağırlığı bulundu ve tabletler porselen bir havanda ince toz haline getirildi. 10 mg ME'ye eşdeğer miktarda tablet tozu tartılarak, 100 mL'lik balonjojeye aktarıldı, 50 mL su ilave edildi. 30 dakika ultrasonik banyoda tutuldu ve su ile hacmine tamamlandı, mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 30 mL' si atıldı. Geri kalan süzüntüden 1 mL alındı ve suyla 10 mL'ye seyreltildi. Bu çözeltilerden 0,25 mL alınarak hacim suyla 10 mL ye tamamlandı. Bu çözeltinin 100 µL si ile Bölüm 3.3.2.3. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Analiz işlemi 6 kez tekrarlandı. Tabletlerdeki ME miktarı daha önceden hazırlanan ölçü eğrisine ait doğru denkleminde hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2. de verilmiştir.

3.4.2. Kıyas Yöntemi

Kıyas yöntemi olarak ilaç firmasından alınan susuz ortamda titrasyon yöntemi kullanıldı.

10 adet Ebixa[®] tablet tek tek tartılıp, ortalama bir tablet ağırlığı bulundu ve tabletler porselen bir havanda ince toz haline getirildi. 10 mg ME'ye eşdeğer miktarda tablet tozu tartılarak 2 ml formik asit çözeltisinde çözüldü ve çözeltiliye 20 mL asetik asit anhidrit ile 0,15 mL % 0,1 lik kristal viyole çözeltisi ilave edildi. Bu karışım faktörü belirlenmiş 0,1 M perklorik asit ile titre edildi. Bitiş noktasında sarı renk görüldüğü titrasyonda bir de boş deneme yapıldı.

n = 6 olacak şekilde yapılan titrasyonların ardından 1 mL 0,1 M perklorik asit çözeltisinin 0,02158 g ME'ye eşdeğer olmasına dayanarak aşağıdaki formül yardımıyla ME miktarı Denklem 3.1. e göre hesaplandı.

$$X = \frac{(V - V_k) \cdot K \cdot 0,02158}{a}$$

V: Boş denemede sarf edilen 0,1 M perklorik asit hacmi; mL

V_k: Numune çözeltisini titre ederken sarf edilen 0,1 M perklorik asit hacmi; mL

K: 0,1 M perklorik asit çözeltisinin faktörü

0,02158: 1 mL 0,1 M perklorik asit çözeltisine eşdeğer ME miktarı; g

a: Tartılan ME miktarı; g

3.5. Plazmada ME Tayini

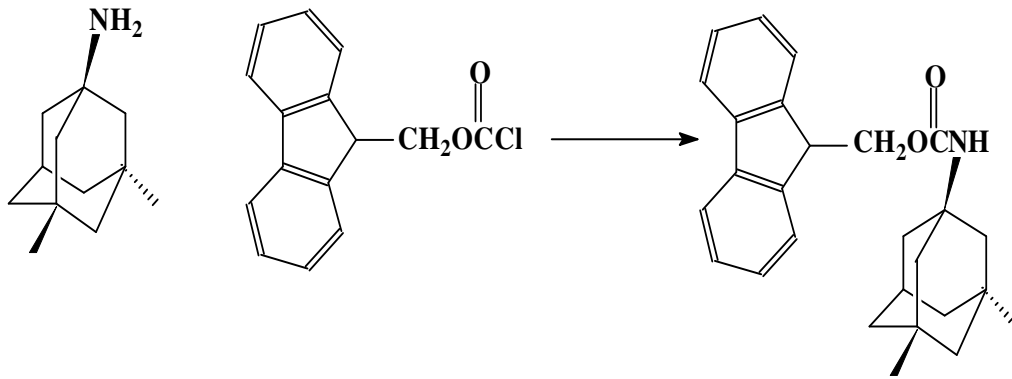
Plazmada ME tayini için 27 yaşında sağlıklı bir gönüllü tarafından tek doz 20 mg ME (10 mg memantin hidroklorür içeren Ebixa® tabletten iki adet) alınmasından 2, 4, 5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 24, 48, 72, 96, 144, 168, 196 saat sonra 5-6 mL venöz kan örnekleri içinde EDTA bulunan tüplere toplandı ve 4.500 rpm de 15 dakika santrifüjlendi. Bu işlem sonunda elde edilen plazmalardan alınan 1 mL'lik örnekler -20 °C de saklandı. Bu örnekler Bölüm 3.3.2.5. de anlatıldığı gibi analiz edildi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.3. de bildirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

4.1.1. ME ile FMOC Arasındaki Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi

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



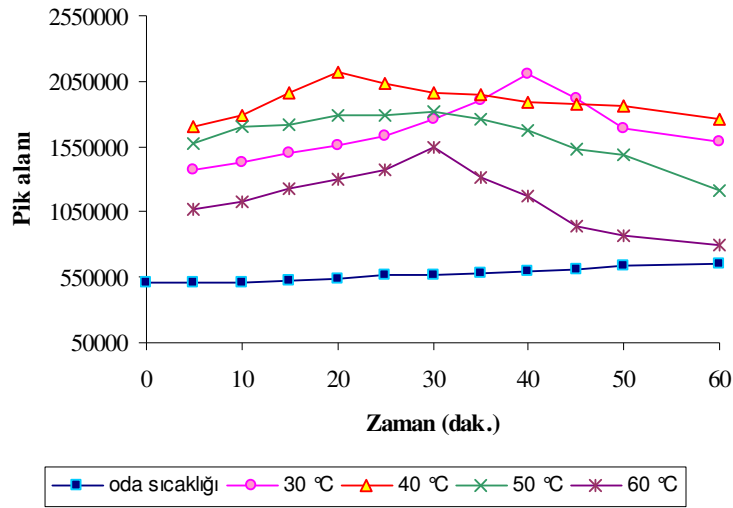
Şekil 4.1: ME ile FMOC arasındaki reaksiyon

4.1.1.1. Isıtma ve Reaksiyon Süresi

ME-FMOC türevinin kantitatif olarak oluşması için en uygun sıcaklık ve reaksiyon süresini saptamak amacıyla oda sıcaklığında, 30, 40, 50 ve 60 °C sıcaklıklarda 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ve 60 dakika bekleme ile Bölüm 3.3.1.1.de anlatıldığı gibi çalışıldı. Oluşan türevlere ait pik alanlarının, sıcaklık ve zamana karşı gösterdiği değişim Tablo 4.1 ve Şekil 4.2 de görülmektedir. Bu bulgulara dayanarak ME ile FMOC arasındaki reaksiyonun en iyi şekilde tamamlanması için 40 °C de 20 dakika süreyle ısıtmanın yeterli olduğu belirlendi.

Tablo 4.1: ME-FMOC türevlerinin çeşitli sıcaklık ve sürelerdeki pik alanları

sıcaklık süre(dak)	Oda sıcaklığı	30°C	40°C	50°C	60°C
hemen	503.674				
5	504.216	1.369.523	1.701.375	1.575.324	1.063.392
10	509.362	1.430.163	1.783.545	1.695.634	1.122.542
15	518.379	1.494.537	1.954.523	1.714.378	1.222.745
20	540.238	1.563.426	2.123.762	1.783.547	1.305.638
25	560.257	1.633.428	2.028.963	1.794.632	1.376.284
30	570.276	1.766.483	1.953.857	1.813.429	1.548.345
35	584.561	1.908.024	1.952.543	1.765.421	1.318.645
40	591.294	2.103.194	1.892.345	1.673.549	1.164.652
45	612.432	1.916.595	1.873.523	1.527.638	936.721
50	642.854	1.693.527	1.863.721	1.487.326	875.289
60	658.723	1.582.585	1.752.834	1.209.526	800.834



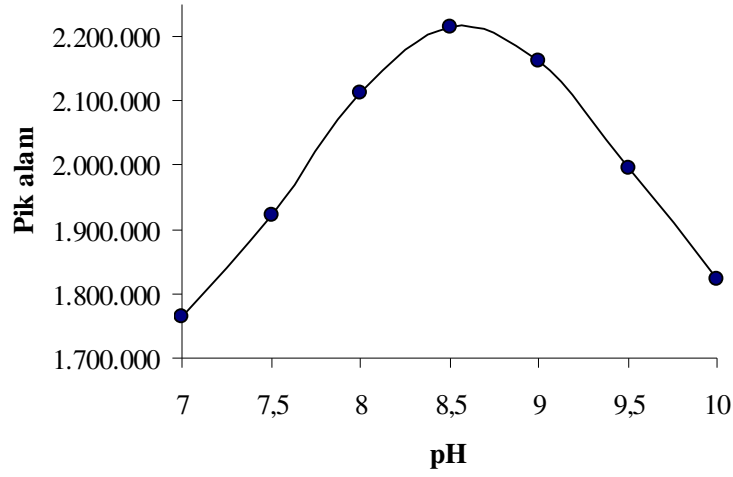
Şekil 4.2: ME-FMOC türevinin oluşumu üzerine sıcaklık ve zamanın etkisi

4.1.1.2. pH

ME ile FMOC arasındaki reaksiyonun en iyi şekilde yürüdüğü pH değerini belirlemek amacıyla pH 7-10 arasında hazırlanmış bir seri tampon çözelti ile Bölüm 3.3.1.2. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Yapılan denemeler sonucunda reaksiyonun en iyi pH 8,5 da yürüdüğü saptandı. Sonuçlar Tablo 4.2 ve Şekil 4.3 de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Çeşitli pH larda oluşan ME-FMOC türevlerinin pik alanları

pH	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10
Pik alanı	1.765.321	1.923.452	2.113.472	2.213.523	2.162.383	1.996.825	1.823.613



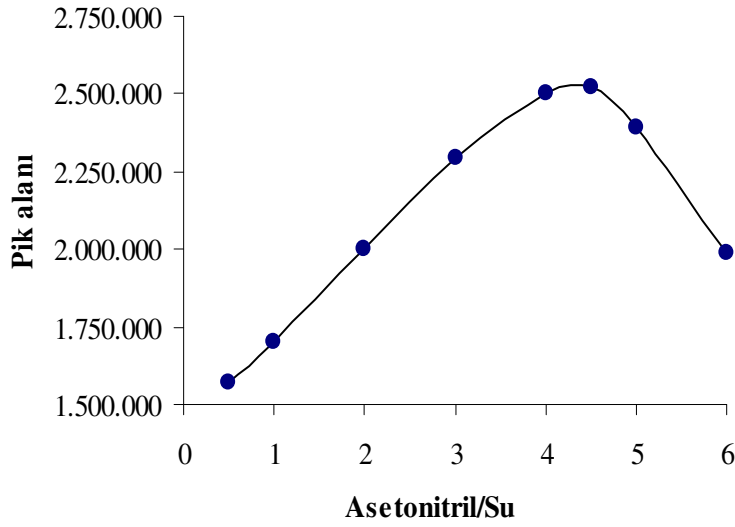
Şekil 4.3: ME-FMOC türevinin oluşumu üzerine pH nın etkisi

4.1.1.3. Asetonitril Su Oranı

ME ile FMOC arasındaki reaksiyonun en iyi şekilde yürütmesi için gerekli asetonitril su oranını belirlemek amacıyla oran 0,5, 1, 2, 3, 4, 4,5 ve 5 değerlerinde olacak şekilde Bölüm 3.3.1.3. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Tablo 4.3 de değişik oranlardaki türevlerin pik alanları, Şekil 4.4 de ise bu veriler sonucu oluşturulmuş grafik görülmektedir. Veri sonuçlarına göre optimum oranın 4,5 olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.3: Değişik asetonitril su oranlarında oluşan ME-FMOC türevine ait pik alanları

Asetonitril/Su	Pik alanı
0,5	1.572.316
1	1.703.523
2	2.002.341
3	2.293.642
4	2.504.232
4,5	2.518.923
5	2.392.345
6	1.985.796



Şekil 4.4: ME-FMOC türevinin oluşumu üzerine asetonitril su oranının etkisi

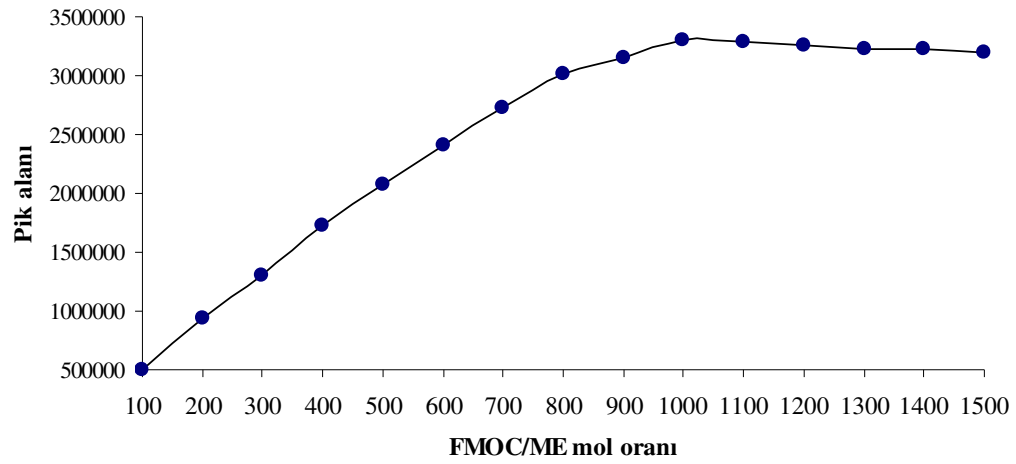
4.1.1.4. Belirteç Miktarı

ME ile FMOC arasındaki reaksiyonun optimum koşullarda yürümesi için gerekli belirteç miktarını belirlemek amacıyla, madde miktarı ve reaksiyon ortamındaki toplam organik faz hacmi sabit tutularak FMOC mol katı 100-1500 olacak şekilde artan hacimlerde hazırlanan belirteç çözeltileriyle Bölüm 3.3.1.4. deki gibi çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.4 ve Şekil 4.5 de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre 125 μL 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ FMOC çözeltisi ilavesi, yani belirtecin 1000 mol katı ile en iyi sonuçlara ulaşıldığı saptanmıştır.

Tablo 4.4: Çeşitli mol oranlarına göre türevin pik alanı değişimi

FMOC/ME mol oranı	100	200	300	400	500	600	700
Pik alanı	505.282	935.095	1.300.357	1.723.669	2.068.331	2.403.081	2.725.294

800	900	1000	1100	1200	1300	1400	1500
3.008.000	3.152.269	3.295.526	3.288.631	3.251.236	3.221.221	3.221.160	3.201.213

**Şekil 4.5: ME-FMOC türevinin oluşumu üzerine FMOC/ME mol oranının etkisi**

4.1.1.5. Glisin Miktarı ve Bekleme Süresi

Bölüm 3.3.1.5. de anlatıldığı gibi çalışılmasının sonucunda reaksiyonun ardından 6 mg.mL^{-1} glisin çözeltisinden $175 \mu\text{L}$ ilave edilerek girdap karıştırıcı ile 30 saniye karıştırılmasını takiben 1 dakika beklemenin reaksiyonu durdurmak için yeterli olduğu saptanmıştır.

4.1.1.6. Türevin Dayanıklılığı

ME-FMOC türevinin dayanıklılığını incelemek için Bölüm 3.3.1.6. da anlatıldığı gibi çalışıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta ve gün ışığında, $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de karanlıkta belirli sürelerde bekletilen türevlere ait pik alanları Tablo 4.5 de verilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde türevin $+4^{\circ}\text{C}$ de karanlıkta 4 gün süreyle dayanıklı kaldığı belirlenmiştir.

Tablo 4.5: Oda sıcaklığında gün ışığında ve karanlıkta, $+4^{\circ}\text{C}$ de karanlıkta bekletilen ME-FMOC türevinin stabilitesi

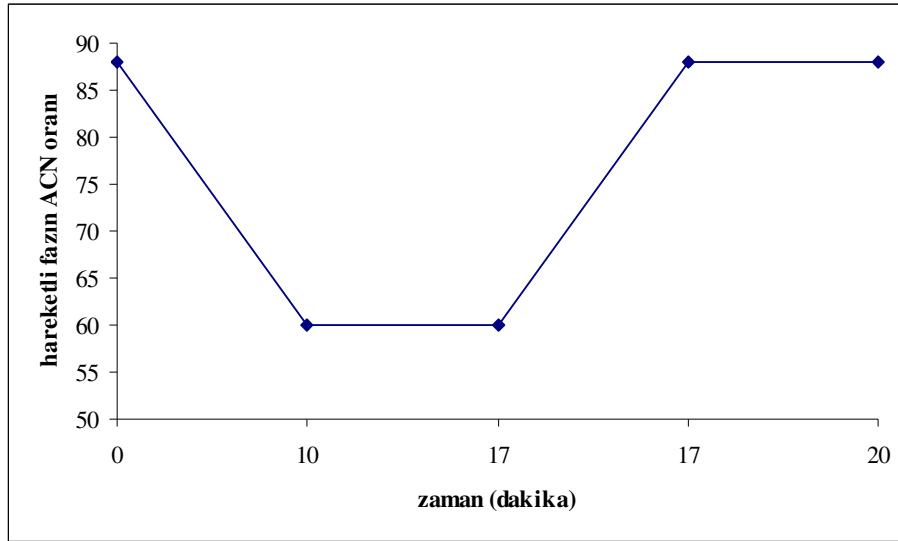
	Pik alanları					
	Başlangıç	12saat sonra	24saat sonra	48saat sonra	72saat sonra	96saat sonra
Oda sıcaklığı gün ışığında	2.224.510	1.987.456	1.564.871	1.325.478	1.002.487	894.524
Oda sıcaklığı karanlıkta	2.213.521	2.198.745	2.178.456	2.165.412	2.148.742	2.117.854
$+4^{\circ}\text{C}$ de karanlıkta	2.213.245	2.213.452	2.208.541	2.184.562	2.181.321	2.164.871

4.1.2. ME'nin HPLC ile Analizi

ME'nin FMOC ile oluşturduğu türevin HPLC ile analizini gerçekleştirebilmek amacıyla öncelikle dedektör dalga boyları, kolon, hareketli faz sistemi, kolon sıcaklığı, ve akış hızı gibi kromatografik parametreler belirlendi. Daha sonra bulunan optimum reaksiyon koşullarında çalışılarak İS madde ve ME'yi plazmadan ekstre etmek için en uygun çözücü sistemi belirlendi. Yöntemin validasyonu yapıldı ve geliştirilen yöntem maddenin tabletlerdeki ve plazmadaki analizlerine uygulandı. Elde edilen bulgular bu bölümde verilmiştir.

4.1.2.1. Dedektör Dalga Boyları, Kolon, Hareketli Faz, Kolon Sıcaklığı, Akış Hızı ve Seçilmesi (Kromatografi Koşullarının Belirlenmesi)

Bölüm 3.3.2.1. de anlatılan denemeler sonucu ME'nin FMOc ile oluşturduğu türev pikine ait en iyi ayırma faktörü değeri 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm iç çaplı C₁₈ kolonda 40°C de, 1,5 mL/dakika akış hızında gradient programlama uygulanmış asetonytril/10 mM ortofosforik asit (pH 2,4)-%0,1 trietilamin hareketli faz sistemi ile elde edildi. Gradient programlamada işleme sistemden % 12 ortofosforik asit (pH 2,4)-%0,1 trietilamin geçirilmesiyle başlandı ve 10 dakika sonunda bu oran doğrusal olarak % 40'a çıkartıldı. 10-20 dakika arasında % 40'lık sabit oranla yapılan çalışmalarda madde pikinin genişlemesi ve pik simetrisinin iyi olmaması nedeniyle bu oran 10-17 dakikalar arasında doğrusal olarak % 25'e indirildi ve bir sonraki enjeksiyona da hazırlık olması için 17,01 dakikadan itibaren % 12' ye düşürüldü. Elüsyonun 20. dakikaya kadar % 12 ile devam ettiği koşullarda analiz edilen türevin alıkonma zamanı 16,2 dakika olarak belirlendi (Gradient programlamanın grafiği Şekil 4.6 da verilmiştir). Ayrıca Bölüm 3.3.2.1. de anlatılan denemeler sonucu maksimum uyarma ve emisyon dalga boyları 260 ve 315 nm olarak belirlendi.



Şekil 4.6: Hareketli fazın zamana göre içerdiği asetonytril oranları

4.1.2.2. İç Standart Seçimi

ME-FMOC türevinin gerek sulu çözeltilerde gerekse plazmada tayini için en uygun iç standardı belirlemek üzere 3.3.2.2. de adı geçen maddelerle denemeler yapıldı. Nortriptilin dışında, maddelerden bir kısmı belirlenen reaksiyon koşullarında FMOC ile türev oluşturamaz iken, bir kısmı ise türev oluşturmasına rağmen ME türevi için geliştirilen kromatografi koşullarında düşük ayırma faktörü değerleri gösterdi. Sonuç olarak en uygun İS olarak alıkonma zamanı 18,3 dakika olan, ayrıca Bölüm 3.3.2.4. de anlatılan plazmadan ekstraksiyon yöntemine de oldukça yüksek verimle uyum sağlamış olan nortriptilin (Şekil 4.7) seçildi.



Şekil 4.7: Nortriptilinin kimyasal formülü

4.1.2.3. Sulu Çözeltide Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi

1-50 ng.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler Bölüm 3.3.2.3. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan oranı değerleri yardımıyla 1-50 ng.mL⁻¹ aralığında Şekil 4.8 de görülen ölçü eğrisi çizildi.

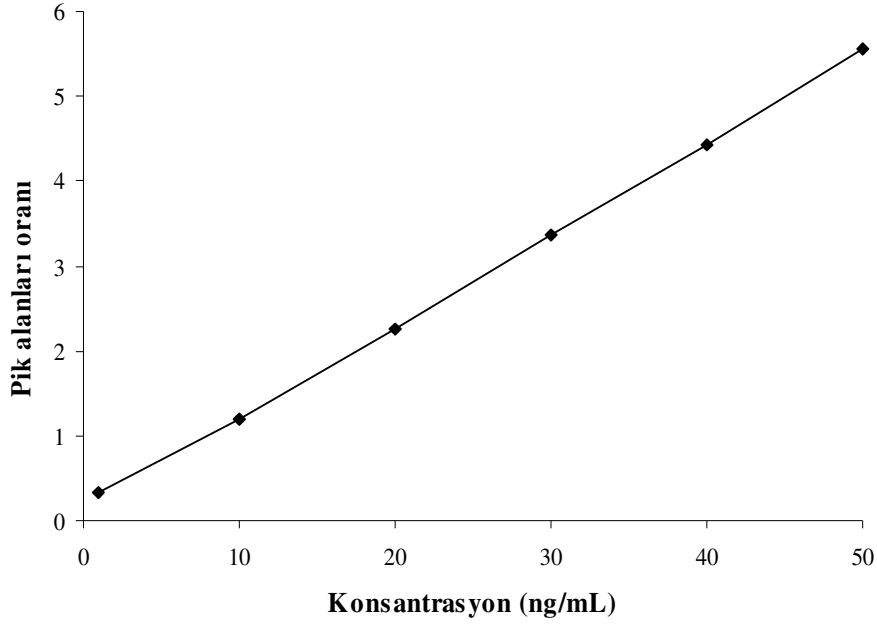
Pik alan oranları ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s) ve bağıl standart sapma (RSD) değerleri ile en küçük kareler yöntemi uygulanarak \bar{A} değerlerinden hesaplanan doğru denklemi, $A = mC + b$ [m = eğim, b = kesim noktası, C = konsantrasyon] ve korelasyon katsayısı (r) Tablo 4.6 da verilmiştir. Tablo 4.7 de ise 6 kez çalışma sonucu elde edilen her bir ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler yer almaktadır.

Tablo 4.6: ME'nin 1-50 ng.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alan oranları değerleri ve istatistik verileri

No	1	2	3	4	5	6
C (ng.mL ⁻¹)	1	10	20	30	40	50
A ₁	0,344800	1,198603	2,243782	3,370418	4,424900	5,577874
A ₂	0,323044	1,19713	2,245641	3,34205	4,421273	5,574512
A ₃	0,329679	1,196541	2,268213	3,361012	4,428135	5,555918
A ₄	0,325200	1,185647	2,255090	3,385362	4,436767	5,573320
A ₅	0,335478	1,187525	2,263572	3,389625	4,433038	5,546000
A ₆	0,326784	1,198967	2,262520	3,374073	4,465288	5,576626
\bar{A}	0,330831	1,194069	2,256470	3,370423	4,434900	5,565275
s	0,008084	0,005895	0,010051	0,017314	0,015886	0,013193
RSD (%)	3,502	4,523	4,454	0,513	0,358	0,237
Ortalama alan oran değerlerinden hesaplanan doğru denklemi: $A=0,1073C+0,1576$ ($r = 0,9995$)						

Tablo 4.7 :Tablo 4.6 daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	ortalama
m	0,1072	0,1074	0,1070	0,1076	0,1070	0,1077	0,1073
b	0,1620	0,1487	0,1626	0,1512	0,1654	0,1558	0,1576
r	0,9993	0,9994	0,9996	0,9995	0,9995	0,9996	0,9995



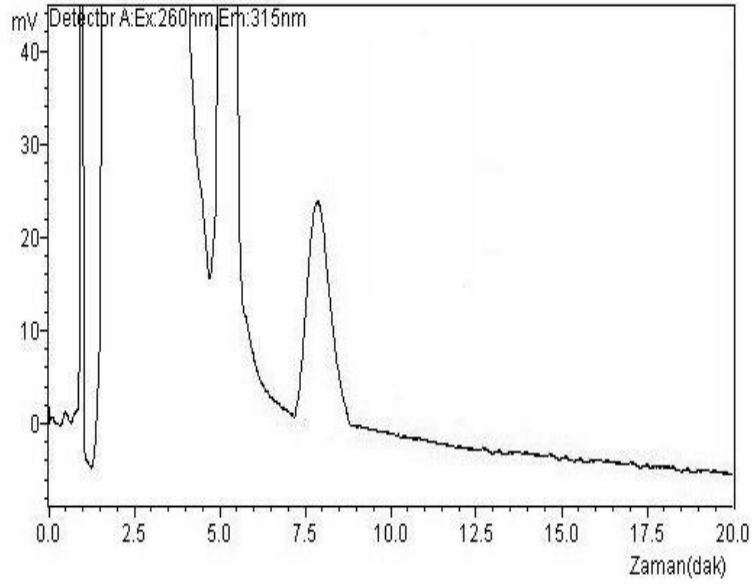
Şekil 4.8: ME'nin 1-50 ng.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisi

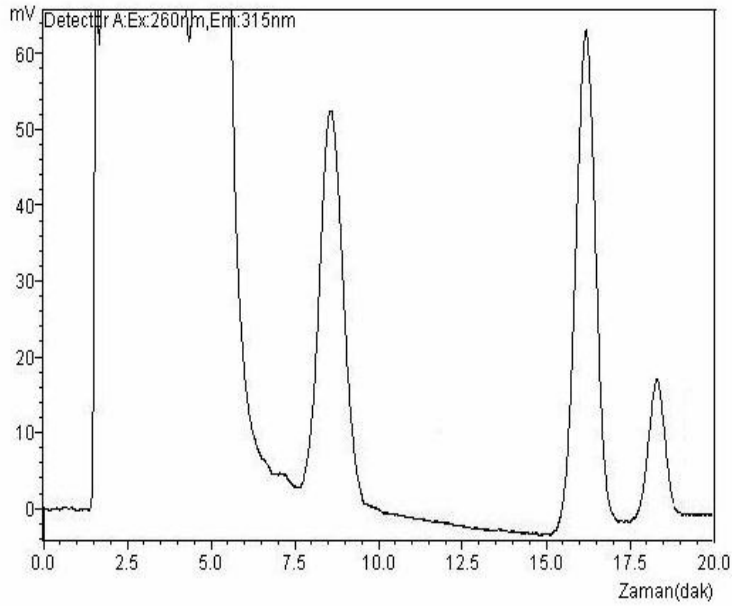
4.1.2.4. Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi

Plazma örneklerinden yapılan ilaç analizlerinde maddenin plazma proteinlerinden ve girişim yapabilecek diğer birtakım maddelerden uzaklaştırılması ve yüksek verimle izole edilmesi için oldukça sık uygulanan organik çözücü veya çözücü karışımlarıyla yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonu tekniği kullanılmıştır. Tablo 3.1 de yer alan çözücü sistemleri ile Bölüm 3.3.2.4. de anlatıldığı gibi 0,1 N HCl, pH 7 0,1 N fosfat tamponu ve 0,1 N NaOH ortamlarında çalışılmış ve en iyi verim değerleri 0,1 N NaOH ortamında elde edilmiştir. En yüksek verim değerleri ve bunların elde edildiği çözücü karışımları ise Tablo 4.8 de görülmektedir. Alınan sonuçlar incelendiğinde ME için en yüksek verimli çözücü karışımının n-hekzan:izoamil alkol (98:2) olduğu saptanmıştır. Boş, ME ve İS katkılı plazma örneklerine ait kromatogramlar Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11 de görülmektedir.

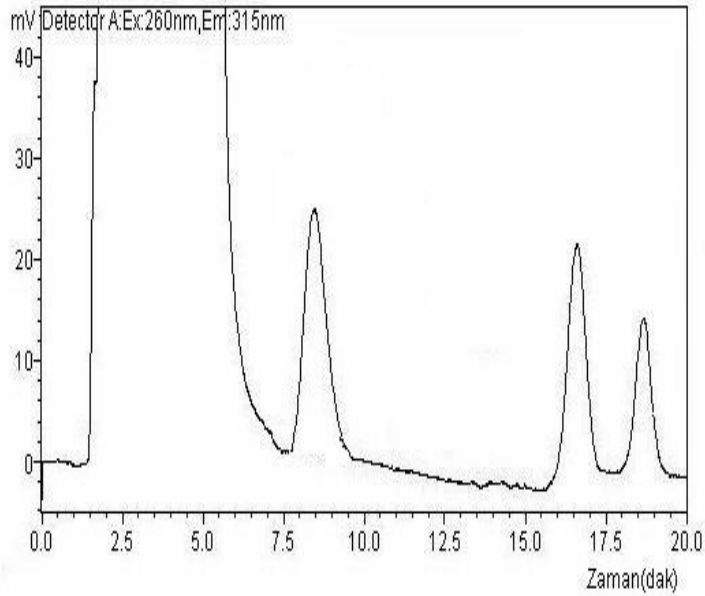
Tablo 4.8: En yüksek verim değerleri ve bunların elde edildiği çözücü karışımları

Ortam	Çözücü Karışımları	Verim (%)
0,1 N NaOH	n-hekzan:propanol (99:1)	45
	n-hekzan:propanol (98:2)	45
	n-hekzan:izoamil alkol (99:1)	67
	n-hekzan:izoamil alkol (98:2)	74
	n-hekzan:izoamil alkol (97:3)	70

**Şekil 4.9: Boş plazma örneğine ait kromatogram**



Şekil 4.10 : 50 ng.mL⁻¹ ME ve 12 ng.mL⁻¹ iç standart katılmış plazma örneğine ait kromatogram



Şekil 4.11: 20 ng.mL⁻¹ ME ve 12 ng.mL⁻¹ İS katılmış plazma örneğine ait kromatogram

4.1.2.5. Plazmada Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi

1-50 ng.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyonda katılmış standart çözeltilerle Bölüm 3.3.2.5. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Çalışma her konsantrasyon için 6 kez tekrarlandı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan oranları değerleri yardımıyla 1-50 ng.mL⁻¹ aralığında Şekil 4.12 de görülen ölçü eğrisi çizildi.

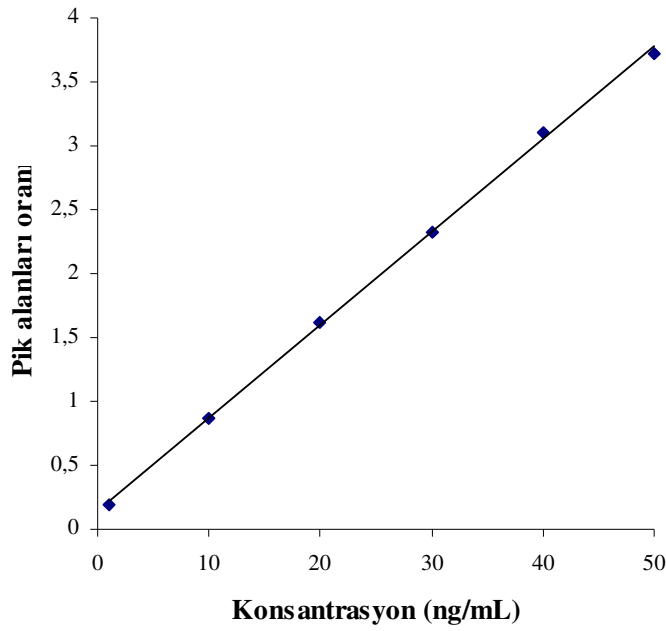
Pik alan oranları ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s) ve RSD değerleri ile en küçük kareler yöntemi uygulanarak \bar{A} değerlerinden hesaplanan doğru denklemi, $A = mC + b$ [$m =$ eğim, $b =$ kesim noktası, $C =$ konsantrasyon] ve korelasyon katsayısı (r) Tablo 4.9 da verilmiştir. Tablo 4.10 da ise 6 kez çalışma sonucu elde edilen her bir ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler yer almaktadır.

Tablo 4.9: ME'nin 1-50 ng.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alan oranları değerleri ve istatistik verileri

No	1	2	3	4	5	6
C (ng.mL ⁻¹)	1	10	20	30	40	50
A ₁	0,184735	0,865410	1,639612	2,323060	3,106012	3,814463
A ₂	0,188856	0,873159	1,625439	2,414804	3,206028	3,579919
A ₃	0,186542	0,844125	1,601952	2,219451	2,857251	3,517296
A ₄	0,184619	0,876461	1,608609	2,289286	3,154026	3,818322
A ₅	0,185454	0,882231	1,580969	2,258473	2,920251	3,745168
A ₆	0,184204	0,904276	1,661084	2,333086	3,105019	3,811640
\bar{A}	0,185735	0,874277	1,619611	2,306360	3,058098	3,714468
s	0,001736	0,019784	0,028566	0,067662	0,137786	0,132778
RSD (%)	0,93466	2,262800	1,763700	2,933700	4,505600	3,574400
Ortalama alan oran değerlerinden hesaplanan ölçü eğrisi denklemi: $A=0,0721C+0,1452$ ($r=0,9995$)						

Tablo 4.10: Tablo 9 daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	ortalama
m	0,0741	0,0773	0,0678	0,0744	0,0713	0,0736	0,0730
b	0,125	0,0998	0,1469	0,1152	0,1353	0,1467	0,128
r	0,9997	0,9999	0,9996	0,9992	0,9990	0,9995	0,9995

**Şekil 4.12: ME'nin 1-50 ng.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrisi**

4.1.2.6. Geliştirilen Yöntemin Geri Kazanım Oranı

ME'nin plazmadan geri kazanımını saptamak amacıyla üç farklı konsantrasyonda ME içeren plazma örnekleri Bölüm 3.3.2.6 da anlatıldığı gibi çalışıldı. Analizler sonucunda ME'nin plazma örneklerinden hesaplanan mutlak geri kazanım oranları Tablo 4.11 de verilmiştir.

Tablo 4.11: ME'nin plazmadan geri kazanımı (n=6)

Plazmaya katılan ME miktarı (ng.mL ⁻¹)	Bulunan Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Geri Kazanım (%)	%RSD
10,00	8,08 ± 0,07	80,83	0,84
30,00	20,46 ± 0,51	68,19	1,97
50,00	34,83 ± 0,46	69,65	1,15
Ortalama geri kazanım =		73,27	

4.1.2.7. Aynı Gün İçinde ve Farklı Günlerde Yapılan Plazma Analizlerinin Tekrarlanabilirliği

Düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda ME içeren plazma örnekleri ile (10, 30, 50 ng.mL⁻¹) Bölüm 3.3.2.5. de anlatıldığı gibi çalışıldı.

Aynı gün içinde yapılan analizlerde herbir örnek 8 kez çalışıldı. Bağlı standart sapma değerleri 1,35 – 2,70 aralığında hesaplandı (Tablo 4.12).

2 ay içerisinde 8 farklı günde yapılan analizler sonucu elde edilen bağlı standart sapma değerleri plazma için 0,29 - 3,39 aralığında bulundu (Tablo 4.13).

Tablo 4.12: Aynı gün içinde plazmada yapılan ME analizlerinin tekrarlanabilirliği

		Plazmaya katılan ME miktarı (ng.mL ⁻¹)		
		10	30	50
Bulunan konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)		9,27	28,92	47,91
		9,32	28,94	48,23
		9,46	29,24	48,32
		9,58	29,41	48,53
		9,58	29,53	48,74
		9,75	29,82	49,06
		9,87	30,31	49,12
		10,02	30,50	50,03
Ortalama	9,60	29,54	48,74	
Standart sapma	0,26	0,59	0,66	
RSD (%)	2,70	1,99	1,35	
RME (%)	-3,93	-1,38	-2,51	

Tablo 4.13: Farklı günlerde plazmada yapılan ME analizlerinin tekrarlanabilirliği

	Plazmaya katılan ME miktarı (ng.mL ⁻¹)		
	10	30	50
Bulunan konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	9,12	29,21	49,62
	9,16	29,22	49,65
	9,25	29,23	49,71
	9,52	29,26	49,76
	9,61	29,38	49,82
	9,75	29,55	49,91
	9,83	30,01	49,98
	9,98	30,09	50,00
Ortalama	9,52	29,49	49,80
Standart sapma	0,32	0,36	0,14
RSD (%)	3,39	1,22	0,29
RME (%)	-4,72	-1,68	-0,38

4.1.2.8. Geliştirilen Yöntemin Tanıma ve Tayin Sınırları

Yöntemin Tanıma ve Tayin sınırları Bölüm 3.3.2.8. de anlatıldığı şekilde sırasıyla $0,3 \text{ ng.mL}^{-1}$ ve $1,0 \text{ ng.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

4.1.2.9. Saklama Sırasındaki Dayanıklılık

Bölüm 3.3.2.9. da bildirildiği şekilde yapılan analizler sonucu plazmadaki ME'nin $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de en az iki ay boyunca dayanıklı kaldığı saptanmıştır. Ayrıca ardarda üç kez dondurulup çözülme işlemleri sonunda ME miktarında önemli bir azalma olmadığı belirlenmiştir.

4.2. Geliştirilen Yöntemin Tabletlerde ME Tayinine Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemi İle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

10 mg memantin hidroklorürü içeren Ebixa® tabletler Bölüm 3.4.1. de anlatıldığı gibi geliştirilen HPLC yöntemiyle analiz edildi. Sonuçları kıyaslamak amacıyla tabletler bir de susuz ortamda titrasyon yöntemiyle analiz edildi. Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar ve 6 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (\bar{A}), standart sapma (s), RSD ve %95 olasılık düzeyinde güven aralığı [$\bar{A} \pm (t.s/n)$] değerleri Tablo 4.14 te verilmiştir.

Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemi ile elde edilen sonuçların ortalamalar yönünden karşılaştırılması student (t) testi, standart sapmalar yönünden karşılaştırılması ise Fischer (F) testi uygulanarak yapıldı. Tablo 4.14 deki sonuçlar incelendiğinde hesaplanan t- ve F- değerleri %95 olasılık düzeyi ve 6 deneme için ilgili cetvellerde bildirilen değerlerden daha küçük olduğundan geliştirilen HPLC yöntemi ile kıyas yöntemi arasında gerek doğruluk gerekse kesinlik bakımından anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

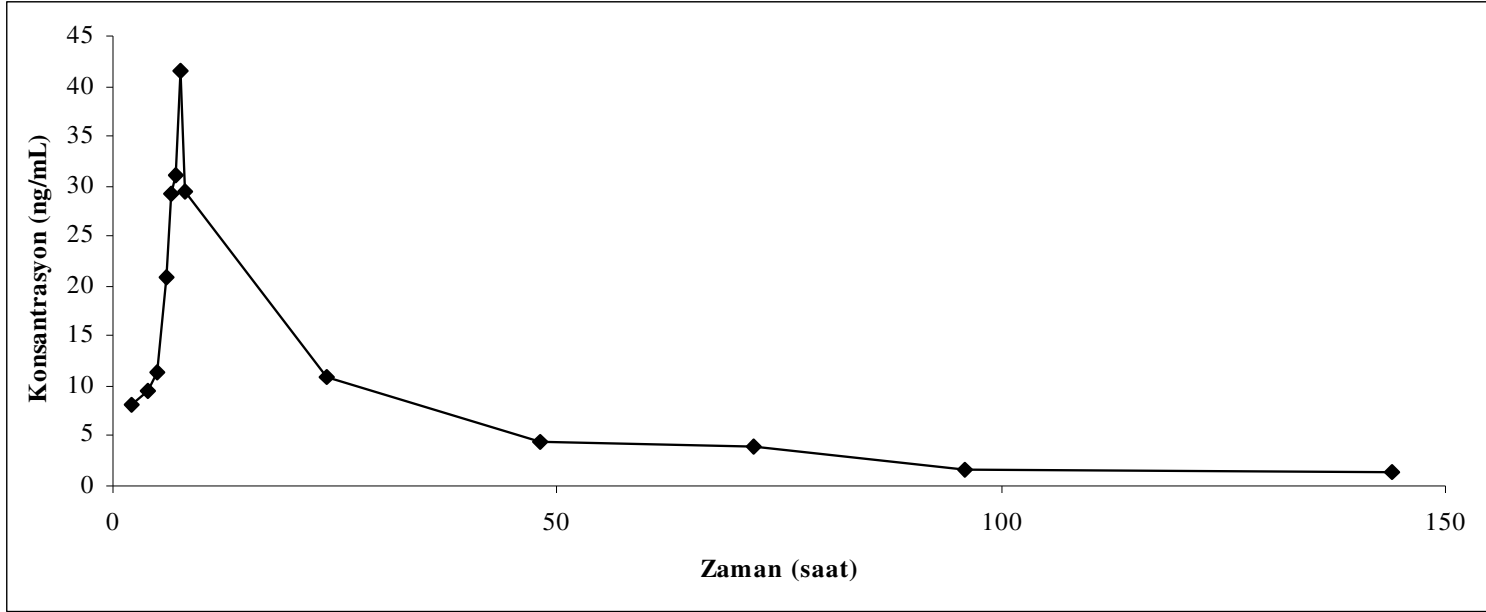
Tablo 4.14: 10 mg memantin hidroklorür içeren tabletlerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi

n	Geliştirilen HPLC Yöntemi		Titrasyon Yöntemi	
	mg/tablet	%	mg/tablet	%
1	9,713	97,13	9,704	97,13
2	9,876	98,76	9,832	98,76
3	9,996	99,96	9,963	99,96
4	9,998	99,98	9,989	99,98
5	10,011	100,11	9,971	99,71
6	10,038	100,38	10,088	100,88
\bar{A}	9,94	99,40	9,92	99,20
s	0,12		0,14	
RSD	1,20		1,41	
Güven Aralığı	0,013		0,015	
Güven Sınırları	9,927-9,953		9,905-9,935	
t = 0,259	n ₁ = n ₂ = 6		t _{tablo} = 2,228	
F = 1,38	P = 0,05		F _{tablo} = 4,28	

4.3. Geliştirilen Yöntem ile Plazmada ME Tayini ve Farmakokinetik Parametrelerinin Hesaplanması

27 yaşında sağlıklı bir gönüllü tarafından tek doz 20 mg memantin hidroklorür alımını takiben çeşitli zaman aralıklarında toplanan kan örnekleri Bölüm 3.5. ve 3.3.2.5. de anlatıldığı gibi analiz edildi (n=3). Bu örneklerin içerdiği ME miktarı plazma için hazırlanan ölçü eğrisine ait doğru denklemden hesaplandı (Tablo 4.15).

Plazma ME konsantrasyonunun zamana karşı değişimini gösteren grafiğin (Şekil 4.13) incelenmesinden anlaşılacağı gibi, ilacın alımından 7,5 saat ($t_{maks.}$) sonra 41,6 ng.mL⁻¹ maksimum plazma konsantrasyonuna ulaştığı görüldü. $t_{1/2,el}$ 69,4 saat ve eğri altında kalan alan ($AUC_{0-\infty}$) 1163 ng.saat.mL⁻¹ olarak hesaplandı (Tablo 4.16). Şekil 4.14 ve 4.15 de ME içilmesinden 7,5 ve 72 saat sonra alınan kan örneğinin analizi sonucu elde edilen kromatogramlar görülmektedir.



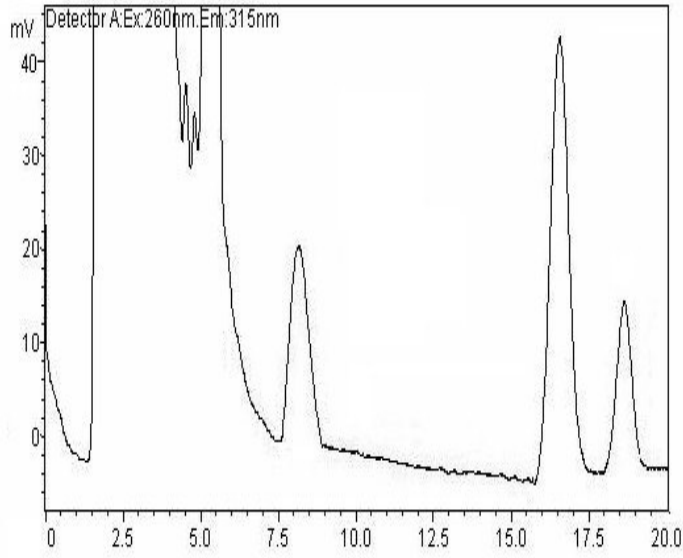
Şekil 4.13: Plazmada ME konsantrasyonunun zamana karşı değişimi

Tablo 4.15: Plazma ME konsantrasyonunun zamana karşı değişimi

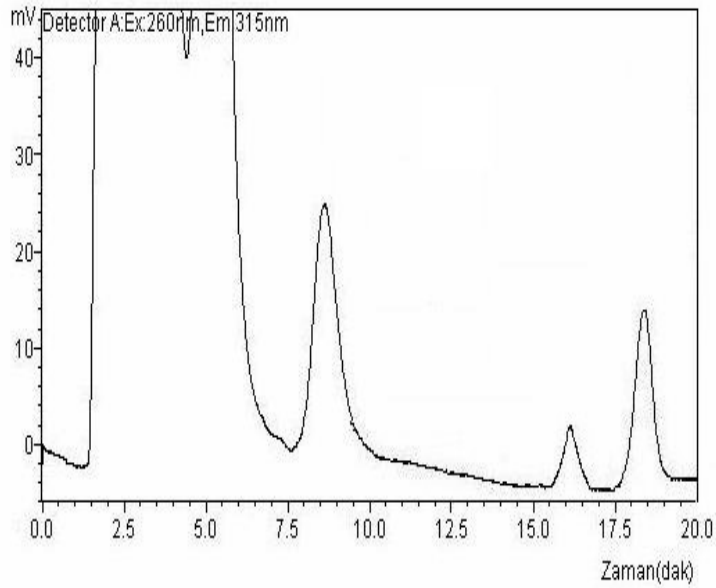
Zaman (saat)	Plazmada ME konsantrasyonu (ng.mL ⁻¹)
2	8,2
4	9,56
5	11,43
6	20,86
6,5	29,26
7	31,17
7,5	41,6
8	29,24
24	10,81
48	4,33
72	3,86
96	1,71
144	1,29

Tablo 4.16: 2 adet Ebixa[®] tablet alımından sonra hesaplanan farmakokinetik parametreler

C _{maks} (ng.mL ⁻¹)	41,6
t _{maks} (saat)	7,5
t _{1/2,el} (saat)	69,4
AUC _(0-∞) (ng.saate.mL ⁻¹)	1163



Şekil 4.14: 20 g tek doz memantin hidroklorür alan sağlıklı gönüllüden 7,5 saat sonra alınan plazma örneğine ait kromatogram



Şekil 4.15: 20 g tek doz memantin hidroklorür alan sağlıklı gönüllüden 72 saat sonra alınan plazma örneğine ait kromatogram

5. TARTIŞMA

ME trisiklik doymuş halka yapısı nedeniyle yeterli ışık absorpsiyonu göstermediğinden ilaç laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan spektrofotometrik dedektörlü HPLC cihazları ile tayini yapılamamaktadır. Bu yüzden bugüne kadar yapılmış çalışmaları ya GC yöntemlerden ya da türevlendirmeye veya kütle dedeksiyonuna dayanan HPLC yöntemlerinden oluşmaktadır.

Bu çalışmada, ME'nin hem farmasötik preparatlardaki hem de biyolojik sıvılardaki tayinine olanak sağlayan yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Maddenin günlük tedavi dozu 10-40 mg olduğundan, farmakokinetik çalışmalarda gereksinim duyulacak hassasiyetin sağlanabilmesi açısından spektrofluorimetrik dedektörle çalışma tercih edilmiş, yine aynı nedenle belirteç olarak son derece hassas fluoresans türevler oluşturan FMOC belirteci seçilmiştir.

FMOC ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, türevlendirme reaksiyonunun genellikle alkali ortamda, oda ısısında bekletme veya ısıtma ile yürüdüğü, ortamdaki organik ve sulu faz oranının reaksiyonun yürümesinde etkili olduğu, belirtecin fazlasının ortamdaki uzaklaştırılması için bir aminoasit çözeltisi ilavesinin ya da ekstraksiyonun yapıldığı gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında ME ve FMOC arasındaki reaksiyonun optimum koşulları araştırılmıştır.

Optimum sıcaklık ve reaksiyon süresini belirlemek amacıyla oda sıcaklığında, 30, 40, 50, 60°C lere 5-60 dakika aralığında çalışılmış ve ME ile FMOC arasındaki reaksiyon için 40°C de 20 dakika ısıtmanın yeterli olduğu görülmüştür. Reaksiyonun oda sıcaklığında tam yürümediği, 30°C de çok yavaş yürüdüğü, 50 ve 60°C lere ise fazla ısının türevin fluoresans şiddetini azalttığı gözlenmiştir. 30°C 40 dakika bekleme ile elde edilen sonuçlar 40°C de 20 dakika ile elde edilenlere çok yakın olmasına rağmen daha uzun bekleme süresinin yöntem için bir dezavantaj olacağı düşünülerek 40°C de 20 dakika ısıtma tercih edilmiştir.

Reaksiyonun en iyi hangi pH da yürüdüğü ise pH 7 ile 10 arasında bir seri tampon çözeltiyle yapılan analizler sonucu anlaşılmış ve en yüksek fluoresans değerine pH 8,5 da ulaşılmıştır.

FMOC ve ME arasındaki reaksiyonda organik ve sulu faz oranı araştırılmış ve bu oran 4,5 olduğunda reaksiyonun en iyi şekilde yürüdüğü saptanmıştır.

FMOC ile ME arasındaki reaksiyon için gerekli olan belirteç miktarı araştırıldığında FMOC/ME mol oranının 1000 kat olmasının yeterli olduğu daha fazla belirtecin türev oluşumunu etkilemediği belirlenmiştir. Belirtecin kendisinin de yüksek fluoresans göstermesi ve kromatogramda belirtece ait piklerin istenmemesi nedeniyle FMOC ile yapılan çalışmalarda reaksiyon sonunda ortamdaki belirteç fazlasının bir aminoasit çözeltisi veya ekstraksiyon işlemi ile uzaklaştırıldığı görülmüştür. Bu çalışmada zaman kaybetmemek için ekstraksiyon işlemi yerine ortama glisin ilavesi tercih edilmiştir. Ayrıca, biyolojik sıvılarda yapılan türevlendirmeye dayalı bazı analizlerde biyolojik sıvıda kullanılan belirteç miktarı sulu ortamda kullanılan belirteç miktarından daha fazla olmaktadır. Ancak denemelerimiz bu çalışmada böyle bir gereksinim olmadığını göstermiştir.

Yukarıdaki koşullarda elde edilen türevin stabilitesi incelendiğinde +4°C de karanlıkta 4 gün dayanıklı olduğu görülmüştür.

Bu çalışmalara paralel olarak HPLC analizi için en uygun koşulları belirlemek amacıyla denemeler yapılmıştır. Önce çalışılacak uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiş, sonra silikajel ve C₁₈ plaklarda yapılan bazı denemeler göz önüne alınarak çeşitli oranlarda hazırlanan metanol-su, asetonitril-su, metanol-10 mM fosfat tamponu (pH 2,2), asetonitril-10 mM fosfat tamponu (pH 2,2), asetonitril-10 mM ortofosforik asit (pH 2,4) karışımları ile çeşitli kolon sıcaklıklarında izokratik ve gradient programlar uygulanarak, değişik akış hızlarında çalışmalar yapılmıştır. Denenen sistemler arasında en iyi ayrılma 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm iç çaplı C₁₈ kolonda 40°C de, dakikada 1,5 mL akış hızı ile gradient programlama uygulanmış asetonitril/10 mM ortofosforik asit (pH 2,4)-%0,1 trietilamin hareketli faz sistemi ile elde edilmiştir. Bu koşullarda analiz edilen türevin alıkonma zamanı 16,2 dakika olarak belirlenmiştir.

Çeşitli ilaç maddelerinin denenmesi sonucu hem ME için geliştirilen optimum reaksiyon koşullarına hem de kromatografi koşullarına uyum sağlayan İS madde olarak nortriptilin belirlenmiştir. Nortriptilin, ME için geliştirilen plazmadan ekstraksiyon yöntemi ile % 96,5 lik geri kazanım göstermiştir. Analiz sonuçları ME-FMOC türevlerine ait pik alanlarının, nortriptilin-FMOC türevlerine ait pik alanlarına oranlanması ile değerlendirilmiştir.

Belirlenen koşullarda çalışılarak sulu çözeltide 1-50 ng.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında ölçü eğrisi hazırlanmış ve konsantrasyona karşılık pik alan oranı değerleri yardımıyla en küçük kareler yöntemi uygulanarak doğru denklemi hesaplanmıştır.

Sulu çözeltilerde geliştirilen yöntem 10 mg memantin hidroklorür içeren tabletlerin (Ebixa®) analizine uygulanmış ve elde edilen sonuçlar firmadan alınan tayin yöntemiyle elde edilenlerle istatistiki olarak kıyaslanmıştır. Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemi ile elde edilen sonuçların ortalamalar yönünden karşılaştırılması Student (t) testi, standart sapmalar yönünden karşılaştırılması Fischer (F) testi uygulanarak yapılmıştır. Hesaplanan t- ve F- değerleri ilgili cetvellerde bildirilen teorik değerlerden daha küçük bulunduğu için geliştirilen yöntem ile kıyas yöntemi arasında doğruluk ve kesinlik yönünden anlamlı bir fark olmadığına karar verilmiştir.

Sulu ortamda geliştirilen yöntemin ME'nin plazmadan tayinine de uygulanabilmesi için sulu çözeltilerden 0,1 N HCl, nötr ve 0.1 N NaOH' lı ortamlarda organik çözücü ve çözücü karışımları ile ekstraksiyon denemeleri yapılmıştır. Denemeler sonucunda plazmadan ekstraksiyon işlemleri için 0.1 N NaOH' lı ortamda n-hekzan:izoamil alkol (98:2) karışımının, %73,27 geri kazanım ile en iyi verimi sağladığı anlaşılmıştır.

Plazmada ME'nin miktarını tayin etmek amacıyla sulu çözeltilerde olduğu gibi yine 1-50 ng.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında ölçü eğrisi hazırlanmış ve doğru denklemi hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı günde ve farklı günlerde düşük (10 ng.mL⁻¹), orta (30 ng.mL⁻¹) ve yüksek (50 ng.mL⁻¹) konsantrasyonlarda ME içeren plazma örnekleri 8 kez analiz edilmiş ve analizlere ait RSD (%0,29-3,39) ve RME (<%-0,38) değerleri yöntemin kesinlik ve doğruluk derecelerinin yüksek olduğunu göstermiştir. Sinyal / gürültü oranları ile belirlenen tayin ve tanınma sınırları sırasıyla 1,0 ng.mL⁻¹ ve 0,3 ng.mL⁻¹ olarak bulunmuştur.

Plazmada geliştirilen yöntemin farmakokinetik çalışmalara uygulanabilirliği, sağlıklı bir gönüllünün tek doz 20 mg ME almasının ardından çeşitli zaman aralıklarında toplanan kan örnekleri analiz edilerek incelenmiştir. Sonuçlardan elde edilen C_{maks.}, t_{maks.}, t_{1/2,el}, AUC_{0-∞} gibi farmakokinetik parametreler literatür bilgileriyle uygunluk gösterdiğinden geliştirilen yöntemden maddenin rutin analizlerinin yanısıra biyoyararlanım, biyoeşdeğerlik çalışmalarında da yararlanılabileceği belirlenmiştir.

Tabletlerde geliştirilen yöntem farmakopelerde ve literatürde kayıtlı bir tablet analizi yöntemi bulunmayan ilaç maddesi için görünür bir ihtiyacı karşılayacaktır.

Plazmada geliştirilen yöntem ise biyolojik sıvılarda ME'nin tayini için literatürde bildirilen çalışmalar ile karşılaştırıldığında şu sonuçlara varılabilir. Maddenin HPLC ile yapılmış çalışmalarından üç tanesi [12-14] türevlendirmeye dayanmakta olup

bunlardan iki tanesi fluorimetrik [12,13] bir tanesi spektrofotometrik [14] dedeksiyona dayanmaktadır. Geliştirilen yöntem hem reaksiyon süresi hem de hassasiyet açısından fluorimetrik dedeksiyona dayanan diğer iki yöntemden üstündür. Spektrofotometrik dedeksiyona dayanan yöntemin reaksiyon süresi kısa olmasına rağmen tayin ve tanınma sınırları farmakokinetik çalışmalarda kullanılamayacağını göstermektedir. Diğer yöntemlerden LC-MS ya da GC-MS olanların birçoğunun hassasiyetleri oldukça iyi olmasına rağmen bu cihazlar hala her ilaç laboratuvarında bulunamayacak kadar pahalıdır. Sonuçta geliştirilen yöntem hassasiyet açısından türevlendirmeye dayanan diğer HPLC çalışmalarının tümünden reaksiyon süresi açısından ise bir kısmından avantajlıdır. Ayrıca kütle dedeksiyonu kadar pahalı olmayan bir cihaza gereksinim duyması açısından kolay uygulanabilir bir yöntemdir.

Bu çalışmada farmasötik preparatlarda ve plazmada ME tayini için basit, duyarlı, tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği yüksek yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. ME ile FMOC arasındaki reaksiyonun zahmesiz ve basit olması, reaksiyon ortamından ekstraksiyon yapmaya gerek olmaması, ME'nin plazmadan geri kazanım oranının ve tekrarlanabilirliğin iyi olması, basit bir kromatografi sistemi ve dedektörü kullanılması yöntemin başlıca üstünlükleridir. Sonuç olarak geliştirilen bu yöntem hem rutin farmasötik analizlerde, hem de biyoyararlanım, biyoeşdeğerlik çalışmalarında ilacın düşük konsantrasyonlarının plazmada takip edilmesinde rahatlıkla kullanılabilir niteliktedir.

KAYNAKLAR

1. Mayeux R., Sano M. Treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1999, **341**: 1670-9.
2. Parsons C.G., Danysz W., Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist- a review of preclinical data *Neuropharmacology* 1999, **38**: 735-767.
3. Sonkusare S.K., Kaul C.L., Ramaro P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders- memantine, a new hope. *Pharmacological Research* 2005, **51**: 1-17.
4. Reichova N., Pazourek J., Polaskova P., Havel J. Electrophoretic behavior adamantane derivatives possessing antiviral activity and their determination by capillary zone electrophoresis with indirect injection. *Electrophoresis* 2002, **23**: 259-262.
5. Süzer Ö, *Süzer Farmakoloji İstanbul, Klinisyen Tıp Yayınları*;s 2005.
6. Jarvis B., Figgitt D.P. Memantine. *Drugs Aging* 2003, **20**: 465-476.
7. Suckow R.F. Separation methods for tricyclic antiviral drugs. *Journal of Chromatography B* 2001, **764**: 313-325.
8. Periclou A., Ventura D., Rao N., Abramowitz W. Pharmacokinetic study of memantine in healthy and renally impaired subjects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2006, **79**: 134-143.
9. Erişim: s04.01.2006, Rx list the internet drugindex, <http://www.rxlist.com/cgi/generic3/namenda-cp.htm>.
10. Erişim: 04.01.2006, <http://www.medscape.com/druginfo/monograph>.
11. Higashi Y., Fujii. Simultaneous determination of the binding of amantadine and its analogues to synthetic melanin by liquid chromatography after precolumn derivatization with dansyl chloride. *Journal of Chromatographic Science* 2005 , **43**: 213-217.
12. Duh T.H., Wu H.L., Kou H.S., Lu C.Y., (2-Naphthoxy) acetyl chloride, a simple fluorescent reagent. *Journal of Chromatography A* 2003, **987**: 205-209.

13. Suckow R.F., Zhang M.F., Collins E.D., Fischman M.W., Cooper T.B. Sensitive and selective liquid chromatographic assay of memantine in plasma with fluorescence detection after pre-column derivatization. *Journal of Chromatography B* 1999, **729**: 217-224.
14. Shuangjin C., Fang F., Han L., Ming M. New method for high-performance liquid chromatographic determination of amantadine and its analogues in rat plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007, **44**: 1100-1105.
15. Koeberle M.J., Patrick M.H., Wilson C.G., Skellern G.G. Development of a liquid chromatography-mass spectrometric method for measuring the binding of memantine to different melanins. *Journal of Chromatography B* 2003, **787**: 313-322.
16. Almeida A.A., Campos D.R., Bernasconi G., Calafatti S., Barros F.A.P., Eberlin M.N., Meurer E.C., Paris E.G., Pedrazzoli J. Determination of memantine in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: Application to a bioequivalence study. *Journal of Chromatography B* 2007, **848**: 311-316.
17. Wesemann W., Schollmayer J.D., Sturn G. Gas chromatographic and mass spectrophotometric studies on metabolites of adamantane amines excreted with urine. *Arzneim. Forsch.* 1977, **27** : 1471-1477.
18. Wesemann W., Sturn G. Funfgeld E.W. Distribution of metabolism of the potential antiparkinson drug memantine in human. *Journal of Neural Transm. Suppl.* 16 1980.
19. Freudenthaler S., Meineke I., Schreeb K.H., Boakye E., Gunderremy U., Gleiter C.H. Influence of urine pH and urinary flow on the renal excretion of memantine. *Journal of Clinical Pharmacology* 1998, **541**.
20. Leis H.J., Fauler G., Windischhofer W. Quantitative analysis of memantine in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry.* 2002, **37**: 477-480.

21. Ptacek P., Klima J., Macek J. Determination of alendronate in human urine as 9-fluorenylmethyl derivative by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 2002, **767**: 111-116.
22. Aymard G., Labarthe B., Warot D., Berlin I., Diquet B. Sensitive determination of ephedrine and norephedrine in human plasma samples using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 2000, **744**: 25-31.
23. Bellagamba F., Moretti V.M., Mentasti T. Albertini A. High-performance liquid chromatographic determination of polyamines in milk as their 9-fluorenylmethoxycarbonyl derivatives using a column-switching technique. *Journal of Chromatography A* 1997, **791**: 79-84.
24. Kim J.W., Kim S.U., Lee H.S., Kim I., Ahn M.Y., Ryu K.S. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2003 **1002**: 93-99.
25. Torano J.S., Guchelaar H.J. Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 1998 **720**: 89-97.
26. Yuh Y.S., Chen J.L., Chiang C.H. Determination of blood sugars by high pressure liquid chromatography with fluorescent detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998 **16**: 1059-1066.
27. Bahrami G., Mirzaeei S., Kiani A. Sensitive analytical method for Topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography A* 2004 **813**: 175-180.
28. Bahrami G., Kiani A. Sensitive high-performance liquid chromatographic quantitation of gabapentin in human serum using liquid-liquid extraction and pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Journal of Chromatography B* 2006, **835**: 123-126.

29. Tandy S., Schulin R., Suter M. J. F., Novack B. Determination of [S,S]-ethylenediamine disuccinic acid (EDDS) by high performance liquid chromatography after derivatization with FMOc. *Journal of Chromatography A* 2005, **1077**: 37-43.
30. Kazachkov M., Yu P.H.. Novel HPLC procedure for detection and quantification of aminoacetone, a precursor of methylglyoxal, in biological samples. *Journal of Chromatography B* 2005, **824**: 116–122.
31. Hutson P.R., Crawford M.E., Sorkness R.L. Liquid chromatographic determination of hydroxyproline in tissue samples. *Journal of Chromatography B* 2003, **791**: 427–430.
32. Bahrami G., Mohammadi B. A new on-line, in-tube pre-column derivatization technique for high performance liquid chromatographic determination of azithromycin in human serum. *Journal of Chromatography B* 2006, **830**: 355-358.
33. Pericás C.C., Falcó P.C., Hernández R.H. Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the determination of amphetamines by liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 2004, **333**: 328-335.
34. Pericás C.C., Hernández R.H., Falcó P.C. A new selective method for dimethylamine in water analysis by liquid chromatography using solid-phase microextraction and two-stage derivatization with *o*-phthalaldehyde and 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Talanta* 2005, **66**: 139–1145.
35. Stead D.A., Richards R.M.E. Sensitive fluorimetric determination of gentamicin sulfate in biological matrices using solid-phase extraction, pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 1996, **675**: 295-302.
36. Nedelkoska T.V., Low G.K.C. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytica Chimica Acta* 2004, **511**: 145–153.
37. Llasera M.P.G., Almaraz L.G., Avila L.E.V., Alvarez A.P. Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. *Journal of Chromatography A* 2005 **1093**: 139–146.

38. Staffeldt B., Brockmöller J., Roots I. Determination of S-carboxymethylcysteine and some of its metabolites in urine and serum by high performance liquid chromatography using fluorescent pre column labelling. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications* 1991, **571**: 133-147.

39. Ekegren T., Trolin C.G. Determination of polyamines in human tissues by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 2005, **338**: 179-185.

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

41. Liu Z., Sha Y., Huang T., Yang B., Duan G.L. High-performance liquid chromatographic determination of vertilmicin in rat plasma using sensitive fluorometric derivatization. *Journal of Chromatography B* 2005, **828**: 2–8.

42. Schwarz E.L., Roberts W.L., Pasqualia M. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta* 2005, **354**: 83–90.

43. Wheal M:S., Heller L.I., Norvell W.A., Welch R.M., Reversed-phase liquid chromatographic determination of phytometallophores from Strategy II Fe-uptake species by 9-fluorenylmethyl chloroformate fluorescence. *Journal of Chromatography A* 2002, **942**: 177–183.

44. Zhu X., Cai J., Yang J., Su Q. Determination of glucosamine in impure chitin samples by high-performance liquid chromatography. *Carbohydrate Research* 2005, **340**: 1732–1738.

45. Liang G.S., Warren L.B., Reginald F.C. Isolation of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivative in the determination of sulphamethazine. *Mikrochimica Acta* 1998, **128**: 31-36.

46. Hernandez R.H., Pericas C.C., Andres J.V., Falco P.C. An evaluation of solid phase microextraction for aliphatic amines using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2006, **1104**: 40-46.

47. British Pharmacopeia 1988, Appendix ID.

48. Tulus R.M. *Kantitatif Kimyasal Analiz* İstanbul, Şirketi Mürettibiye Basımevi; 1971.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Personel Daire Başkanlığı



Sayı :
Konu :

/ 27637

02...111...1200 €

02.11.2006* 50856

ECZACILIK FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 28.08.2006 tarihli 2750 sayılı yazınız.

Fakülteniz Analitik Kimya Anabilim Dalında Araş.Gör.Ş.Evrinm TEKKEK'in yürüteceği "Memantin İçin Kandidatif Analiz Yöntemleri" başlıklı doktora çalışması hakkındaki ilgi yazınız ve ekleri 10 Ekim 2006 tarihinde toplanan Etik Kurulunca müzakere edilerek, etik açıdan uygun olduğuna karar verildiğine ilişkin Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığından alınan 17.10.2006 tarihli 26513 sayılı yazının fotokopisi ilişikte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr.İrfan PAPİLA
Rektör a.
Rektör Yardımcısı

Ek : 1 yazı ve eki
Dosya

3458
6.11.2006

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Şerife Evrim	Soyadı	Tekkeli
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	30.08.1979
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	31684828932
Email	evrimkepekci@yahoo.com	Tel	05358260871

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı	2003
Lisans	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi	2001
Lise	Şehremini Anadolu Lisesi	1997

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı	2001-2007
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	64	
İtalyanca	Orta	Orta	Orta		İtalyan Kültür Merkezi 8kurluk İtalyanca Dil Eğitimi Kursunun 4 kuruna Katılım Belgesi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	60/80	60/80	61/80
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi

Yayınlar:

Önal A., Kepekçi Ş.E., Öztunç A. Spectrophotometric Methods for the Determination of Antidepressant Drug Paroxetine Hydrochloride in Tablets. *Journal of AOAC International* 2004, **88 (2)**, 490-495.

Kepekçi Ş.E., Öztunç A. Determination of Maprotiline Hydrochloride by Ion-Pair Extraction Using Bromophenol Blue and Bromocresol Purple. *Acta Pharmaceutica Turcica* 2005, **47 (1)**, 65-73.

Önal A., Serturk S., Kepekçi Ş.E., Çetin S.M., Spectrophotometric Determination of Certain Antidepressants in Pharmaceutical Preparations. *Journal of AOAC International* 2006.

Tebliğler (Poster sunumları):

“Spectrophotometric Determination of Paroksetin in Tablets Using Bromothymol Blue and Bromocresol Green” 3th Aegean Analytical Chemistry Days, Midilli/Yunanistan 2002.

“Extractive Spectrophotometric Methods for the Determination of Maprotiline in Tablets” 4th Aegean Analytical Chemistry Days, Kuşadası-Aydın/Türkiye 2004.

“Spectrophotometric Determination of Certain Antidepressants in Pharmaceutical Preparations” 1st European Chemistry Days, Budapeşte/Macaristan 2006.

Diğer Kongre Katılımları:

HPLC ve Diğer Separasyon Teknikleri Ulusal Sempozyumu, GATA, 2003.

7th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2003.