

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**SPEKTROFLUORİMETRİK YÖNTEM İLE GABAPENTİN
TAYİNİ VE FARMASÖTİK PREPARATLARA
UYGULANMASI**

ELİF KEL

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SEVGİ TATAR ULU**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

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

06 / 07 / 2010

 Prof. Dr. Tamer DEMİRALP
 V. Müdür

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
 Program Adı : Analitik Kimya
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
 Anabilim Dalı : Analitik Kimya
 Tez Sahibi : Elif Kel
 Tez Başlığı : Spektrofluorimetrik Yöntem İle Gabapentin Tayini ve Farmasötik Preparatlara Uygulanması
 Sınav Yeri : İstanbul Üniversitesi, Ecz. Fak., B Blok Seminer Salonu
 Sınav Tarihi : 29 / 06 / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1. Prof. Dr. Ufuk Kolak (Başkan), İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fak., Analitik Kimya AD., Genel Kimya Bilim Dalı 
2. Doç. Dr. Sevgi Tatar Ulu (Danışman), İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fak., Analitik Kimya AD. 
3. Doç. Dr. Armağan Önal, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fak., Analitik Kimya AD. 
4. Doç. Dr. Olcay Sağırlı, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fak., Analitik Kimya AD. 
5. Yard. Doç. Dr. Filiz Arıöz Özdemir, Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fak., Analitik Kimya AD. 

BEYAN

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

Elif KEL

(İmza)



İTHAF

Dünyaya gözlerini yeni açan biricik yeğenim *Eylül*'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aysel Öztunç’a, özveri ile yardımlarını eksik etmeyen çalışmalarımı bilgi ve tecrübesiyle yönlendiren Tez Danışmanım, Doç. Dr. Sevgi Tatar Ulu’ya, her zaman yanımda olan babama, anneme, abime, kardeşime ve bana daima destek olan Sarp Özdemir’e teşekkür ederim.

Ayrıca tezin hazırlanması aşamasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Sena Çağlar’a içtenliğimle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: BYP 4254

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Gabapentin	2
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	2
2.1.2. Farmakolojisi	4
2.1.3. Analiz Yöntemleri.....	4
2.2. 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan Hakkında Genel Bilgi ve Bu Belirteçle Yapılan Çalışmalar	10
2.2.1. Analiz Yöntemleri.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	16
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	16
3.1.2. Çözeltiler	16
3.2. Aletler ve Diğer Gereçler	17
3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar	18
3.3.1. Türevlendirme İçin Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi	18
3.3.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü	18
3.3.1.2. pH	18

3.3.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi	19
3.3.1.4. Belirteç Miktarı	19
3.3.1.5. Türevin Dayanıklılığı	19
3.3.1.6. Asit Miktarı	19
3.3.1.7. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrisi Hazırlanması	20
3.4. Kapsüllerde Gabapentin Miktar Tayini	20
3.4.1. Spektrofluorimetrik Yöntem İle	20
3.4.2. Kıyas Yöntemi İle	20
3.5. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	21
3.5.1. Doğrusallık	21
3.5.2. Tanıma (LOD) ve Miktar Tayin (LOQ) Sınırları	22
3.5.3. Kesinlik ve Doğruluk	22
3.5.4. Robustness (Yöntemin Sağlamlığı)	22
3.5.5. Seçicilik	22
4. BULGULAR	23
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar	23
4.1.1. Gabapentinin NBD-F ile Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi	23
4.1.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü	23
4.1.1.2. pH	25
4.1.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi	26
4.1.1.4. Belirteç Miktarı	28
4.1.1.5. Türevin Dayanıklılığı	29
4.1.1.6. Asit Miktarı	29
4.1.1.7. Sulu Çözeltide Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi	30
4.1.1.8. Geliştirilen Yöntem ile Kapsüllerde Gabapentin Tayini ve Sonuçların Kıyas Yöntemi ile Karşılaştırılması	32
4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	34
4.2.1. Doğrusallık	34
4.2.2. Tanıma (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları	34
4.2.3. Kesinlik ve Doğruluk	34
4.2.4. Robustness (Yöntemin Sağlamlığı)	36
4.2.5. Seçicilik	37

5. TARTIŞMA	38
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ	50

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Gabapentin–NBD türevinin çeşitli organik çözücülerdeki maksimum eksitasyon (λ_{eks}) ve emisyon (λ_{em}) dalga boyları ile floresans şiddeti değerleri.....	23
Tablo 4-2: Çeşitli pH larda oluşturulan gabapentin-NBD türevine ait floresans şiddeti değerleri.....	25
Tablo 4-3: Çeşitli sıcaklık ve zamanlarda oluşturulan gabapentin–NBD türevine ait floresans şiddeti değerleri.....	27
Tablo 4-4: Çeşitli mol oranlarında oluşturulan gabapentin–NBD türevine ait floresans şiddeti değerleri	28
Tablo 4-5: Oda temperaturünde karanlıkta ve gün ışığında, +4 °C de karanlıkta bekletilen gabapentin-NBD türevinin etilasetattaki dayanıklılığı.....	29
Tablo 4-6: Gabapentinin spektrofotometrik tayini için 10–100 ng.mL ⁻¹ konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrilerine ait floresans şiddeti değerleri ve istatistik verileri.....	31
Tablo 4-7: Tablo 4-6’ daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreleri....	31
Tablo 4-8: 100 mg gabapentin içeren kapsüllerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi.....	33
Tablo 4-9: Tablo 4-7’ deki değerlere göre hazırlanan LOD ve LOQ değerleri.....	34
Tablo 4-10: Gün içinde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.....	35
Tablo 4-11: Günler arası yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.....	36
Tablo 4-12: Yöntemin sağlamlığının incelenmesinde elde edilen sonuçlar.....	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Gabapentinin kimyasal formülü.....	2
Şekil 2-2: Gabapentinin 0,1 N HCl çözeltisinde (1), suda (2) ve metanolde (3) hazırlanan 300 µg.mL ⁻¹ konsantrasyondaki çözeltilerinin UV spektrumu.....	3
Şekil 2-3: Gabapentinin KBr diskinde alınan FT-IR spektrumu.....	3
Şekil 2-4: NBD-F' ün kimyasal formülü.....	10
Şekil 4-1: 40 ng.mL ⁻¹ gabapentine eşdeğer gabapentin-NBD türevinin etilasetattaki emisyon spektrumu ($\lambda_{em} = 521$ nm)	24
Şekil 4-2: 40 ng.mL ⁻¹ gabapentine eşdeğer gabapentin-NBD türevinin etilasetattaki eksitasyon spektrumu ($\lambda_{eks} = 458$ nm).....	24
Şekil 4-3: Boşun emisyon spektrumu.....	25
Şekil 4-4: Gabapentin-NBD türevinin oluşumu üzerine pH'nın etkisi	26
Şekil 4-5: Gabapentin-NBD türevinin oluşması üzerine sıcaklık ve zaman etkisi	27
Şekil 4-6: Gabapentin-NBD türevinin oluşumu üzerine belirteç miktarının etkisi.....	28
Şekil 4-7: Gabapentinin 10-100 ng.mL ⁻¹ konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	32

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABT-089	: [2-Metil-3-(2-(S)-pirolidinmetoksi) piridin]
C ₁₈	: Oktadesil silan
CE	: Kapiler Elektroforez
C _{maks}	: Maksimum konsantrasyon
CZE	: Kapiler Zone elektroforez
DBD-F	: 4-(N,N-dimetil aminosülfonil)-7-fluoro-2, 1, 3 benzoksadiazol
FMOC-Cl	: 9-Fluorenilmetil kloroformat
FS	: Fluoreskamin
FT-IR	: Fourier dönüşümlü infrared
GC	: Gaz kromatografisi
GC-MS	: Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi
GC-MS/MS	: Gaz kromatografisi-tandem kütle spektrometresi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi
LIF	: Lazer Uyarılmış Fluoresans Dedektör
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
MD-CE	: Mikrodiyaliz Kapiler Elektroforez
NBD-F	: 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan
NQS	: 1.2 - Naftakinon 4-sülfonik asit
OPA	: o-Ftalaldehit
PDAB	: p-Dimetil aminobenzaldehit
RSD	: Bağlı standart sapma

RME	: Bağıl ortalama hata
TMA-B	: Tetrametil amonyum bromür
t_{maks}	: Maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşma zamanı
TNBS	: Trinitrobenzen sülfonik asit
UV	: Ultraviyole

ÖZET

Kel, E. Spektrofluorimetrik Yöntem ile Gabapentin Tayini ve Farmasötik Preparatlara Uygulanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2010

Gabapentin yapısal olarak γ -aminobutirik asit (GABA)'e benzeyen bir antiepileptik ilaç maddesidir.

Bu çalışmada, gabapentinin miktar tayini için duyarlı bir spektrofluorimetrik yöntem geliştirilmiştir. Yöntem, primer ve sekonder aminlerin analizinde spesifik bir belirteç olan 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) ile gabapentinin türevlendirilmesine dayanmaktadır. Gabapentin ile NBD-F arasındaki reaksiyonun optimum koşulları incelendiğinde reaksiyonun pH 9,5 da 70 °C de 30 dakika içerisinde belirteç/gabapentin mol oranı 6 olduğunda kantitatif olarak yürüdüğü belirlendi. Reaksiyonun tamamlanmasından sonra türev, asitlendirilmiş reaksiyon ortamından etilasetat ile ekstre edildi ve floresans şiddeti 521 nm dalgaboyunda (eksitasyon dalga boyu 458 nm) ölçüldü.

Geliştirilen bu yöntem gabapentinin kapsüllerdeki miktar tayinine başarı ile uygulandı. Elde edilen sonuçlar, farmakope yöntemi (USP XXXII) ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. İki yöntem arasında ortalamalar ve standart sapmalar yönünden %95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: Gabapentin, 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F), spektrofluorimetri, türevlendirme, miktar tayini

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: BYP-4254

ABSTRACT

Kel, E. (2010). Spectrofluorimetric determination of gabapentin in pharmaceutical preparations. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. İstanbul.

Gabapentin is an antiepileptic drug which is structural analogue of γ -aminobutyric acid.

In this study a sensitive spectrofluorimetric method has been developed for the determination of gabapentin. The assay involves derivatization with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) which is a specific reagent in the analysis of primary and secondary amines. Optimum conditions of the reaction between the drug and NBD-F were investigated and it was found that the reaction proceeds quantitatively at pH 9.5, 70 °C in 30 min when the mole ratio of reagent to the drug was 6. After the completion reaction, the derivative was extracted with ethyl acetate from the reaction medium and the fluorescence intensity was measured at 521 nm with excitation at 458 nm.

The developed method was successfully applied to the assay of gabapentin in capsules and the results were compared statistically with those obtained by pharmacopeia method (USP XXXII). There is no significant difference between the two methods in the respect of mean values and the standard deviations at 95 % confidence level.

Key Words: Gabapentin, 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F), spectrofluorimetric method, derivatization, determination

The present work was supported by the Research Project Coordination Fund of Istanbul University. Project No. BYP-4254

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gabapentin, epilepsi tedavisinde kullanılan bir ilaç etken maddesidir. Epilepsi beyin içinde bulunan sinir hücrelerinin anormal bir elektrokimyasal deşarj yapması sonucu ortaya çıkan nörolojik hastalıktır. Beynin normalde çalışması ile ilgili elektriğin aşırı ve kontrolsüz yayılımı sonucu oluşur. Sıklıkla geçici bilinç kaybına neden olur.

Gabapentin, glutamat dekarboksilaz enzimi aktivitesini uyararak GABA (γ -aminobutirik asit) sentezini artırır. Metabolitlere ayrılmadan elimine olur. Diğer ilaçlarla düzeltilemeyen epilepsilerin tedavisinde önerilmektedir (1).

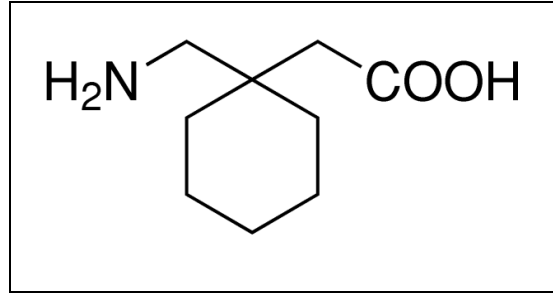
Amin grubu içeren ilaç etken maddelerinin analizleri için geliştirilen yöntemlerin çoğu türevlendirme reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu amaçla kullanılan belirteçler arasında önemli bir yere sahip olan 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) primer ve sekonder aminlerin spektrofotometrik analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada primer amin grubu içeren gabapentinin tayini için basit, duyarlı ve güvenilir bir spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması düşünüldü. Bu amaçla primer amin grubu içeren gabapentinin NBD-F ile renkli bir türev oluşturmaktan yararlanılarak spektrofotometrik bir yöntem geliştirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gabapentin

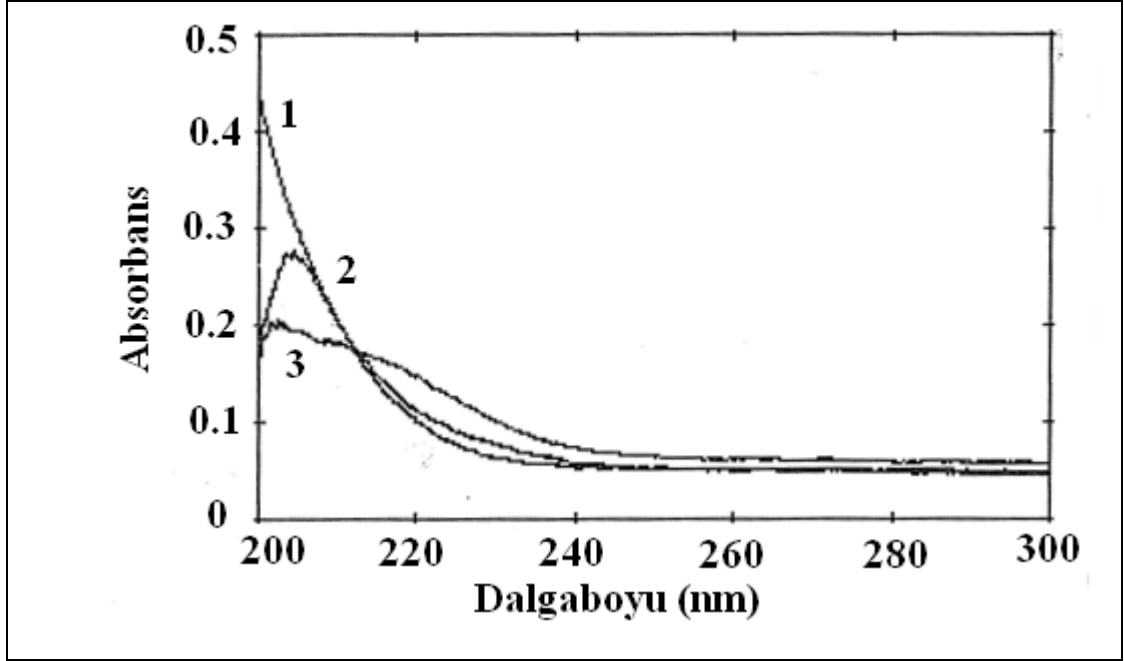
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



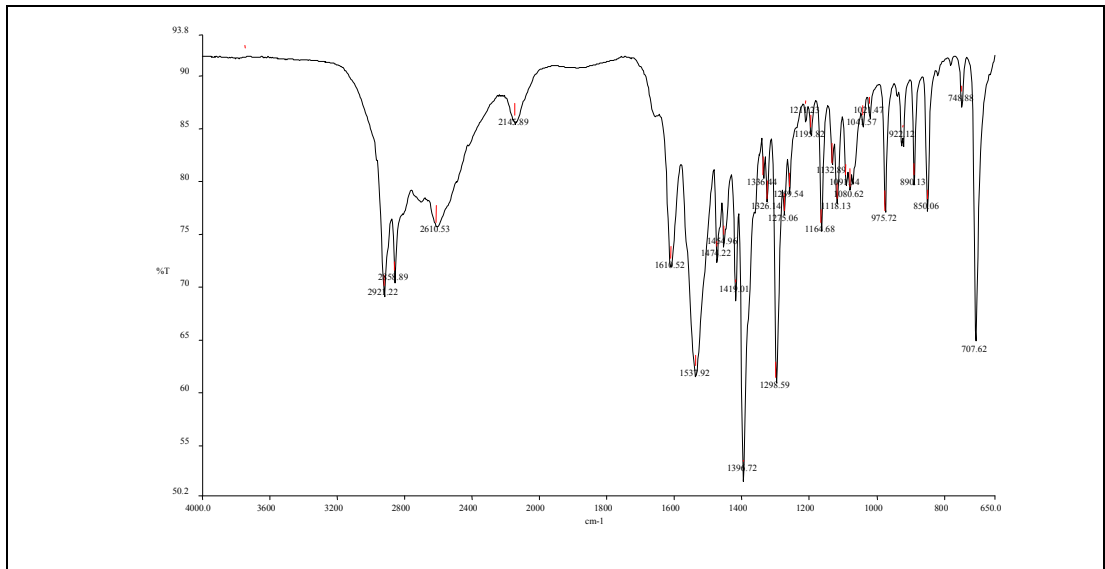
Şekil 2-1: Gabapentinin kimyasal formülü

Kimyasal adı 1-(aminometil)-sikloheksanasetikasit (Şekil 2.1) dir. Kapalı formülü $C_9H_{17}NO_2$ olan gabapentinin molekül ağırlığı $171,24 \text{ g.mol}^{-1}$ dür. Gabapentin su, asidik ve bazik çözücülerde kolay çözünen, beyaz toz halinde bir bileşiktir. pK_{a1} 3,7, pK_{a2} 10,7 dir. Erime derecesi $165-167 \text{ }^\circ\text{C}$ ve elementel analizine ait değerler C % 63,13, H % 10,01, N % 8,18, O % 18,69 olarak bildirilmiştir (2).

Gabapentinin çeşitli çözücülerde alınan UV spektrumları Şekil 2.2 de verilmiştir. Maddenin Fourier Dönüşümlü İnfrared (FT-IR) spektrumu Şekil 2.3 de görülmektedir.



Şekil 2-2: Gabapentinin 0,1 N HCl çözeltisinde (1), suda (2) ve metanolde (3) hazırlanan $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki çözeltilerinin UV spektrumu



Şekil 2-3: Gabapentinin KBr diskinde alınan FT-IR spektrumu

2.1.2. Farmakolojisi

Gabapentin, epilepsi tedavisinde kullanılan bir ilaç etken maddesidir. Sekonder jeneralize konvülsiyonların eşlik ettiği ya da etmediği basit ya da kompleks parsiyel konvülsiyonlu yetişkin ve 12 yaş üstü çocuk hastaların tedavisinde monoterapi ya da ek tedavi olarak kullanılır. 12 yaşından küçük çocuklarda monoterapi ile ilgili olarak yeterli deneyim yoktur.

Mide-barsak kanalından % 60'a yakın bir oranda absorbe edilir. Absorpsiyonu antiasit ilaçlar tarafından azaltılabilir. Plazma proteinlerine bağlanmaz. Karaciğerde metabolizma edilmez ve değişmeden böbreklerden atılır. Bu farmakokinetik özellikleri nedeniyle diğer ilaçlarla etkileşme göstermez. Bu durum epilepsi tedavisinde kombine kullanılacak bir ilaç için üstünlük sağlar (3).

Gabapentinin biyoyararlanım ve atılımına ait değerler şöyle özetlenebilir: Sağlıklı gönüllüler tarafından 400 mg tek doz gabapentin alımını takiben C_{maks} : 5,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, t_{maks} : 2-3 saattir. Eliminasyon yarılanma ömrü 5-7 saattir. Gabapentinin atılım parametreleri, yani plazma yarılanma süresi ve renal klirensi, doza bağlı değildir ve tekrarlanan doz uygulamalarında değişmez. Renal klirens, gabapentin için başlıca atılım yoludur. Gabapentin insanlarda saptanabilir ölçüde metabolize olmadığından, idrarda saptanan ilaç miktarı, gabapentinin biyoyararlanımının göstergesidir (4).

2.1.3. Analiz Yöntemleri

Farmasötik preparatlarda yapılan analizler

Ribeiro ve arkadaşları farmasötik preparatlarda gabapentini NQS ile türevlendirdikten sonra akış enjeksiyonlu spektrofotometrik yöntemle tayin etmişlerdir. Doğrusallık 5×10^{-5} - 2×10^{-3} mol.L^{-1} olarak bildirilmiştir (5).

Ayad ve arkadaşları farmasötik preparatlarda gabapentinin tayini için asetilaseton ve formaldehit ile reaksiyon sonrası oluşan renkli ürünün absorbansını 335 nm dalgaboyunda ve floresans şiddetini 474 nm de ölçerek spektrofotometrik ve spektrofluorimetrik yöntem geliştirmişlerdir. Doğrusallık spektrofotometrik yöntem için 0,05–2,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, spektrofluorimetrik yöntem için 0,05-0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (6).

Gujral ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada farmasötik preparatlarda gabapentin HPLC yöntemiyle tayin edilmiştir. Ayrılma C_{18} kolonda, metanol-potasyum dihidrojen ortofosfat (20:80) mobil faz sistemi ile yapılmıştır. Dedeksiyon 275 nm de UV absorbans dedektör ile gerçekleştirilmiştir (7).

Souri ve arkadaşları farmasötik preparatlarda 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen ile türevlendirdikleri gabapentini HPLC yöntemi ile tayin etmişlerdir. Ayrılma C_{18} kolon ve asetonitril-sodyum dihidrojenfosfat (pH 2,5) (70:30) mobil faz sistemi ile gerçekleştirilmiştir. İnternal standart olarak amlodipin kullanılmıştır. Dedeksiyon UV absorbans dedektör ile 360 nm de yapılmıştır (8).

Ciavarella ve arkadaşları gabapentini ve bozunma ürünlerini tayin etmek için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde ayrılma asetonitril-patsyum dihidrojen fosfat (pH 6,2) (8:92) mobil faz sisteminde ve UV absorbans dedektörde 210 nm de gerçekleştirilmiştir (9).

Sekar ve arkadaşları farmasötik preparatlarda gabapentinin tayini için CE yöntemini geliştirmişlerdir. Analiz 74 cm silika kapiler kolonda, pH 11,0 de yapılmıştır. Dedeksiyon UV absorbans dedektör ile 215 nm de gerçekleştirilmiştir (10).

Biyolojik Sıvılarda Yapılan Analizler

Wolf ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada serumda gabapentin, gaz kromatografisi yöntemiyle tayin edilmiştir. Türevlendirme ajanı olarak N-metil-N-tersiyer-butildimetilsililtri fluoroasetamid kullanılmıştır. Dedeksiyon alev iyonlaştırma dedektörü kullanılarak yapılmıştır (11).

Hooper ve arkadaşlarının geliştirdikleri gaz kromatografisi yönteminde gabapentin plazma ve idrarda tayin edilmiştir (12).

Kushnir ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada insan serumunda ve plazmasında gabapentin GC-MS yöntemiyle tayin edilmiştir. Bu yöntemde doğrusallık 1,0-35,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, tanıma sınırı 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (13).

Borrey ve arkadaşları insan serumunda gabapentin ve vigabatrinin yanyana tayini için GC-MS yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntemde doğrusallık gabapentin için 5-30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ve tanıma sınırı 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (14).

Gambelunghe ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir başka çalışmada insan serumunda gabapentin GC-MS/MS yöntemiyle tayin edilmiştir. Bu yöntemde doğrusalılık $1-9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (15).

Matar ve arkadaşları insan plazmasında gabapentini tandem-MS yöntemiyle tayin etmişlerdir. Ayrılma asetonitril-su-formik asit (50:50:0.025) ile yapılmıştır. Doğrusallık $0,1-10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (16).

Ji ve arkadaşları insan plazmasındaki gabapentini LC-MS/MS yöntemiyle tayin etmişlerdir (17).

Ojha ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada insan plazmasında gabapentin LC-MS yöntemiyle tayin edilmiştir. Yöntemde C_{18} kolon kullanılmıştır. Doğrusallık $0,5-64 \text{ ng.mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (18).

Ramakrishna ve arkadaşları insan plazmasında gabapentini tayin etmek için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Gabapentin C_{18} kolonda amonyum format (pH 3,5) asetonitril mobil faz sistemi ile analiz edilmiştir. Tanıma sınırı 10 ng.mL^{-1} olarak bildirilmiştir (19).

Carlsson ve arkadaşları kanda gabapentini LC-MS/MS yöntemiyle tayin etmişlerdir. Bu yöntemde ayrılma C_{18} kolonda, amonyum asetat-metanol mobil faz sistemi ile gerçekleştirilmiş, internal standart olarak (S)-(+)- α -amino-sikloheksan propiyonik asit kullanılmıştır. Tanıma sınırı 16 ng.mL^{-1} olarak bildirilmiştir (20).

Gauthier ve arkadaşları gabapentinin plazmada tayini için OPA ile türevlendirmeye dayanan HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrılma C_{18} kolonda yapılmıştır. Dedeksiyon floresans dedektör ile 350 nm eksitasyon, 450 nm emisyon dalgaboylarında gerçekleştirilmiştir (21).

Lensmeyer ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada serumda gabapentini tayin etmek için geliştirdikleri HPLC yönteminde C_{18} kolon ve internal standart olarak heptanasetik asit kullanılmıştır. Dedeksiyon UV absorbans dedektör ile 340 nm de yapılmıştır (22).

Forrest ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada insan plazmasında gabapentin HPLC yöntemiyle tayin edilmiştir. Dedeksiyon floresans dedektör ile

eksitasyon dalga boyu 330 nm, emisyon dalgaboyu 440 nm de gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğrusallığı 1,0-10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (23).

Jurgens ve arkadaşları serumda gabapentin ve vigabatrini yanyana tayin etmek için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde maddeler OPA-merkaptotanol ile türevlendirilmiştir (24).

Wad ve arkadaşları serum ve idrarda vigabatrin ve gabapentini yanyana tayin etmek için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde kolon öncesi türevlendirme belirteci olarak TNBS kullanılmıştır. Yöntemin tanıma sınırı 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (25).

Tang ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada insan serumunda gabapentin HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir. Yöntemde internal standart olarak 1-(aminometil) sikloheptan asetik asit kullanılmıştır. Ayrılma fosfat tamponu (pH 4,5)-asetonitril (50:50) mobil faz sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon 230 nm eksitasyon, 420 nm emisyon dalgaboylarında fluoresans dedektörle yapılmıştır (26).

Jalalizadeh ve arkadaşları insan plazmasında gabapentini HPLC yöntemiyle tayin etmişlerdir. Yöntemde kolon öncesi türevlendirme belirteci olarak 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen kullanılmıştır. Ayrılma C_{18} kolon ve NaH_2PO_4 (pH 2,5)-asetonitril (30:70) mobil faz sisteminde gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon UV absorbans dedektör ile 360 nm de gerçekleştirilmiştir (27).

Sağırılı ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada insan plazma ve idrarında gabapentin NQS ile türevlendirilmiştir. Ayrılma C_{18} kolon ve asetonitril-ortofosforik asit (pH 3,5) (35:65) mobil faz sisteminde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada doğrusallık plazma için 0,05-5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, idrar için 0,1-10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Dedeksiyon UV absorbans dedektör ile yapılmıştır (28).

Zhu ve arkadaşları insan plazmasında gabapentin tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrılma C_{18} kolon ve sodyum asetat tamponu-metanol-asetonitril (48:40:12) mobil faz sistemiyle gerçekleştirilmiştir. İnternal standart olarak baklofen kullanılmıştır. Dedeksiyon 254 nm dalgaboyunda UV absorbans dedektör ile yapılmıştır. Çalışmada doğrusallık 0,03-10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (29).

Bahrami ve arkadaşları insan serumunda gabapentinin tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. FMOC-Cl ile türevlendirilen gabapentin C_{18} kolonda metanol-

sodyumfosfat tamponu (73:27) içeren mobil faz sistemi ile ayrılmıştır. Dedeksiyon 260 nm eksitasyon, 325 nm emisyon dalgaboylarında fluoresans dedektör ile yapılmıştır. İnternal standart olarak azitromisin kullanılmıştır. Çalışmada doğrusallık 0,03-20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (30).

Qibo ve arkadaşları gabapentini serumda tayin etmek için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde trinitrobenzen ile türevlendirilen gabapentin, C_{18} kolon ve asetat tamponu (pH=3,7)-metanol-asetonitril mobil faz sisteminde ayrılmıştır, internal standart olarak [1-(aminometil) sikloheptan asetik asit]] kullanılmıştır. Çalışmada doğrusallık 10-60 ng.mL^{-1} olarak bildirilmiştir (31).

İnsan serumunda gabapentin ve vigabatrini yanyana tayin etmek için *Daniel ve arkadaşları* tarafından geliştirilen yöntemde, ayrılma C_{18} kolon ve fosforik asit (pH 2,0)-asetonitril mobil faz sistemi ile gerçekleştirilmiştir. İnternal standart olarak 1-aminometil-sikloheptil asetik asit kullanılmıştır. Dedeksiyon 235 nm eksitasyon, 435 nm emisyon dalgaboylarında fluoresans dedektörle yapılmıştır. Yapılan çalışmada doğrusallık 2,54-42,53 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ve tanıma sınırı 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (32).

Vermeji ve arkadaşları, insan serumunda pregabalin, gabapentin ve vigabatrinin yanyana tayini için geliştirdikleri HPLC yönteminde kolon öncesi türevlendirme belirteci olarak OPA yı kullanmışlardır. Türevler C_{18} kolonda metanol-asetonitril-fosfat tamponu (pH 7,0) içeren mobil faz sistemi ile ayrılmıştır. Dedeksiyon $\lambda_{\text{eks}}=330$ nm, $\lambda_{\text{em}}=450$ nm dalgaboylarında fluoresans dedektör ile yapılmıştır. Bu çalışmada internal standart olarak 2-aminopentanoik asit kullanılmıştır. Yöntemin doğrusallığı 0-63 mg.L^{-1} olarak belirlenmiştir (33).

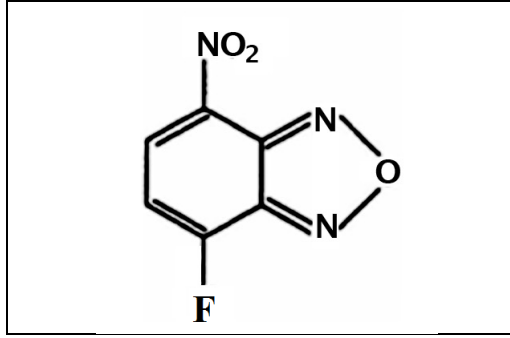
Krivanek ve arkadaşları tarafından bildirilen başka bir çalışmada insan plazmasında vigabatrin ve gabapentini yanyana tayin etmek için dansilklorür ile türevlendirme yapıldıktan sonra HPLC ile tayin yapılmıştır. Oluşan türevler C_{18} kolonda asetonitril, NaH_2PO_4 (40:60) mobil faz sisteminde ayrılmıştır. Dedeksiyon 318 nm eksitasyon, 510 nm emisyon dalgaboylarında fluoresans dedektör ile yapılmıştır (34).

Garcia ve arkadaşları insan serumunda gabapentini CE yöntemiyle tayin etmişlerdir. Yöntemde gabapentin fluoreskamin ile türevlendirilmiştir. Dedeksiyon fluoresans dedektör ile yapılmıştır. Çalışmada doğrusallık 0-12,0 mg.L^{-1} olarak bildirilmiştir (35).

Sarah ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada insan plazmasında gabapentin CE yöntemiyle tayin edilmiştir. Analiz 60 cm kapiler kolonda, pH 9,5 sodyum borat tamponu ile yapılmıştır. Dedeksiyon 488 nm eksitasyon, 520 nm emisyon dalgaboylarında fluoresans dedektör ile gerçekleştirilmiştir (36).

2.2. 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan Hakkında Genel Bilgi ve Bu Belirteçle Yapılan Çalışmalar

Kimyasal adı 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) dır. Kapalı formülü $C_6H_2FN_3O_3$ olan NBD-F ün molekül ağırlığı $183,10 \text{ g.mol}^{-1}$ dür. NBD-F su, metanol, etanol ve asetonitrilde kolay çözünen sarı, kristalize bir tozdur. NBD-F amino asit, primer ve sekonder aminlerle kuvvetli fluoresans gösteren türevler oluşturur (37).



Şekil 2-4: NBD-F ün kimyasal formülü

2.2.1. Analiz Yöntemleri

Baeyens ve arkadaşları bazı nonapeptitleri NBD-F ile türevlendirip akış enjeksiyonlu spektrofotometrik yöntem ile analiz etmişlerdir (38).

Al-Majed ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada D-penisilamini farmasötik preparatlarda NBD-F ile türevlendirmişlerdir. Dedeksiyon 465 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalgaboylarında yapılmıştır (39).

Imai ve arkadaşları aminoasit ve aminleri NBD-F ile türevlendirip HPLC de tayin etmişlerdir. Yöntemde C_{18} kolon kullanılmıştır. Doğrusallık 10-100 fmol olarak bildirilmiştir (40).

Imai ve arkadaşları tarafından bildirilen başka bir çalışmada amino asitler NBD-F ile pH 7,5 da 70° sıcaklıkta 5 dakikada türevlendirilmiştir. Türevleri fluorimetrik olarak tayin etmişlerdir (41).

Hui ve arkadaşlarının bildirdikleri bir çalışmada plazmada ABT-O89, NBD-F ile türevlendirilmiştir. Ayrılma C_{18} kolonda asetonitril-metanol-tetrametilamonyum perklorat-trifluoroasetik asit (18:10:72) içeren mobil faz sisteminde gerçekleştirilmiştir.

Dedeksiyon 495 nm eksitasyon, 533 nm emisyon dalgalıboylarında fluoresans dedektör ile yapılmıştır (42).

Watanabe ve arkadaşları insan serumu ve kanda aminoasitleri NBD-F ile türevlendirip, oluşan türevi HPLC yöntemi ile ayırmışlardır. Dedeksiyon 420 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalgalıboylarında fluoresans dedektör ile yapılmıştır (43).

Aoyama ve arkadaşları amino asit tayinini HPLC yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. Türevlendirme NBD-F belirteci ile pH 9,5 borat tamponunda 40 dakikada gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon 470 nm eksitasyon, 540 nm emisyon dalgalıboylarında fluoresans dedektör ile yapılmıştır (44).

Higashi ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada insan serumu ve idrarında fluoksetin ve norfluoksetin tayini için NBD-F ile türevlendirme yapılmıştır. İnternal standart olarak protriptilin kullanılmıştır (45).

Yoshinaga ve arkadaşları peptidleri NBD-F ile türevlendirdikten sonra HPLC ile analiz etmişlerdir. Yöntemde doğrusalılık 1-100 pmol olarak bildirilmiştir (46).

Sawabe ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada enerji içeceklerinde taurinin tayini için kolon öncesi NBD-F ile türevlendirilen örnekler C₁₈ kolon ve tetrabutıl amonyumbromür-asetonitril mobil faz sisteminde ayrılmıştır. Dedeksiyon fluoresans dedektör ile yapılmıştır (47).

Hamase ve arkadaşları memelilerde bulunan D-aminoasitlerin miktarını tayin etmek amacıyla HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kolon öncesi NBD-F ile türevlendirilen aminoasitler C₁₈ kolonda ayrılmıştır. Dedeksiyon fluoresans dedektör ile yapılmıştır (48).

Higashi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada tavşan plazmasında bromperidol metabolitlerini kolon öncesi NBD-F ile türevlendirdikten sonra oluşan türevi HPLC yöntemiyle analiz etmişlerdir. Ayrılma C₁₈ kolon ve metanol-asetik asit mobil faz sistemi ile gerçekleştirilmiştir (49).

Uchino ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada fare kanında bulunan S-D-laktoglutasyon, NBD-F ile türevlendirildikten sonra HPLC yöntemiyle tayin edilmiştir. Ayrılma C₁₈ kolon ve %0,1 lik trifluoroasetik asit-asetonitril mobil faz

sisteminde gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon 470 nm eksitasyon, 540 nm emisyon dalgaboylarında fluoerans dedektör ile yapılmıştır (50).

Kakinuma ve arkadaşları deri dokusunda hidroksipirolin tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde NBD-F ile oluşan türevler C₁₈ kolonda asetonitril-fosfat tamponu (pH 5,0) içeren mobil faz sisteminde ayrılmıştır. Dedeksiyon 470 nm eksitasyon, 540 nm emisyon dalgaboylarında yapılmıştır (51).

Gozdowska ve arkadaşları balık plazmasında arginin-izotokin ve arginin-vazotokin tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Maddeler pH 9,5 da NBD-F ile türevlendirildikten sonra C₁₈ kolonda asetonitril-su mobil faz sistemi ile analiz edilmiştir. Dedeksiyon 420 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalgaboylarında fluoerans dedektör ile yapılmıştır. Yöntemin doğrusallığı 15-220 pmol.mL⁻¹ olarak belirtilmiştir (52).

Zhu ve arkadaşları katekolaminlerin tayini için geliştirdikleri HPLC yönteminde NBD-F ile türevlendirilen maddeleri C₁₈ kolon ve asetonitril-fosfat tamponu (60:40) içeren mobil faz sisteminde ayırmışlardır. Yöntemde eksitasyon dalgaboyu 480 nm, emisyon dalgaboyu ise 530 nm olarak bildirilmiştir (53).

Zhao ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada insan plazmasında agmatin NBD-F ile türevlendirilmiş, ayrılma C₈ kolonda gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon LIF ile yapılmıştır. Yöntemin tanıma sınırı 5×10⁻⁹ M olarak bildirilmiştir (54).

Namera ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, sulu örneklerde anatoksin NBD-F ile türevlendirilmiş, türevler C₁₈ kolon ve metanol-su (60:40) mobil faz sisteminde ayrılmıştır. Çalışmada eksitasyon dalgaboyu 495 nm, emisyon dalgaboyu 530 nm olarak bildirilmiştir (55).

Bryan ve arkadaşları insan plazmasında ABT-089 tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde kolon öncesi NBD-F ile türevlendirilen madde C₁₈ kolon ve asetonitril-metanol-% 0,1 tetrametilamonyumperklorat (30:5:65) mobil faz sisteminde ayrılmıştır. Dedeksiyon 495 nm eksitasyon, 533 nm emisyon dalgaboylarında yapılmıştır. Çalışmanın doğrusallığı 1,6-836 ng.mL⁻¹ olarak bildirilmiştir (56).

James ve arkadaşları anatoksin-a, homoanatoksin-a ve onların bozunma ürünlerinin analizi için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz C₁₈ kolon ve asetonitril-su (45:55) mobil faz sistemiyle yapılmıştır. Dedeksiyon 470 nm eksitasyon, 530 nm

emisyon dalgalaboylarında fluoresans dedektör ile gerçekleştirilmiştir. Tanıma sınırı $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (57).

Kamisaki ve arkadaşları insan plazmasında nitrotirozin tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde kolon öncesi türevlendirme NBD-F ile yapılmış ve internal standart olarak α -metiltirozin kullanılmıştır (58).

Imai ve arkadaşları aminoasitlerin enantiyomerlerini HPLC yöntemi ile ayırmışlardır. Yöntemde NBD-F ile türevlendirilen maddelerin dedeksiyonu 470 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalgalaboylarında fluoresans dedektör ile yapılmıştır (59).

Scott ve arkadaşları biradaki fumonisinlerin analizi için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde maddeler NBD-F ile türevlendirilmiştir. Yöntemin doğrusallığı $0,7-3,0 \text{ ng.mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (60).

Akiyama ve arkadaşları fumonisin analizi için geliştirdikleri HPLC yönteminde türevlendirme için OPA, FS, FMOc, DBD-F ve NBD-F belirteçlerini kullanmışlardır. Analiz sonucunda NBD-F ve DBD-F belirteçlerle yapılan analizlerin daha hassas olduğu belirtilmiştir (61).

Iwaki ve arkadaşları penisilinlerin analizi için geliştirdikleri HPLC yönteminde maddeler NBD-F ile türevlendirilmiştir. Çalışmada doğrusallık $0,2-100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir. Dedeksiyon fluoresans dedektör ile yapılmıştır (62).

Kotaniguchi ve arkadaşları insan kanında bulunan aminoasitlerin tayininde NBD-F ile türevlendirdikleri maddeleri C_{18} kolon ve H_3PO_4 -asetonitril (84:16) ve potasyum fosfat-asetonitril-metanol (40:21:39) içeren mobil faz sistemiyle ayırmışlardır (63).

Kaneko ve arkadaşları NBD-F ile türevlendirdikleri aminofosfolipidleri HPLC ile tayin etmişlerdir. Dedeksiyon 465 nm eksitasyon, 520 nm emisyon dalgalaboylarında fluoresans dedektör ile gerçekleştirilmiştir (64).

Imai ve arkadaşları aminoasit ve poliaminleri NBD-F ile türevlendirdikten sonra HPLC yöntemiyle tayin etmişlerdir. Dedeksiyon fluoresans dedektör ile 470 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalgalaboylarında gerçekleştirilmiştir (65).

Watanabe ve arkadaşları amino ve imino asitleri analiz etmek için geliştirdikleri HPLC yönteminde türevlendirmeyi NBD-F ile yapmışlardır. Fluoresans dedektörün

kullanıldığı tayinde eksitasyon dalgaboyu 470 nm, emisyon dalgaboyu ise 530 nm olarak bildirilmiştir (66).

Hauck ve arkadaşları gıda maddelerindeki siklamat tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde NBD-F ile türevlendirilen maddenin ayrılması için C₁₈ kolon kullanılmıştır. Dedeksiyon 485 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalgaboylarında fluoresans dedektör ile yapılmıştır (67).

Higashi ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada amantadin NBD-F ile türevlendirilmiştir. Türevler HPLC ile analiz edilmiştir. Çalışmada tanıma sınırı 8 ng.mL⁻¹ olarak bildirilmiştir (68).

Zhang ve arkadaşları tarafından plazmada 3-nitrotirozin ve tirozin tayini için geliştirilen HPLC yönteminde maddeler, NBD-F ile türevlendirilerek C₁₈ kolonda tayin edilmiştir. Yöntemde doğrusallık 3-nitrotirozin için 0,5-100 nM, tirozin için 1-320 µN olarak bildirilmiştir (69).

Tsunoda ve arkadaşları biyolojik örneklerdeki aspartik asit enantiyomerlerini CE yöntemiyle ayırmışlardır. Yöntemde NBD-F ile türevlendirilen örnekler 50 mM fosfat tamponu (pH 4,0) içeren mobil faz sisteminde analiz edilmiştir. Dedeksiyon 470 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalgaboylarında fluoresans dedektör ile yapılmıştır. Çalışmada tanıma sınırı 100 nM olarak bildirilmiştir (70).

Tseng ve arkadaşlarının geliştirdikleri CE yönteminde mono, di, oligosakkarit içeren 17 karbonhidrat NBD-F ile türevlendirilmiştir. Dedeksiyon LIF ile yapılmıştır (71).

Zhang ve arkadaşları histamin ve poliaminleri tayin etmek için CZE yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde maddeler NBD-F ile türevlendirildikten sonra pH 3,0 borat tampon çözeltisinde fluoresans dedektör ile analiz edilmiştir (72).

Song ve arkadaşları fare dokusunda biyojenik aminlerin tayini için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde kolon öncesi NBD-F ile türevlendirme yapılmıştır. Yöntemin doğrusallığı 15-1000 ng.mL⁻¹, tanıma sınırı ise 0,6 ng.mL⁻¹ olarak bildirilmiştir (73).

Zhou ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada bitkilerde bulunan efedrin ve psödoefedrini NBD-F belirteci ile türevlendirmişler ve miseller elektrokinetik kapiler kromatografisi yöntemiyle analiz etmişlerdir. Dedeksiyon LIF ile yapılmıştır (74).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Gabapentin¹, Neurontin kapsül², 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F)³, borik asit⁴, potasyum dihidrojen fosfat⁴, potasyum klorür⁴, susuz sodyum sülfat⁴, sodyum hidroksit⁴, sodyum klorür⁴.

Metanol⁴, dioksan⁴, metilsiklobutil keton⁴, diklormetan⁴, kloroform⁴, etilasetat⁴, hidroklorik asit (%37 ağırlık/ağırlık)⁴ ve saf su kullanıldı.

3.1.2. Çözeltiler

1. Gabapentin Çözeltisi

Stok çözelti: 50 mg gabapentin 50 mL lik balonjojede su ile hacmine tamamlandı. Çalışmalarda stok çözeltinin su ile seyreltilmesiyle hazırlanan 10 µg.mL⁻¹ konsantrasyonlarında gabapentin içeren çözelti kullanıldı.

2. NBD-F Çözeltisi

Reaksiyon koşullarının belirlenmesinde NBD-F ün 21,4, 42,8, 64,2, 85,6, 104,9, 128,4 µg.mL⁻¹ konsantrasyonlarda metanolde hazırlanmış çözeltileri kullanıldı.

3. Tampon Çözeltiler

a. Fosfat tamponu çözeltileri:

pH sı 7,0 ve 7,5 olan tampon çözeltileri hazırlamak için 50 mL 0,2 M potasyum dihidrojen fosfat çözeltisine gerekli miktar 0,2 M NaOH çözeltisi ilave edildi ve pH sı ayarlanan çözeltilerin hacimleri suyla 200 mL ye tamamlandı.

^{1,2} Pfizer İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul Gabapentin ve Neurontin kapsüllerinin sağlanmasında (2008 yılı) yardımları için firmaya teşekkür ederim.

^{3,4} Merck, E.Merck A.G.Darmstad, Almanya

*Tüm çalışmalar İstanbul Üniversitesi Analitik Kimya Ana Bilimdalı Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

b. Borat tamponu çözeltileri:

pH sı 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 olan tampon çözeltilerini hazırlamak için 0,6189 g borik asit ve 0,7456 g potasyum klorür 50 mL suda çözülüp gerekli miktarlarda 0,2 M NaOH çözeltisi ilave edildi ve hacimleri suyla 200 mL ye tamamlandı.

4. Sodyum fluoresssein çözeltisi:

Sodyum fluoressseinin 0,1 N NaOH çözeltisindeki % 0,001 lik çözeltisi hazırlanıp +4 °C de karanlıkta saklandı. Bu çözelti 0,1 N NaOH ile gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra NBD-F ile yapılan çalışmalarda referans standart olarak kullanıldı.

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

1. Spektrofluorimetre (Shimadzu RF-1501)
2. Spektrofotometre (Shimadzu UV-160A)
3. 1 cm lik kuartz küvetler (QS 1000) (10x10x45 mm)
4. 1 cm lik cam küvetler (OS 1000) (10x10x45 mm)
5. HPLC aleti

CBM 10 A sistem kontrol ünitesi

LC 10 AT pompa

SPD – 10 A UV – Visible absorbans dedektör

DGU – 2 A helyumlu gaz giderme ünitesi

Rheodyne enjektör (Enjeksiyon hacmi 20 µL, Berkley CA, ABD)

6. C₁₈ Analitik kolon (Inertsil, 150x4.6 mm I.D., 5µm parçacık büyüklüğü)

C₁₈ Koruyucu kolon (Inertsil, 4 mmx3 mm I.D., 5µm parçacık büyüklüğü)

7. Terazı (Denver Instrument)

8. Girdap karıştırıcı (Elektro-mag)

9. Santrifüj (Janetzki T.32B)

10. Ultrasonik banyo (Bransonı 221)

11. Ultra saf su cihazı (Younglin Instrument)

12. Mobil faz süzme filtresi (Milipor, HVLP 47 mm)
13. Örnek süzme filtresi (Anotec, 0,20 µm)
14. Reaksiyon tüpleri (Vidalı, kapaklı, 12 mL lik)
15. Otomatik pipetler (Microlit, 10-100 µL, 100-1000 µL)
16. Balon jojeler (5, 10, 25, 50 ve 100 mL lik)
17. Hesap makinesi (Casio, fx-3600P)

3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

3.3.1. Türevlendirme İçin Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi

Bu belirteç ile daha önce yapılan analizler incelendiğinde NBD-F ile primer ve sekonder amin grubu içeren maddeler arasındaki reaksiyonun alkali pH larda, sıcakta yürüdüğü ve oluşan türevin genellikle asitli ortamda organik bir çözücü ile ekstre edildikten sonra floresans ölçümünün yapıldığı görülmüştür. Literatürdeki bilgiler doğrultusunda, gabapentin ile NBD-F arasındaki reaksiyonun en iyi hangi koşullarda yürüdüğünü saptamak amacıyla aşağıdaki denemeler yapıldı.

3.3.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü

10 µg.mL⁻¹ konsantrasyondaki gabapentin çözeltisinden 100 µL reaksiyon tüplerine alındı, çözelti üzerine 100 µL pH 9,5 borat tamponu ve 100 µL NBD-F çözeltilerinden ilave edilerek 70°C de 30 dakika ısıtıldı. Soğutulan sistemin 100 µL 0,1 N HCl çözeltisiyle asitlendirilmesini takiben ya metanol ve dioksan ile çözeltinin hacmi 10 mL ye tamamlandı ya da türev etilasetat, diklormetan, metilsiklobutilketon ve kloroform gibi organik çözücülerle ekstre edildi (3x2 mL). Birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildi ve hacmi 10 mL ye tamamlandı. Çözeltilerin spektrumları aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı spektrofotometre yardımıyla alındı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.1 de verilmiştir.

3.3.1.2. pH

Reaksiyon tüplerine 10 µg.mL⁻¹ gabapentin çözeltisinden 100 µL alınarak üzerine çeşitli pH'lardaki (7,0-10,0) borat ve fosfat tampon çözeltilerinden 100 µL ve 100 µL NBD-F çözeltisi ilave edilerek 70°C de 30 dakika ısıtıldı. 100 µL 0,1 N HCl çözeltisi ile asitlendirilen çözeltiler, 3x2 mL etilasetat ile ekstre edildi. Birleştirilen

organik fazlar susuz Na_2SO_4 ile kurutuldu ve hacmi 10 mL ye tamamlandı. Çözeltilerin spektrumları aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı spektrofotometre yardımıyla alındı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.2 de verilmiştir.

3.3.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

$10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ gabapentin çözeltisinden reaksiyon tüplerine 100 μL alınarak üzerine 100 μL pH 9,5 borat tamponu ve 100 μL NBD-F çözeltisi ilave edildi. Tüpler oda sıcaklığında ve 50, 60, 70, 80 sıcaklıklarda 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dakika süreyle bekletildi. Çalışmaya bölüm 3.3.1.2 de anlatıldığı gibi devam edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.3 de verilmiştir.

3.3.1.4. Belirteç Miktarı

$10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ gabapentin çözeltisinden 100 μL lik hacimler deney tüplerine kondu ve üzerine 100 μL pH 9,5 borat tamponu çözeltisi ve 100 μL çeşitli miktarlarda (21,4, 42,8, 64,2, 85,6, 106,9, 128,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) NBD-F çözeltisi katıldı. Çalışmaya 3.3.1.2 de anlatıldığı gibi devam edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.4 de verilmiştir.

3.3.1.5. Türevin Dayanıklılığı

$10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ gabapentin çözeltisinden 100 μL alındı ve üzerine 100 μL pH 9,5 borat tamponu ile 100 μL NBD-F çözeltisi ilave edildi ve çalışmaya 3.3.1.2 de anlatıldığı gibi devam edildi. 4 adet bu şekilde paralel deneme yapıldı. Elde edilen gabapentin NBD türevlerinin etilasetattaki çözeltilerinin floresans şiddeti ($\lambda_{\text{eks}}=458 \text{ nm}$ ve $\lambda_{\text{em}}=521 \text{ nm}$) boş denemeye karşı ölçüldü. Sonra bu çözeltiler oda temperaturünde, gün ışığında ve karanlıkta, $+4^\circ\text{C}$ de karanlıkta 6, 24, 48, 72 saat bekletilerek floresans şiddeti ölçüldü. Alınan sonuçlar Bölüm 4.1.1.5 de belirtilmiştir.

3.3.1.6. Asit Miktarı

$10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ gabapentin çözeltisinden 100 μL alındı ve üzerine 100 μL pH 9,5 borat tamponu ve 100 μL NBD-F çözeltisi ilave edildi ve çalışmaya 3.3.1.2 de anlatıldığı gibi çalışıldı. NBD-F nin hidroliz ürünü NBD-OH ın interferansını engellemek için, reaksiyon karışımı 25, 50, 100 ve 150 μL glasiyal CH_3COOH ve 0,1 N HCl çözeltileriyle asitlendirildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.6 da verilmiştir.

3.3.1.7. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrisi Hazırlanması

Çeşitli konsantrasyonlarda (1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) gabapentin çözeltisinden 100 μL alınıp üzerine 100 μL pH 9,5 borat tamponu ve 100 μL NBD-F çözeltisi (64,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) katıldı. 70 °C de 30 dakika ısıtıldı. Çözelti soğutulduktan sonra üzerine 100 μL 0,1 N HCl katıldı ve çalışmaya Bölüm 3.3.1.2 de anlatıldığı gibi devam edildi. Elde edilen sonuçlar 4.1.1.7 de verilmiştir.

3.4. Kapsüllerde Gabapentin Miktar Tayini

3.4.1. Spektrofluorimetrik Yöntem İle

10 adet kapsül içindeki etken maddeler tartılıp, ortalama ağırlığı saptandı ve kapsül içindeki etken maddeler porselen havanda ince toz haline getirildi. 100 mg gabapentine eşdeğer miktarda kapsül tozu hassas olarak tartılıp 100 mL lik balon jojeye aktarıldı, 50 mL su ile 30 dakika ultrasonik banyoda karıştırıldı. Su ile hacmine tamamlandıktan sonra mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün 25 mL si atıldı. Geri kalan kısmından 10 mL alınıp 100 mL lik balon jodede su ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden tekrar 10 mL alınıp, su ile 100 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden 100 μL alınarak 10-100 ng.mL^{-1} konsantrasyon aralığına ait ölçü eğrisinin çalışma koşullarında Bölüm 3.3.1.7 de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Analiz işlemi 6 kez tekrarlandı. Gabapentin miktarı daha önce bu konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisinin denklemi yardımıyla hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.7 de verilmiştir.

3.4.2. Kıyas Yöntemi İle

Kapsüllerde gabapentin miktar tayini için kıyas yöntemi olarak USP XXXII de bulunan HPLC yöntemi esas alındı (75).

Standart çözelti: Mobil fazda hazırlanan 4 mg.mL^{-1} konsantrasyonda gabapentin çözeltisi hazırlandı.

Örnek çözelti: Bölüm 3.4.1 de anlatıldığı gibi ince toz haline getirilen kapsül içindeki etken madde örneğinden kapsül tozu tartılarak, konsantrasyonu 4 mg.mL^{-1} olan örnek çözelti hazırlandı.

Kromatografik sistem:

Dedektör: UV-Absorbans dedektör 210 nm

Akış hızı: 1,2 mL/dak.

C₁₈ Analitik kolon (Inertsil, 150x4.6 mm I.D., 5µm parçacık büyüklüğü)

C₁₈ Koruyucu kolon (Inertsil, 4 mmx3 mm I.D., 5µm parçacık büyüklüğü)

Mobil faz: Asetonitril : potasyum dihidrojen fosfat (pH=6.9) (60:40, v/v)

Enjeksiyon hacmi: 20 µL

Yöntem: Örnek ve standart çözeltilerinden ayrı ayrı 20 µL enjekte edildi. Mobil fazda elüsyon yapıldı. Majör piklerin alanı bulundu. Kapsüllerdeki gabapentin miktarı aşağıdaki formülle hesaplandı (mg cinsinden).

$$\text{mg/kapsül} = 100 (C_s/C_u)(r_u/r_s)$$

C_s = Standart çözeltisinin konsantrasyonu (mg.mL⁻¹)

C_u = Örnek çözeltisinin konsantrasyonu (mg.mL⁻¹)

r_s = Standart çözeltisinin pik alanı

r_u = Örnek çözeltisinin pik alanı

Elde edilem sonuçlar Bölüm 4.1.1.8 de belirtilmiştir.

3.5. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

İlaç uygulamaları için Uluslararası Harmonizasyon Konferansında (ICH, *International Conference Harmonazation*) belirlenen parametreler incelendi (76).

3.5.1. Doğrusallık

Gabapentin çözeltilerine karşı floresans şiddetinin belli konsantrasyon aralığındaki doğrusallığını belirlemek için 6 farklı konsantrasyonda dörder adet çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerle Bölüm 3.3.1.7 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Doğrusallık sonuçlarının floresans şiddetleri, bağıl floresans şiddetleri, standart sapma, % RSD hesaplanarak grafiksel değerlendirilmesi yapıldı. Sonuçlar Bölüm 4.2.1 de verilmiştir.

3.5.2. Tanıma (LOD) ve Miktar Tayin (LOQ) Sınırları

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüllerle hesaplandı. Hesaplanan değerler Bölüm 4.2.2 de verilmiştir.

$$\text{LOD} = 3,3 \sigma/a$$

$$\text{LOQ} = 10 \sigma/a$$

σ : Ölçü eğrisindeki kesim noktalarının standart sapması

a: Eğim

3.5.3. Kesinlik ve Doğruluk

Gün içi tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda (10, 40, 100 ng.mL⁻¹) gabapentin içeren çözeltilerden dörder adet hazırlandı. Bölüm 3.3.1.2 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Gün içinde herbirinin üçer kez floresans şiddeti değerleri ölçüldü. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.2.3 de verilmiştir.

Günler arası tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda (10, 40, 100 ng.mL⁻¹) gabapentin içeren çözeltilerden dörder adet hazırlandı. Bölüm 3.3.1.2 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Analizler birbirini takip eden 5 günde ve her defasında yeni çözeltilerle çalışılmak koşuluyla tekrarlandı. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.2.3 de verilmiştir.

3.5.4. Robustness (Yöntemin Sağlamlığı)

40 ng.mL⁻¹ konsantrasyondaki gabapentin çözeltisine 100 ±5 µL NBD-F çözeltisi ilave edilerek, reaksiyon süresi 30±1 dakika değiştirilerek reaksiyonlar yapıldı. 458 nm eksitasyon ve 521 nm de emisyon dalga boylarında çözeltilerin floresans şiddeti ölçüldü. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.2.4 de verilmiştir.

3.5.5. Seçicilik

100 mg gabapentin içeren Neurontin kapsüllerde bulunan laktoz, nişasta, glukoz, talk, magnezyum stearat ve titanyum dioksit gibi yardımcı maddelerin 10 µg.mL⁻¹ konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.3.1.2 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Sonuçlar Bölüm 4.2.5 de verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

4.1.1. Gabapentinin NBD-F ile Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi

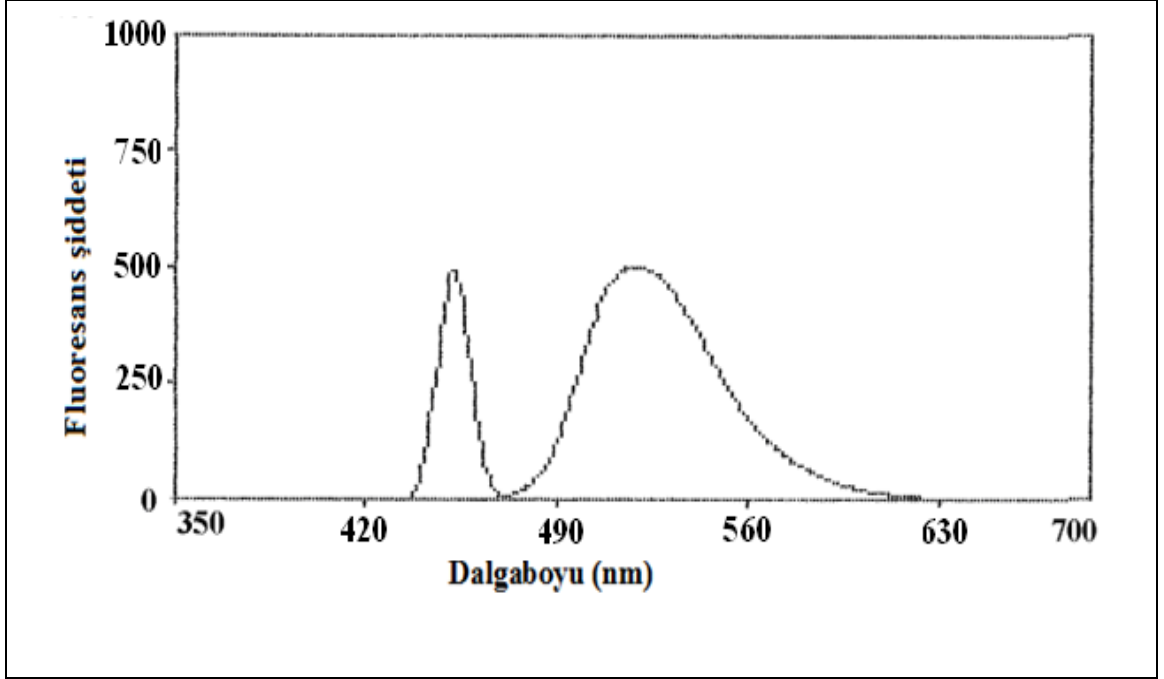
Gabapentin ile NBD-F arasındaki reaksiyon sonucu meydana gelen ve sarı renkli fluoresans gösteren gabapentin-NBD türevinin sulu ortamdan ekstre edilebilmesi için en uygun organik çözücü araştırıldı ve türevin oluşumu üzerine pH, sıcaklık, reaksiyon süresi, belirteç miktarı gibi parametrelerin etkisi incelendi.

4.1.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü

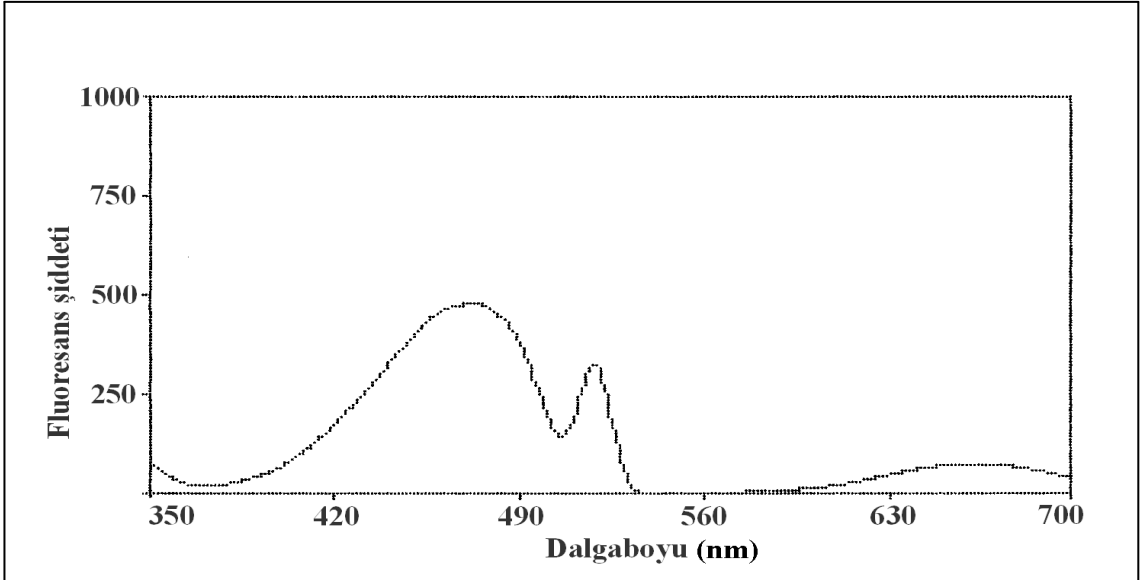
Gabapentinin NBD-F ile oluşturduğu türevin sulu ortamdan ekstraksiyonu için en uygun organik çözücüyü saptamak üzere Bölüm 3.3.1.1 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen türevin çeşitli çözücülerde fluoresans spektrumları alındı. Bu spektrumlarda gabapentin–NBD türevinin denenen organik çözücülerde gösterdiği maksimum eksitasyon ve emisyon dalgaboyları ve fluoresans şiddeti değerleri elde edilmiştir. Tablo 4.1 de yer alan bu değerler incelendiğinde türevin ekstraksiyonu için en uygun çözücünün etilasetat olduğu saptanmıştır. Şekil 4.1 ve 4.2 de gabapentin–NBD türevinin etilasetattaki eksitasyon ve Şekil 4.3 de boşun emisyon spektrumları görülmektedir.

Tablo 4-1: Gabapentin–NBD türevinin çeşitli organik çözücülerdeki maksimum eksitasyon (λ_{eks}) ve emisyon (λ_{em}) dalga boyları ile fluoresans şiddeti değerleri

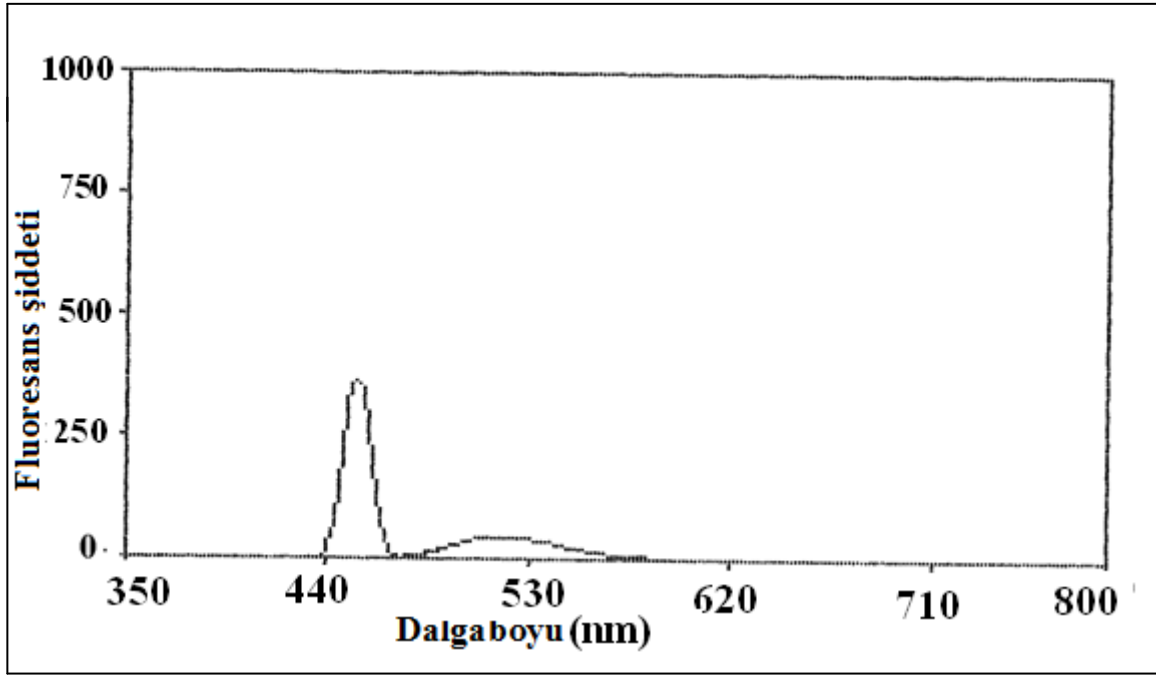
	$\lambda_{eks} / \lambda_{em} \text{ (nm)}$	Fluoresans şiddeti
Metanol	462/594	178
Dioksan	461/532	293
Metilsiklobutilketon	465/610	411
Diklormetan	462/530	172
Etilasetat	458/521	994
Kloroform	461/532	425



Şekil 4-1: 40 ng.mL⁻¹ gabapentine eşdeğer gabapentin-NBD türevinin etilasetattaki emisyon spektrumu (λ_{em} = 521 nm)



Şekil 4-2: 40 ng.mL⁻¹ gabapentine eşdeğer gabapentin-NBD türevinin etilasetattaki eksitasyon spektrumu (λ_{eks} = 458 nm)



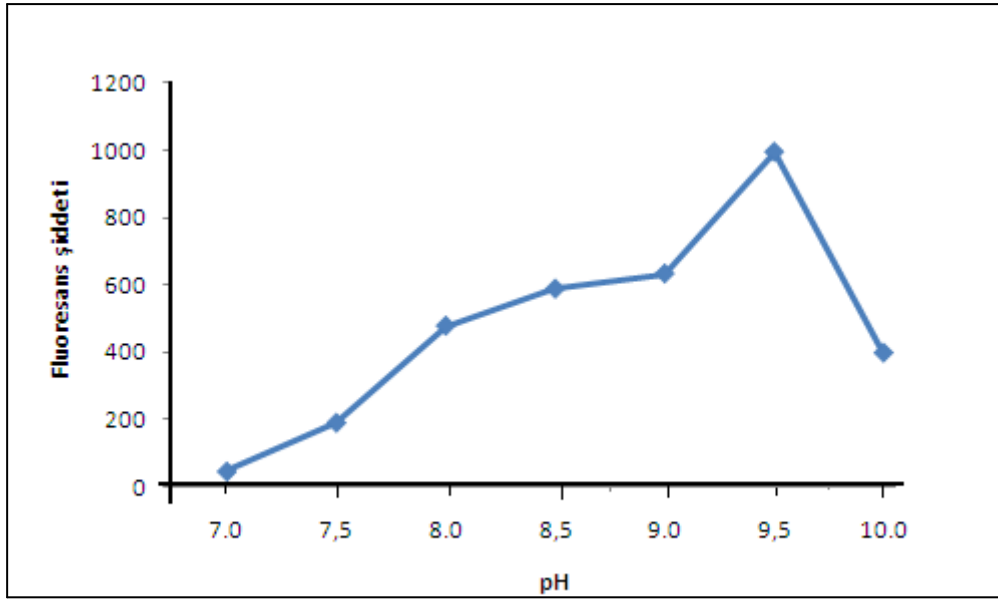
Şekil 4-3. Boşun emisyon spektrumu

4.1.1.2. pH

Gabapentin ile NBD-F arasındaki reaksiyonun en iyi hangi pH da yürüdüğünü saptamak amacıyla pH 7,0 – 10,0 arasında hazırlanmış bir seri tampon çözeltiyle Bölüm 3.3.1.2 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Elde edilen veriler incelendiğinde gabapentin–NBD türevinin pH 9,5 da kantitatif olarak oluştuğu belirlenmiştir.

Tablo 4-2 : Çeşitli pH larda oluşturulan gabapentin-NBD türevine ait fluoresans şiddeti değerleri

pH	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0
Fluoresans şiddeti	45	190	478	588	633	994	398



Şekil 4-4: Gabapentin-NBD türevinin oluşumu üzerine pH'nın etkisi

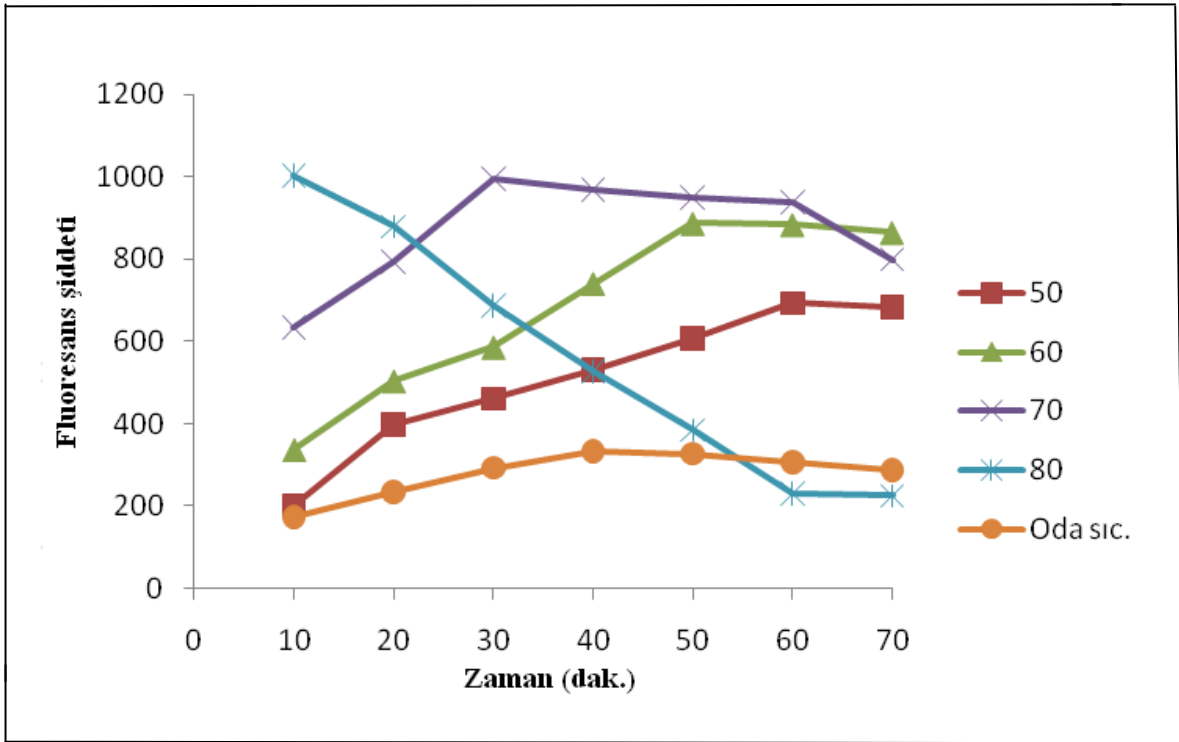
4.1.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

Gabapentin-NBD türevinin oluşması için en uygun sıcaklık ve reaksiyon süresini saptamak amacıyla Bölüm 3.3.1.3 de anlatıldığı gibi oda sıcaklığında ve 50, 60, 70, 80 °C sıcaklıklarda çalışıldı. Her sıcaklıkta 10 ile 70 dakika arasında türev oluşumu izlendi.

Elde edilen gabapentin-NBD türevlerine ait floresans şiddeti değerlerinin, sıcaklık ve zamana karşı gösterdiği değişim Tablo 4.3 ve Şekil 4.5 de verilmiştir. bu verilere dayanılarak, gabapentin ile NBD-F arasındaki reaksiyonun tamamlanması için 70 °C de 30 dakika süreyle ısıtmanın yeterli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4-3 : Çeşitli sıcaklık ve zamanlarda oluşturulan gabapentin–NBD türevine ait floresans şiddeti değerleri

Zaman (dak.) \ Sıcaklık(°C)	10	20	30	40	50	60	70
50	200	397	461	530	608	693	684
60	337	504	586	741	887	884	865
70	633	794	994	968	949	937	799
80	1003	879	687	527	385	230	225
Oda sıc.	173	234	293	332	327	306	287



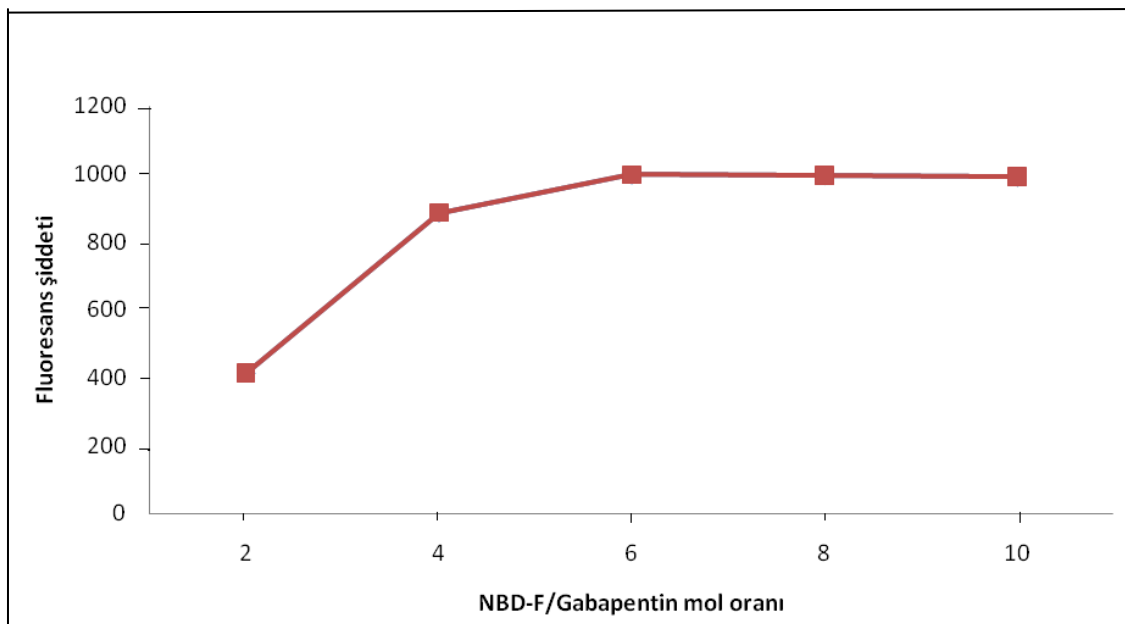
Şekil 4-5: Gabapentin–NBD türevinin oluşması üzerine sıcaklık ve zaman etkisi

4.1.1.4. Belirteç Miktarı

NBD-F ile gabapentin arasındaki reaksiyonun maksimum oranda ürün vermesi için gerekli belirteç/gabapentin mol oranını saptamak amacıyla madde miktarı sabit tutularak NBD-F mol katı 2–10 olacak şekilde hazırlanan bir seri belirteç çözeltisiyle Bölüm 3.3.1.4 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Tablo 4.4 de belirteç miktarının değiştirilmesiyle oluşturulan türevlere ait floresans şiddeti değerleri, Şekil 4.6 da ise bu değerler yardımıyla elde edilen grafik görülmektedir. Veriler değerlendirildiğinde gabapentin–NBD türevinin oluşması için NBD-F/gabapentin mol oranı 6 olacak şekilde hazırlanan belirteç çözeltisinin yeterli olacağı belirlenmiştir.

Tablo 4-4: Çeşitli mol oranlarında oluşturulan gabapentin–NBD türevine ait floresans şiddeti değerleri

NBD-F/gabapentin mol oranı	2	4	6	8	10
Floresans Şiddeti	414	886	998	996	991



Şekil 4-6: Gabapentin–NBD türevinin oluşumu üzerine belirteç miktarının etkisi

4.1.1.5. Türevin Dayanıklılığı

Gabapentin-NBD türevinin etilasetat çözeltisindeki dayanıklılığını incelemek üzere Bölüm 3.3.1.5 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta ve gün ışığında, +4 °C de karanlıkta belirli sürelerde bekletilen çözeltinin gösterdiği floresans şiddeti değerleri Tablo 4.5 de görülmektedir. Elde edilen veriler incelendiğinde türevin +4°C de karanlıkta 48 saat dayanıklı kaldığı belirlenmiştir.

Tablo 4-5: Oda sıcaklığında karanlıkta ve gün ışığında +4 °C’de karanlıkta bekletilen gabapentin-NBD türevinin etilasetattaki dayanıklılığı

		Fluoresans		Şiddeti	
	Başlangıçta	6 saat Sonra	24 saat Sonra	48 saat Sonra	72 saat Sonra
Oda Sıcaklığı Karanlıkta	991	983	960	842	751
Oda Sıcaklığı Gün ışığında	991	910	632	456	228
+4°C de Karanlıkta	991	990	990	990	986

4.1.1.6. Asit Miktarı

NBD-F ile alifatik aminlerin floresans gösteren türevlerinin organik çözücüye ekstraksiyonu genellikle asitli ortamda olmaktadır.

Literatürde bunun için çoğunlukla CH_3COOH ve HCl çözeltileri kullanılmaktadır. Bölüm 3.3.1.6 de anlatıldığı gibi yapılan incelemeler sonucunda ekstraksiyon için 100 μL 0,1 N HCl çözeltisinin yeterli olduğu belirlenmiştir.

4.1.1.7. Sulu Çözeltide Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi

6 ayrı konsantrasyonda ve her bir konsantrasyon için 4 ayrı kez Bölüm 3.3.1.7 de anlatıldığı gibi çalışıldı ve madde konsantrasyonu ile, bağlı fluoresans şiddeti arasında grafik çizilerek ölçü eğrileri her bir konsantrasyon aralığı için ayrı ayrı hazırlandı. Bağlı fluoresans şiddeti aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$I_F = (x - a) / (y - b) \times 100$$

I_F = Bağlı fluoresans şiddeti

x = Örneğin fluoresans şiddeti

y = Sodyum fluoresseinin çözeltisinin fluoresans şiddeti

a ve b bu çözeltilere ait boş deneme değerleri

Ölçü eğrilerine en küçük kareler yöntemi uygulanarak doğru denklemi ve korrelasyon katsayısı (r) hesaplandı.

$$I_F = aC + b$$

Doğru denkleminde C ng.mL^{-1} cinsinden konsantrasyon, a doğrunun eğimi, b intersept doğrunun ordinat eksenini kestiği noktanın sıfır noktasına olan uzaklığı, I_F ise bağlı fluoresans şiddetini bildirmektedir. Ölçmelerin sonuçları ve istatistiki hesaplamalar Tablo 4.6 ve 4.7 de verilmiştir.

Tablo 4-6: Gabapentinin spektrofotometrik tayini için 10–100 ng.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrilerine ait floresans şiddeti değerleri ve istatistik verileri

No	C (ng.mL ⁻¹)	I _{F1}	I _{F2}	I _{F3}	I _{F4}	I _{F_{ort}}	S	$\frac{sx100}{I_{F_{ort}}}$
1	10	0,98	0,97	0,99	0,99	0,98	1x10 ⁻²	1,02
2	20	1,86	1,87	1,87	1,89	1,87	1,3x10 ⁻²	0,69
3	40	3,99	4,00	4,02	3,98	4,00	1,7x10 ⁻²	0,43
4	60	5,96	5,97	5,99	5,95	5,97	1,7x10 ⁻²	0,28
5	80	7,95	7,99	7,97	7,94	7,96	2,2x10 ⁻²	0,28
6	100	9,99	10,00	9,97	9,98	9,98	1,4x10 ⁻²	0,14

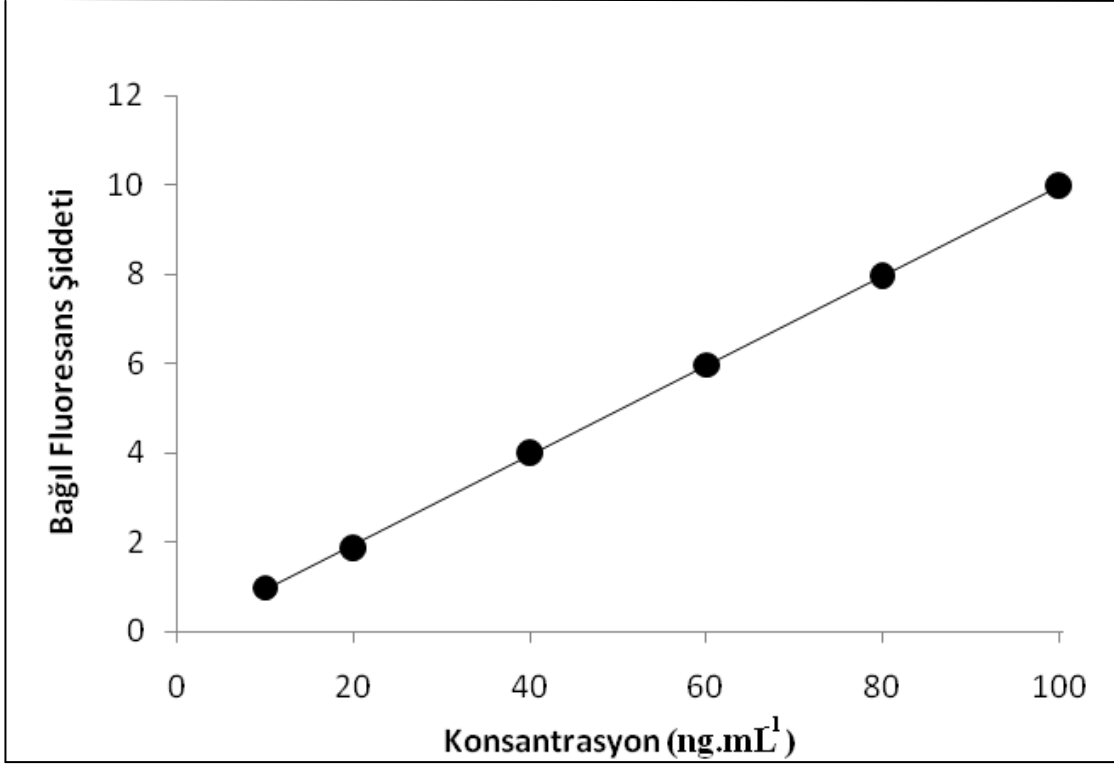
I_{F_{ort}} değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:

$$I_F = 0,1004C - 6,2 \times 10^{-2}$$

$$r = 0,9998$$

Tablo 4-7: Tablo 4-6 deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreleri

	1	2	3	4	Ortalama
a	0,1005	0,1008	0,1003	0,1002	0,1004
b	-7,18x10 ⁻²	-7,44x10 ⁻²	-4,79x10 ⁻²	-5,39x10 ⁻²	-6,2x10 ⁻²
r	0,9998	0,9999	0,9998	0,9999	0,9998



Şekil 4-7: Gabapentinin 10-100 ng.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

4.1.1.8. Geliştirilen Yöntem ile Kapsüllerde Gabapentin Tayini ve Sonuçların Kıyas Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması

100 mg gabapentin içeren kapsüller, geliştirilen spektrofotometrik yöntem ve farmakope (USP XXXII) kıyas yöntemi ile analiz edilerek, gabapentin miktarı tayin edildi. Elde edilen sonuçlar ve 4 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama, standart sapma (s), bağıl standart sapma ve % 95 olasılık düzeyinde güven aralığı Tablo 4.8 de görülmektedir.

Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemiyle elde edilen sonuçların ortalamalar yönünden karşılaştırılması student (*t*), standart sapmalar yönünden karşılaştırılması Fisher (*F*) testi uygulanarak yapıldı. Tablo 4.8 de görüldüğü gibi hesaplanan *t*- ve *F*-değerleri % 95 olasılık düzeyi ve 4 deneme için ilgili cetvellerde bildirilen değerlerden daha küçük olduğundan geliştirilen spektrofotometrik yöntem ile kıyas yöntemi arasında gerek doğruluk gerek kesinlik dereceleri yönünden anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

Tablo 4-8: 100 mg gabapentin içeren kapsüllerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi

Geliştirilen yöntem			Kıyas yöntem	
Örnek	mg/kapsül	Geri kazanım (%)	mg/kapsül	Geri kazanım (%)
1	101,50	101,50	101,51	101,51
2	101,50	101,50	101,49	101,49
3	100,70	100,70	101,71	101,71
4	100,70	100,70	101,71	101,71
5	99,80	99,80	99,84	99,84
6	99,80	99,80	99,86	99,86
$\bar{x}$	100,66	100,66	101,02	101,02
s	0,76		0,91	
$s/\bar{x} \cdot 100$	0,76		0,90	
$t \cdot s/\sqrt{n}$	0,21		0,25	
Güven sınırları	100,45-100,87		100,77-101,27	
$t = 0,68 \quad (p=0,05, t_{\text{tablo}} = 2,23)$				
$F = 1,43 \quad (p=0,05, F_{\text{tablo}} = 5,05)$				
$n_1 = n_2 = 6$				

4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

4.2.1. Doğrusallık

Fluoresans şiddeti ile gabapentin konsantrasyonu arasındaki ilişkinin 10-100 ng.mL⁻¹ aralığında doğrusal olduğu belirlendi.

4.2.2. Tanıma (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları

LOD değeri 0,43 ve LOQ değeri 1,30 ng.mL⁻¹ olarak hesaplandı. Bulunan sonuçlar Tablo 4.9 da verilmiştir.

Tablo 4-9: Tablo 4.7 deki değerlere göre hazırlanan LOD ve LOQ değerleri

Parametreler	Değerler
Doğru denklemi	$I_F = 0,1004C - 6,2 \times 10^{-2}$
Eğim $\pm$ SD	$0,1004 \pm 2,77 \times 10^{-4}$
Intersept $\pm$ SD	$6,2 \times 10^{-2} \pm 1,31 \times 10^{-2}$
LOD (ngmL ⁻¹)	0,43
LOQ (ngmL ⁻¹)	1,30
r	0,9998

4.2.3. Kesinlik ve Doğruluk

Gün içi tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda (10, 40, 100 ng.mL⁻¹) gabapentin içeren çözeltilerden dörder adet hazırlandı. Bölüm 3.3.1.2 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Bağlı standart sapma değerleri % 0,20-2,11 arasında hesaplandı (Tablo 4.10).

Tablo 4-10: Gün içinde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği

	Konsantrasyon (ng.mL⁻¹)		
	10	40	100
Bulunan Konsantrasyon (ng.mL⁻¹)	10,14	40,33	100,51
	10,35	40,38	100,80
	10,57	40,10	100,43
	10,73	40,80	100,80
	10,45	40,84	100,31
	10,21	40,23	100,62
Ortalama	10,41	40,45	100,58
Standart Sapma	0,22	0,30	0,20
RSD (%)	2,11	0,74	0,20
RME (%)	4,10	1,13	0,58

Günler arası tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda (10, 40, 100 ng.mL⁻¹) gabapentin içeren çözeltilerden dörder adet hazırlandı. Bölüm 3.3.1.2 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Analizler birbirini takip eden 5 günde ve her defasında yeni çözeltilerle çalışılmak koşuluyla tekrarlandı. Bağıl standart sapma değerleri % 0,47-2,92 arasında hesaplandı (Tablo 4.11).

Tablo 4-11: Günler arası yapılan analizlerinin tekrarlanabilirliği

	Konsantrasyon (ng.mL⁻¹)		
	10	40	100
Bulunan Konsantrasyon (ng.mL⁻¹)	10,15	40,32	101,11
	10,37	40,54	99,78
	10,63	40,81	100,90
	10,92	40,76	100,92
	10,95	40,41	100,75
	10,71	40,52	100,78
Ortalama	10,62	40,45	100,71
Standart Sapma	0,31	0,19	0,47
RSD (%)	2,92	0,47	0,47
RME (%)	5,20	1,40	0,71

4.2.4. Robustness (Yöntemin Sağlamlığı)

Yöntemin parametrelerinde ufak değişiklikler yapılarak yöntemin sağlamlığı araştırıldı. Bulunan sonuçlar Tablo 4.12 de verilmiştir. Bulunan sonuçların dikkate alınacak değerde olmadığı gözlemlendi.

Tablo 4-12: Yöntemin sağlamlığının incelenmesinde elde edilen sonuçlar

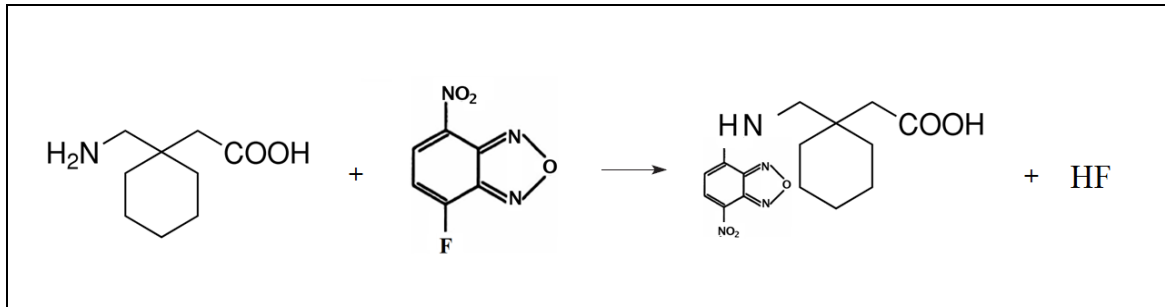
	NBD-F miktarı (100 + 5 µL)	NBD-F miktarı (100 – 5 µL)	Reaksiyon süresi (30+1 dak.)	Reaksiyon süresi (30-1 dak.)
Bulunan Konsantrasyon	40,08	40,06	40,09	40,04
	40,06	40,09	40,08	40,06
	40,07	40,04	40,09	40,02
	40,06	40,04	40,07	40,06
	40,05	40,06	40,05	40,08
Ortalama	40,06	40,06	40,08	40,05
Standart sapma	$1,2 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-2}$
Bağıl standart sapma	0,03	0,05	0,04	0,05
Geri kazanım	100,15	100,15	100,20	100,12

4.2.5. Seçicilik

100 mg Gabapentin içeren Neurontin kapsüllerde bulunan laktoz, nişasta, glukoz, talk, magnezyum stearat ve titanyum dioksit gibi yardımcı maddelerin NBD-F ile reaksiyon vermediği, floresans şiddetini etkilemediği gözlemlendi.

5. TARTIŞMA

Gabapentinin kapsülde miktar tayini için geliştirilen spektrofotometrik yöntem, primer amin grubu içeren bu madde ile NBD-F arasındaki nükleofilik aromatik süstitüsyon reaksiyonuna dayanmaktadır.



NBD-F primer ve sekonder aminlerle şiddetli flouresans gösteren türevler oluşturur ve kendisi de doğal flouresans gösterir. Belirteç aşırısının tayine zarar vermemesi, reaksiyonun sulu ortamda ve çok az miktarda aminle yürümesi bu belirtecin önemli bir avantajıdır.

Literatürde NBD-F ile yapılan çalışmalar incelendiğinde bu belirtecin aminlerle alkali pH larda ve sıcakta reaksiyon verdiği ve oluşan ürünün genellikle reaksiyon ortamı asitlendirildikten sonra organik bir çözücü ile ekstre edildiği görülmüştür. Bu bilgilerden yararlanılarak gabapentin ve NBD-F arasındaki reaksiyon için en uygun koşullar araştırıldı. Çeşitli pH larda tampon çözeltilerle çalışıldığında en iyi sonucun pH 9,5 borat tamponunda elde edildiği gözlemlendi. Optimum sıcaklık ve reaksiyon süresinin saptanması amacıyla oda sıcaklığı, 50, 60, 70, 80 °C lerde 10-70 dakika arasında çalışıldı ve reaksiyonun 70 °C de 30 dakikada tamamlandığı belirlendi. Ayrıca, türevin kantitatif oranda oluşması için gerekli belirteç miktarı gabapentin/NBD-F mol oranı olarak incelendiğinde 6 mol kat belirtecin yeterli olduğu gözlemlendi.

Gabapentin-NBD türevinin sulu reaksiyon ortamından ekstraksiyonu için sistem 0,1 N HCl çözeltisi ile asitlendirildikten sonra çeşitli organik çözücüler denendi ve sonuç olarak etilasetat kullanıldığında en yüksek fluoresans şiddeti elde edilirken, bu çözücüye ait maksimum eksitasyon ve emisyon dalgaboyları sırasıyla 458 nm ve 521 nm olarak belirlendi.

Gabapentin-NBD türevinin etilasetat içinde dayanıklılığı incelendiğinde +4°C de, karanlıkta 48 saat bozunmadan kalabildiği saptandı.

Reaksiyon için en uygun koşullar belirlendikten sonra, konsantrasyon ile bağıl floresans şiddeti arasında doğrusallık 10-100 ng.mL⁻¹ dir. I_{Fort} değerlerinden hesaplanan doğru denklemi: $I_F = 0,1004C - 6,2 \times 10^{-2}$ dir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,43 ve 1,30 ng.mL⁻¹ olarak hesaplandı. Bu değerlerin oldukça düşük olması geliştirilen yöntemin duyarlı olduğunu göstermektedir. LOD ve LOQ değerleri literatürdeki yöntemlerle kıyaslandığında [13-14, 19-20, 32] yöntemlerden daha duyarlıdır.

Geliştirilen yöntemin kesinlik derecesini belirlemek üzere aynı gün içinde ve günler arası üç ayrı konsantrasyonda (10, 40 ve 100 ngmL⁻¹) gabapentin analiz edildi. Aynı gün içinde ve günler arası analizlerin bağıl standart sapmaları sırasıyla % 0,20-2,11 ve % 0,47-2,92 arasında bulundu. Yöntemin reaktif miktarı ve reaksiyon süresi gibi parametrelerinde ufak değişiklikler yapılarak yöntemin sağlamlığı araştırıldı. Bulunan RSD değerleri sırasıyla % 0,03-0,05 ve % 0,04-0,05 dir. Bulunan sonuçların dikkate alınacak değerde olmadığı gözlemlendi.

Geliştirilen spektrofotometrik yöntem gabapentin içeren kapsüllerin analizinde uygulandı. Geri kazanım % 100,66 ve RSD % 0,76 olarak bulundu. Gabapentin içeren kapsüllerin hem spektrofotometrik hem de farmakope yöntemiyle analiz edildi. Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi 6 deneme üzerinden standart sapma, bağıl standart sapma ve %95 olasılık düzeyinde güven sınırları hesaplanarak yapılmıştır. Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemi ortalamalar yönünden *t*-testi, standart sapmalar yönünden de *F*-testi kullanılarak karşılaştırıldı ve bulunan değerler ilgili cetvellerde verilen değerlerden daha küçük olduğu için aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada kapsüllerde gabapentin tayini için bildirilen yöntem tekrarlanabilirliği yüksek, basit, duyarlı ve maddelerin kullanım miktarları çok düşük olduğu için ekonomiktir. Bağıl standart sapma değerlerinin % 1 den küçük olması, türevin etilasetat içinde 48 saat dayanıklı kalabilmesi yöntemin önemli bir avantajıdır. Türevlendirme ve ekstraksiyon işlemleri ise fazla zaman almamaktadır. Bu nedenle rutin farmasötik analizler için rahatlıkla önerildiği gibi biyolojik sıvılarda gabapentin

analizleri ve biyoyararlanım çalışmaları içinde güvenilir bir yöntem olabileceği düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

1. Dökmeci İ, Farmakoloji Temel Kavramları, 2000; 327-329
2. *The Merck Index*, 13.baskı 2001; 767
3. Kayaalp, O. *Tıbbi Farmakoloji*, Ankara: Hacettepe Taş Kitabevi, 9.Baskı, 1998; 748
4. Walker MC, Patsalos MN. *Pharmacology & Therapeutics-Elsevier* 1995; **67**: 351-384
5. Ribeiro MF, Santos JL, Lima JL. Piezoelectric pumping in flow analysis: Application to the spectrophotometric determination of gabapentin. *Analytical Chimica Acta* 2007; **26**: 14-20
6. Ayad MM, El-Henawee MM, Abdellatef HE, El-Sayed HM. Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of gabapentin and cefprozil monohydrate using acetylacetone and formaldehyde. *Journal of Pharmaceutical Science* 2005; **19**: 157-160
7. Gujral RS, Haque SM. Development and validation of a new HPLC method for the determination of gabapentin. *International Journal of Biomedical Science* 2009; **5(1)**: 63-6911.
8. Sourı E, Jalalizadeh H, Shafiee A. Optimization of an HPLC method for determination of gabapentin in dosage forms through derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2007; **55**: 1427-1430
9. Ciavarella AB, Gupta A, Sayeed VA, Khan MA, Faustino PJ. Development and application of a validated HPLC method for the determination of gabapentin and its major degradation impurity in drug products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; **46**: 181-186
10. Sekar R, Azhaguvel S. Indirect photometric assay determination of gabapentin in bulk drug and capsules by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004; **36**: 663-667

11. Wolf CE, Saady JJ, Poklis A. Determination of gabapentin in serum using solid-phase extraction and gas-liquid chromatography. *Journal of Analytical Toxicology* 1996; **20**: 498-501
12. Hooper WD, Kavanagh MC, Dickinson RG. Determination of gabapentin in plasma and urine by capillary column gas chromatography. *Journal of Chromatography B* 1990; **529(1)**: 167-74.
13. Kushnir MM, Crossett J, Brown PI, Urry FM. Analysis of gabapentin in serum and plasma by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *Journal of Analytical Toxicology* 1999; **23**: 1-6
14. Borrey DC, Godderis KO, Engelrelst VI, Bernard DR, Langlois MR. Quantitative determination of vigabatrin and gabapentin in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* 2005; **354**: 147-151
15. Gambelunghe C, Mariucci G, Tantucci M, Ambrosini V. Gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of gabapentin in serum. *Biomedical Chromatography* 2004; **19**: 63-67
16. Matar KM, Abdel-Hamid ME. Rapid tandem mass spectrometric method for determination of gabapentin in human plasma. *Chromatographia* 2005; **61**: 499-504
17. Ji HY, Jeong DW, Kim YH, Yoon Y, Lee KC, Lee HS. Determination of gabapentin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006; **20**: 2127-2132
18. Ojha A, Rathod R, Patel C, Padh H. LC-MS determination of gabapentin from human plasma. *Chromatographia* 2007; **66**: 853-857
19. Ramakrishna NV, Vishwottam KN, Koteshwara M, Manoj S, Santosh M, Chidambara J, Sumatha B, Varma DP. Rapid quantification of gabapentin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; **40**: 360-368
20. Carlsson KC, Reubsaet JLE. Sample preparation and determination of gabapentin in venous and capillary blood using liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004; **434**: 415-423
21. Gauthier D, Gupta R. Determination of gabapentin in plasma by liquid chromatography with fluorescence detection after solid-phase extraction with a C18 column. *Clinical Chemistry* 2002; **48**: 2259-2261
 22. Lensmeyer GL, Kempf T, Gidal BE, Wiebe DA. Optimized method for determination of gabapentin in serum by high-performance liquid chromatography. *A Journal Devoted to Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Drug Toxicology* 1995; **17**: 213-318
 23. Forrest G, Sills GJ, Leach JP, Brodie MJ. Determination of gabapentin in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1996; **681**: 421-425
 24. Juergens UH, May TW, Rambeck B. Simultaneous HPLC determination of vigabatrin and gabapentin in serum with automated pre-injection derivatization. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 1996; **19**: 1459 – 1471
 25. Wad N, Krämer G. Sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorometric detection for the simultaneous determination of gabapentin and vigabatrin in serum and urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1998; **705**: 154-158
 26. Tang PH, Miles MV, Glauser TA, DeGrauw T. Automated microanalysis of gabapentin in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999; **727**: 125-129
 27. Jalalizadeh H, Souri E, Tehrani MB, Jahangiri A. Validated HPLC method for the determination of gabapentin in human plasma using pre-column derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B* 2007; **854**: 43-47

28. Sagirli O, Cetin SM, Onal A. Determination of gabapentin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with UV-vis detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; **42**: 618-624
29. Zhu Z, Neirinck L. High-performance liquid chromatographic method for the determination of gabapentin in human plasma. *Journal of Chromatography B* 2002; **779**: 307-312
30. 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
31. Qibo J, Shuguang L. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of serum gabapentin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999; **727**: 119-123
32. Daniel F. Chollet LG, Corinne JGA. Fast isocratic high-performance liquid chromatographic assay method for the simultaneous determination of gabapentin and vigabatrin in human serum. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2000; **746**: 31
33. Vermeji TA, Edelbroek PM. Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 2004; **810**: 297-303
34. Krivanek P, Koppatz K, Turnheim K. Simultaneous isocratic HPLC determination of vigabatrin and gabapentin in human plasma by dansyl derivatization. *Therapeutic Drug Monitoring* 2003; **25(3)**: 374-7.
35. Garcia L, Liliana S, Zak K, Oles K. Determination of gabapentin in serum by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1995; **662**: 157-162
36. Sarah YC, Feng-Yu W. Determination of gabapentin in human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection and acetonitrile stacking technique. *Journal of Chromatography B* 2004; **799**: 265-270

37. Suzuki S, Shimotsu N, Honda S, Arai A, Nakanishi H. Rapid analysis of amino sugars by microchip electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 2001; **22**: 4023-4031
38. Baeyens WRG, Van DWG, Vanden BY, Van O, Imai K. Flow injection analysis of some nonapeptides derivatized with 4-fluoro-7-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole. *Biomedical Chromatography* 1997; **11(2)**: 109-10.
39. Al-Majed AA. Specific spectrofluorometric quantification of d-penicillamine in bulk and dosage forms after derivatization with 4-fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000; **408**: 827-833.
40. Imai K, Watanabe Y, Toyooka T. Fluorometric assay of amino acids and amines by use of 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F) in high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 1982; **16**: 214-215
41. Imai K, Watanabe Y. Fluorimetric determination of secondary amino acids by 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Analytica Chimica Acta* 1981; **130**: 377-383
42. Hui Y, Carroll S, Mars KC. Development of a sensitive method for quantitation of ABT- 089 in plasma using fluorescence labeling with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1997; **695**: 337-347
43. Watanabe Y, Imai K. Sensitive detection of amino acids in human serum and dried blood disk of 3 mm diameter for diagnosis of inborn errors of metabolism. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1984; **309**: 279-286
44. Aoyama C, Santa T, Tsunoda M, Fukushima T, Kitada C, Imai K. A fully automated amino acid analyzer using NBD-F as a fluorescent derivatization reagent. *Biomedical Chromatography* 2009; **18**: 630-636
45. Higashi Y, Gao R, Fujii Y. Determination of Fluoxetine and Norfluoxetine in human serum and urine by HPLC using a cholesteryl column with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 2009; **32**: 1141-1151
46. Yoshinaga K, Kobayashi N, Nagatani Y, Tanaka Y, Ikeda Y. A sensitive detection method for peptide using 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole and its

- application to measure prolyl endopeptidase activity. *Biomedical Chromatography* 1994; **8(6)**: 297-300.
47. Sawabe Y, Tagami T, Yamasaki K. Determination of taurine in energy drinks by HPLC using a pre-column derivative. *Journal of Health Science* 2008; **54(6)**: 661-664
48. Hamase K, Zaitu K. Determination of small amounts of D-amino acids in mammals using column-switching HPLC. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2005; **28(9)**: 1578-84
49. Higashi Y, Nakamura S, Fujii Y. Sensitive determination of 4-(4-bromophenyl)-4-hydroxypiperidine, a metabolite of bromperidol, in rat plasma by HPLC with fluorescence detection after pre-column derivatization using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2006; **29**: 2479-2482
50. Uchino E, Fukushima T, Tsunoda M, Santa T, Imai K. Determination of rat blood S-D-lactoylglutathione by a column-switching high-performance liquid chromatography with precolumn fluorescence derivatization with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *Analytical Biochemistry* 2004; **330**: 186-192
51. Kakinuma M, Watanabe Y, Hori Y, Oh-i T, Tsuboi R. Quantification of hydroxyproline in small amounts of skin tissue using isocratic high performance liquid chromatography with NBD-F as fluorogenic reagent. *Journal of Chromatography B* 2005; **824**: 161-165
52. Gozdowska M, Kulczykowska E. Determination of arginine-vasotocin and isotocin in fish plasma with solid-phase extraction and fluorescence derivatization followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 2004; **807**: 229-233
53. Zhu X, Shaw P, Nicholas B, David A. Catecholamines derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole: characterization of chemical structure and fluorescence properties. *Analytica Chimica Acta* 2003; **478**: 259-269
54. Zhao S, Feng Y, LeBlanc MH, Piletz JE, Liu Y. Quantitation of agmatine by liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 2002; **470**: 155-161

55. Namera A, So A, Pawliszyn J. Analysis of anatoxin-a in aqueous samples by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and on-fiber derivatization. *Journal of Chromatography A* 2002; **963**: 295-302
56. Bryan PD, Emry ML, El-Shourbagy TA. Determination of ABT-089 in human plasma by high performance liquid chromatography using in situ precolumn derivatization with 7-fluoro-4-nitrobenzo2oxa 1,3 diazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1999; **20**: 49-63
57. James KJ, Furey A, Sherlock IR, Stack MA, Twohig M, Caudwell FB, Skulberg OM. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A* 1998; **798**: 147-157
58. Kamisaki Y, Wada K, Nakamoto K, Kishimoto Y, Kitano M, Itoh T. Sensitive determination of nitrotyrosine in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1996; **685**: 343-347
59. Imai K, Fukushima T. Derivatization with fluorogenic benzofurazan reagents of amino acid enantiomers and their separation on a Pirkle type column. *Biomedical Chromatography* 1993; **7(5)**: 275-276.
60. Scott PM, Lawrence GA. Analysis of beer for fumonisins. *Food Additives and Contaminants* 1997; **14(5)**: 445-50.
61. Akiyama H, Miyahara M, Toyoda M, Saito Y. Comparison of several fluorescence HPLC methods for fumonisin analysis. *Eisei Shikenjo Hokoku*. 1994; **112**: 7
62. Iwaki K, Okumura N, Yamazaki M, Nimura N, Kinoshita T. Precolumn derivatization technique for high-performance liquid chromatographic determination of penicillins with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1990; **504**: 359-367

63. Kotaniguchi H, Kawakatsu M, Toyooka T, Imai K. Automatic amino acid analysis utilizing 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Journal of Chromatography* 1987; **4**: 141-145
64. Kaneko T, Ohta Y, Machida Y. Sensitive analysis of aminophospholipids with precolumn fluorescent derivatization by high-performance liquid chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry* 1987; **51**: 2023-2024
65. Imai K. High performance liquid chromatography of amino acids and polyamines utilizing NBD-F as a precolumn labeling reagent. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 1984; **29(6)**: 469-471
66. Watanabe N, Toyooka T, Imai K. HPLC electrochemical fluorometric detection of amino acids including tryptophan using 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Biomedical Chromatography* 1987; **2(3)**: 99-103
67. Hauck M, Kobler H. Determination of cyclamate in complex matrix using HPLC after column derivatization with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Forschung* 1990; **191(4-5)**: 322-324.
68. Higashi Y, Nakamura S, Matsumura H, Fujii Y. Simultaneous liquid chromatographic assay of amantadine and its four related compounds in phosphate-buffered saline using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorescent derivatization reagent. *Biomedical Chromatography* 2006; **20**: 423-428
69. Zhang W, Lang C, Kaye DM. Determination of plasma free 3-nitrotyrosine and tyrosine by reversed-phase liquid chromatography with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan derivatization. *Biomedical Chromatography* 2007; **21(3)**: 273-278
70. Tsunoda M, Kato M, Fukushima T, Santa T, Homma H, Yanai H, Soga T, Imai K. Determination of aspartic acid enantiomers in bio-samples by capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography* 1999; **13(5)**: 335-339.
71. Tseng H, Gattolin S, Pritchard J, Newbury HJ, Barrett DA. Analysis of mono-, di- and oligosaccharides by CE using a two-stage derivatization method and LIF detection. *Electrophoresis* 2009; **30**: 1-7.

72. Zhang H, Potier I, Smadja C, Zhang J, Taverna M. Fluorescent detection of peptides and amino acids for capillary electrophoresis via on-line derivatization with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006; **386**: 1387-1394
73. Song Y, Quan Z, Evans JL, Byrd EA, Liu Y. Enhancing capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry of biogenic amines by pre-column derivatization with 7-fluoro-4-nitrobenzoxadiazole. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2004; **18**: 989-994
74. Zhou L, Zhou X, Luo Z, Wang W, Yan N, Hu Z. In-capillary derivatization and analysis of ephedrine and pseudoephedrine by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 2008; 1190: 383-389
75. The United States Pharmacopeial Convention (USP) XXXII. 2009; 2464-2465
76. Rockville, MD. Guidance for Industry: ICH-Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, *Food and Drug Administration*, 1997

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Elif	Soyadı	Kel
Doğ.Yeri	Ümraniye	Doğ.Tar.	25.10.1984
Uyruğu	T.C	TC Kim No	22603212604
Email	elifkel@live.com	Tel	0541 453 45 15

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Trakya Üniversitesi	2007
Lise	Habire Yahşi Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Mesul Müdür	İpekpınar Doğal Kaynak Suları	2007-2009
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi	70	
Almanca	orta	orta	orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	81,99	77,841	71,617
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	iyi
ChemDraw	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Kitap okumak, satranç oynamak,yüzmek