

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**GALANTAMİNİN BİYOLOJİK SIVILARDA YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) İLE
ANALİZİ**

ELİF ÖZDEMİR

**DANIŞMAN
PROF.DR.SEVGİ TATAR ULU**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**



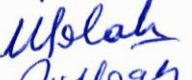
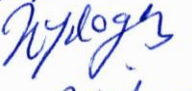

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Doktora Programında Elif ÖZDEMİR tarafından hazırlanan Galantaminin biyolojik sıvılarda yüksek performanslı sıvı kromatografisi(HPLC) ile analizi başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

11 / 05 / 2016

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Serap SAĞLIK ASLAN İ.Ü Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.D.	
2.Prof. Dr. Sıdıka SUNGUR İst. Yen. Yüz. Üni. Ecz. Fak. Analitik Kimya A.D.	
3..Prof. Dr. Ufuk KOLAK. İ.Ü.Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.D.	
4.Prof. Dr. Zeynep AYDOĞMUŞ İ.Ü.Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.D.	
5. Yrd. Doç. Dr. Filiz ARIÖZ ÖZDEMİR Marmara Üni. Ecz. Fak. Analitik Kimya A.D.	

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 ÖZDEMİR



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini hiç esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan'a;

İlgisini ve yardımlarını eksik etmeyen Yeni Yüzyıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. İmer Okar ve Dekan yardımcısı Sayın Prof. Dr. Sıdika Sungur'a

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, samimiyeti ile yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Sevgi Tatar Ulu'ya;

Ayrıca Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Anorganik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Fikriye Elmalı'ya

Çalışmam boyunca zamanını ve desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Sena Çağlar'a

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili aileme, Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 55961

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	II
BEYAN.....	III
İTHAF.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Galantamin Hidrobromür.....	3
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikler.....	3
2.1.2. Farmakolojisi	5
2.1.3. Analiz Yöntemleri.....	6
2.1.3.1. Farmasötik Preparatlarda Yapılan Analizler.....	6
2.1.3.2. Biyolojik Sıvılarda Yapılan Analizler	8
2.2.2.Dansil Klorür	11
2.2.2.1. Genel Bilgi	11
2.2.2.2. Analiz Yöntemleri.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler.....	17
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	17
3.1.2. Çözeltiler.....	18
3.1.2.1. Galantamin ve Dansil Klorür Çözeltileri	18
3.1.2.2. Tampon Çözeltiler	18
3.1.2.3. Mobil Faz Çözeltisi.....	19
3.2. Aletler ve Gereçler	19
3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesiyle İlgili Çalışmalar	20

3.3.1. Galantaminin Dansil klorür İle Reaksiyonun Koşullarının İncelenmesi	20
3.3.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü.....	20
3.3.1.2. pH.....	20
3.3.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi.....	21
3.3.1.4. Belirteç Miktarı.....	21
3.3.2. Galantaminin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisiyle (HPLC) Analizi	21
3.3.2.1. Galantamin-Dansil Türevinin Hazırlanması	21
3.3.2.2. Detektör Dalga Boyu ve Kolon Seçimi	21
3.3.2.3. Mobil Faz Seçimi.....	22
3.3.2.4. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrisi Hazırlanması	22
3.3.2.5. İdrarda Ölçü Eğrisi Hazırlanması	22
3.3.2.6. Plazma Proteinlerinin Çöktürülmesi ve Ekstraksiyon İşlemleri	22
3.3.2.7. Plazmada Ölçü Eğrisi Hazırlanması	23
3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	23
3.4.1. Doğrusallık.....	24
3.4.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	24
3.4.3. Kesinlik ve Doğruluk.....	24
3.4.3.1. Gün içi Tekrarlanabilirlik	24
3.4.3.2. Günler arası Tekrarlanabilirlik.....	24
3.4.4. Robustness (Yöntemin Sağlamlığı)	24
3.4.5. Uygunluk Testi	25
3.4.6. Galantamin-Dansil Türevinin Stabilitesi	25
3.4.7. İdrar ve Plazmadan Geri Kazanım.....	25
3.5. Kapsüllerde Galantamin Miktar Tayini	25
3.5.1. Geliştirilen HPLC Yöntemiyle Miktar Tayini	25
3.5.2. Kıyas Yöntemi İle Miktar Tayini.....	26
4. BULGULAR.....	28
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesiyle İlgili Çalışmalar	28
4.1.1. Galantaminin Dansil klorür ile Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi	28
4.1.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü.....	28
4.1.1.2. pH.....	30
4.1.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi.....	31
4.1.1.4. Belirteç Miktarı.....	32

4.1.2. Galantaminin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Analizi	33
4.1.2.1. Galantamin-Dansil Türevinin Hazırlanması	33
4.1.2.2. Detektör Dalga Boyu ve Kolon Seçimi	34
4.1.2.3. Mobil Faz Seçimi	34
4.1.2.4. Plazma Proteinlerinin Çöktürülmesi ve Ekstraksiyon İşlemleri	35
4.1.2.5. Sulu Çözeltide Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi	36
4.1.2.6. İdrarda Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi	38
4.1.2.7. Plazmada Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi	40
4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	42
4.2.1. Doğrusallık	42
4.2.2. Gözlenebilme (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları	42
4.2.3. Kesinlik ve Doğruluk	43
4.2.3.1. Aynı Gün İçinde İdrar ve Plazmada Yapılan Analizlerin Tekrarlanabilirliği ...	43
4.2.3.2. Farklı Günlerde İdrar ve Plazmada Yapılan Analizlerin Tekrarlanabilirliği	45
4.2.4. Yöntemin Sağlamlığı (Robustness)	46
4.2.5. Uygunluk Testi	46
4.2.6. Galantamin-Dansil Türevinin Stabilitesi	47
4.2.7. Geri Kazanım	48
4.3. Kapsüllerde Galantamin Miktar Tayini	48
5. TARTIŞMA	50
KAYNAKLAR	53
ETİK KURUL KARARI	63
ÖZGEÇMİŞ	64

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1 Galantamin-dansil türevinin çeşitli organik çözücülerdeki maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları ile floresans şiddeti değerleri	29
Tablo 4-2 Çeşitli pH larda oluşturulan galantamin-dansil türevine ait floresans şiddeti değerleri	31
Tablo 4-3 Çeşitli sıcaklık ve zamanlarda oluşturulan galantamin-dansil türevine ait floresans şiddeti değerleri	32
Tablo 4-4 Çeşitli hacimlerdeki dansil klorür miktarına karşı galantamin-dansil türevine ait floresans şiddeti değerleri	33
Tablo 4-5 Plazma proteinlerinin çöktürülmesi ve ekstraksiyon işleminin pik alanına etkisi.....	35
Tablo 4-6 Galantamin 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisi.....	37
Tablo 4-7 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler.....	37
Tablo 4-8 Galantaminin 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında idrarda hazırlanan ölçü eğrisi.....	39
Tablo 4-9 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler.....	39
Tablo 4-10 Galantaminin 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrisi.....	41
Tablo 4-11 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler.....	41
Tablo 4-12 İdrarda gözlenebilme ve tayin sınırları	43
Tablo 4-13 Plazmada gözlenebilme ve tayin sınırları	43
Tablo 4-14 Aynı gün içinde idrarda yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği	44
Tablo 4-15 Aynı gün içinde plazmada yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği	44
Tablo 4-16 Farklı günlerde idrarda yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.....	45
Tablo 4-17 Farklı günlerde plazmada yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.....	46
Tablo 4-18 Uygunluk testi sonuçları.....	47
Tablo 4-19 Galantamin-dansil türevinin stabilitesi.....	47
Tablo 4-20 8 mg galantamin içeren kapsüllerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi.....	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Galantamin hidrobromürün kimyasal formula.....	3
Şekil 2-2 Galantamin hidrobromürün (40µg/mL) UV spektrumu (metanolde)	4
Şekil 2-3 Galantamin hidrobromürün FTIR spektrumu.....	4
Şekil 2-4 Dansil klorürün kimyasal formula.....	12
Şekil 4-1 Galantaminin dansil klorür ile reaksiyonu.....	28
Şekil 4-2 Galantamin-dansil türevinin çeşitli organik çözücülerdeki fluoresans şiddeti.....	29
Şekil 4-3 Boşun diklorometandaki emisyon spektrumu (λeks =375 nm, λem =537 nm).....	29
Şekil 4-4 Galantamin-dansil türevinin (500 ng/mL) diklorometandaki emisyon spektrumu (λeks =375 nm, λem =537 nm)	29
Şekil 4-5 Galantamin-dansil türevinin oluşumu üzerine pH nın etkisi.....	30
Şekil 4-6 Galantamin- dansil türevinin oluşması üzerine sıcaklık ve zaman etkisi.....	31
Şekil 4-7 Galantamin-dansil türevinin oluşumu üzerine belirteç miktarının etkisi.....	33
Şekil 4-8 Boş ve galantamin-dansil türevinin kromatogramı	34
Şekil 4-9 Boş ve galantamin (500 ng/mL) katkılı idrar örneğine ait kromatogram.....	35
Şekil 4-10 Boş ve galantamin (125ng/mL) katkılı plazma örneğine ait kromatogram....	36
Şekil 4-11 Galantaminin 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisi.....	38
Şekil 4-12 Galantaminin 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında idrarda hazırlanan ölçü eğrisi.....	40
Şekil 4-13 Galantaminin 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrisi.....	42

SEMBOLLER / kısaltmalar İİstesİ

- AUC : Biyoyararlanım ölçümlerinde eğri altında kalan alan
- C₁₈ : Oktadesil silan
- 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
- LC-ESI-MS: Sıvı kromatografisi-Elektrosprey İyonizasyon-Kütle Spektrometrisi
- LC-ESI-QIT-MS: Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonizasyon Kudrapre İyon Trep kütle Spektrometrisi
- LOD : Gözlenebilme Sınırı
- LOQ : Tayin Sınırı
- ODS : Oktadesil silan
- RP-HPLC : Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
- RSD : Bağlı standart sapma
- UPLC-MS/MS : Ultra Performanslı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -Tandem Kütle Spektrometrisi
- UPLC-ESI-MS/MS: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonizasyon-Tandem Kütle Spektrometrisi
- UPLC/QTOF-MS: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi/kuadrapol Uçuş zamanlı kütle spektrometrisi
- UV : Ultraviyole

ÖZET

Özdemir, E. Galantaminin Biyolojik Sıvılarda Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Analizi İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya AD. Doktora Tezi. İstanbul. 2016

Bu çalışmada galantaminin farmasötik preparatlarda, insan idrar ve plazmasında tayini için hidroksil grupların analizinde spesifik bir belirteç olan 5-dimetilamino-naftalen-1-sülfonil klorür (dansil klorür) ile türev oluşumuna dayanan yüksek performanslı sıvı kromatografik (HPLC) bir yöntem geliştirildi.

Galantamin ile dansil klorür arasındaki reaksiyonun optimum koşulları incelendiğinde, reaksiyon pH 10,5'da, oda sıcaklığında 30 dakika içerisinde, belirteç/galantamin mol oranı 2,13 olduğunda reaksiyon tamamlanmaktadır. Oluşan türev, diklorometan ile ekstre edildi. Çözücü kuruluğa kadar uçuruldu ve kalıntı mobil fazda çözündürüldü. Kromatografik analiz, Inertsil C₁₈ kolon ve 1,2 mL/dak akış hızında %40 asetonitril :%60 10mM o-fosforik asit mobil faz sistemi kullanılarak ve 20 µL enjeksiyonla gerçekleştirildi. Türev floresans detektör (eks.375nm/em.537nm) ile tespit edildi. Galantamin-Dansil türevinin retensiyon zamanları 16,8 dakika olarak belirlendi. Galantamin konsantrasyonu ve pik alanları arasında ölçü eğrisi hazırlandı. Doğrusallık suda, idrar ve plazmada 125-2000ng/mL aralığında gözlemlendi. Galantaminin idrar ve plazmadan ortalama geri kazanma oranı sırasıyla %95,15 ve %95,78 olarak hesaplandı. Üç farklı konsantrasyonda galantamin içeren idrar ve plazma örneklerinin aynı gündeki analiz sonuçlarının (n=6) tekrarlanabilirlikleri % RSD olarak %0,24-0,59 ve %0,35-0,56 arasında bulundu. Farklı günlerde tekrarlanabilirlikleri sırasıyla %0,13-0,51 ve %0,04-0,15 arasındadır.

Geliştirilen yöntem kapsüllerde galantamin miktar tayinine uygulandı. Sonuçlar USP (USP XXXII) yöntemiyle elde edilen sonuçlarla t- ve F- testleri kullanılarak istatistiksel olarak kıyaslandı ve %95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: Galantamin, Dansil klorür (5-dimetilamino-naftalen-1-sülfonil klorür), Türevlendirme, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, idrar, plazma

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Tez proje No: 55961

ABSTRACT

Özdemir, E. (2016). Analysis of Galantamine in Biological Fluids by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Ph D Thesis. İstanbul.

In this study, a high performance liquid chromatographic method was developed for quantitative determination of galantamine in pharmaceutical drugs, urine and human plasma, based on fluorescence derivatization with 5-(dimethylamino) naphthalene-1-sulfonyl chloride (dansyl chloride) an specific reagent for primary, secondary amines and hydroxyl groups analysis.

The reaction between galantamine and dansyl chloride is optimally realized in 30 minutes at room temperature and pH 10.5, with a reagent to galantamine molar ratio of 2.13. The derivative was extracted with dichlorometane. After the extraction, solvent was dried under stream of nitrogen and dissolved in mobile phase. Chromatographic analysis has been performed with Inertsil C18 column and with a flow rate of 1.2mL/min, the mobile phase consisting 40% acetonitrile and 60% 10mM o-phosporic acide. Injection volume was 20 μ L. The derivatives were detected with a fluorescence detector (ex.375nm/em.537nm). The retention times for dancyl derivative of galantamine was 16.8 min. Linearity was observed between 125-2000ng/mL in water, urine and plasma. The recovery has been calculated as 95.15% for urine and 95.78% for plasma. Inter-day repeatability results of urine and plasma samples (n=6) with three different concentrations were calculated as RSD between 0.24-0.59% and 0.35-0.56. Intra-day repeatabilities are between 0.13-0.51% and 0.04-0.15%, respectively.

The method was applied to galantamine assay to the capsules. The results were compared with pharmacopoeia (USP XXXII) method using t-test and F-test and no significant difference was observed at confidence level of 95%. The HPLC method was applied to determination of galantamine in urine and human plasma.

Key Words: Galantamine, 5-(dimethylamino) naphthalene-1-sulfonyl chloride (dansyl chloride), derivatization, high performance liquid chromatography, urine, plasma

The present work was supported by the Research Project Coordination Fund of Istanbul University. Project No. 55961.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Galantamin hidrobromür hafif-orta şiddette Alzheimer hastalığı belirtilerinin tedavisinde kullanılan bir kolin esteraz inhibitörüdür. Asetilkolinesteraz enzimini reversibl olarak ve kompetitif bir şekilde inhibe eder. Alzheimer hastalığı olan bireylerin beyinlerindeki asetilkolin üreten kolinerjik nöronlarda ilerleyici nitelikte bir dejenerasyon vardır. Alzheimer hastalığındaki kognitif zaafiyetin etiyolojisinin tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen, sorunun beyinde asetilkolin üreten nöronların bu dejenerasyonu olduğu düşünülmektedir. Kolinerjik kaybın düzeyi ile kognitif zaafiyetin düzeyi ve amiloid plakların yoğunluğu (Alzheimer hastalığının işareti) ilişkilidir. Galantamin hafif-orta şiddette Alzheimer tipi demansta endikedir. Galantamin Alzheimer hastalığını tedavi etmez ve Alzheimer hastalığına neden olan hücre hasarı sürecini durdurmaz veya tersine çevirmez. Sadece hastalığın belirtilerinin düzelmesini sağlar.

Galantamin hidrobromür oral yoldan alınır. Oral yoldan absorpsiyonu iyidir. Mutlak biyoyararlanımı yaklaşık %90'dır. Terminal eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 7 saattir. Farmakokinetiği 8-32 mg/gün aralığında doğrusaldır. Sağlıklı erkek deneklerde oral yoldan tek doz 8 mg uygulandıktan bir saat sonra asetilkolinesteraz aktivitesindeki maksimum inhibisyon yaklaşık %40'tır. Galantamin hızlı ve tam olarak absorbe olur. Doruk konsantrasyona ulaşma süresi 1 saattir. Tablet ve oral çözeltisinin biyoyararlanımı birbirine eşittir. Besinlerle birlikte alınması AUC değerini etkilememesine rağmen, Cmaks değerinin %25 azalmasına ve Tmaks süresinin 1,5 saat kısalmasına neden olur. Galantaminin ortalama dağılım hacmi 175 L'dir. Galantamin terapötik konsantrasyonlarda plazma proteinlerine %18 oranında bağlanır. Tam kanda esas olarak kan hücrelerine %52,7 oranında bağlanır. Kan plazma konsantrasyon oranı 1:2 dir (1).

Amin grubu ve hidroksil grubu içeren ilaç etken maddelerinin analizleri için geliştirilen yöntemlerin çoğu türevlendirme reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu amaçla kullanılan belirteçler arasında önemli bir yere sahip olan dansil klorür, primer, sekonder aminlerin ve hidroksil gruplarının analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada hidroksil grubu içeren galantaminin gerek farmasötik preparatlarda gerek idrar ve plazmada tayini için basit, duyarlı ve güvenilir bir yüksek

performanslı sıvı kromatografik analiz yöntemi geliştirilmesi amaçlandı. Bu amaçla hidroksil grubu içeren galantaminin dansil klorür ile renkli bir türev oluşturmasından yararlanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografik bir yöntem geliştirildi.

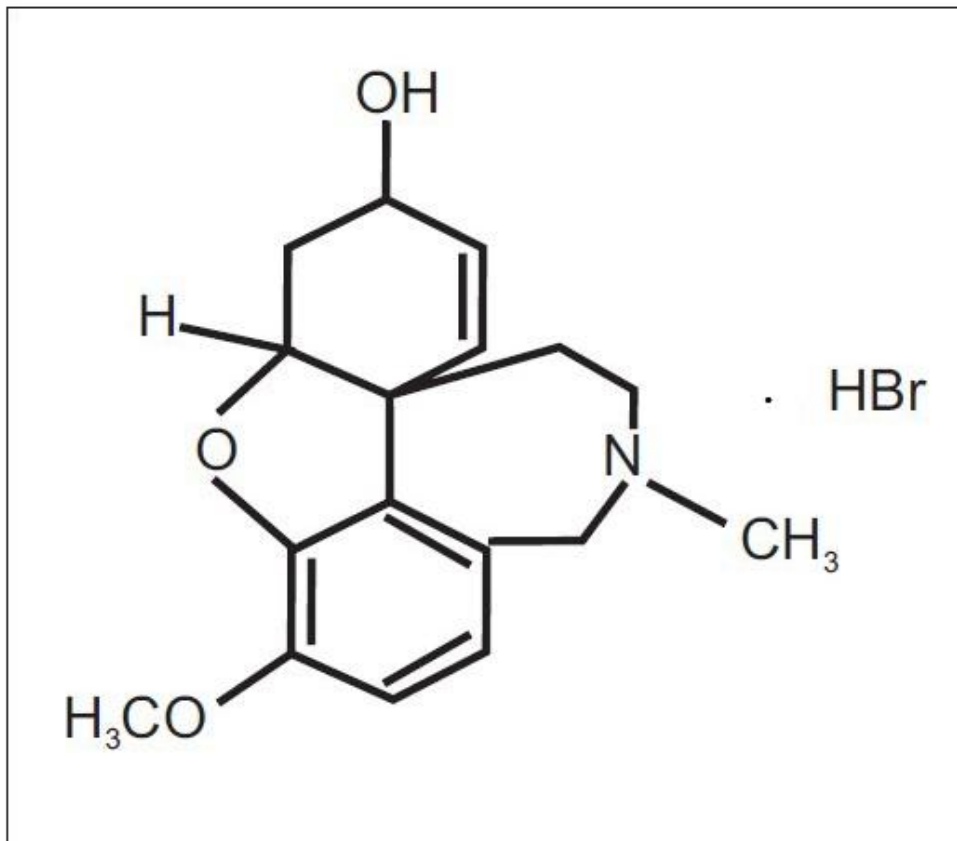
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Galantamin Hidrobromür

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikler

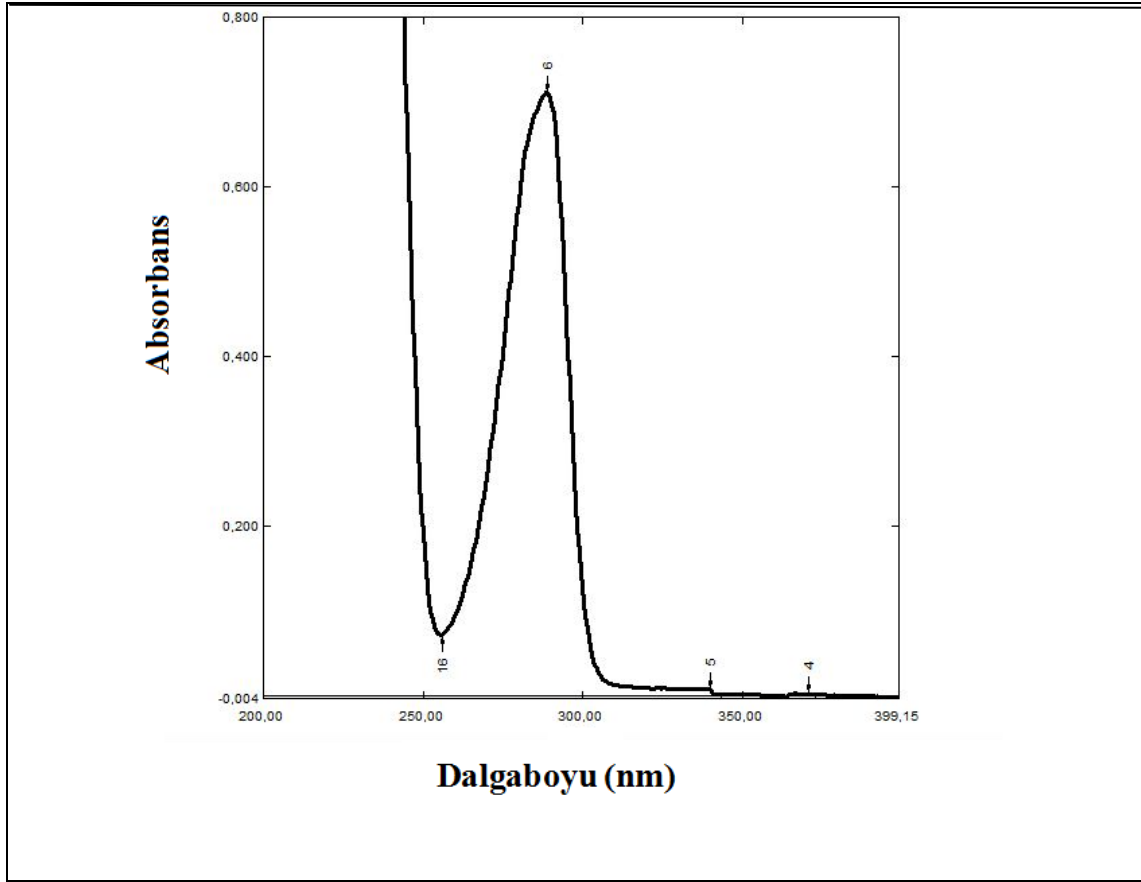
Kimyasal adı (4a*S*,6*R*,8a*S*)-5,6,9,10,11,12-hekzahidro-3-metoksi-11-metil-4a*H*[1]benzofuro[3a,3,2-*ef*][2]benzazepin-6-ol hidrobromürdür (Şekil 2.1). Kapalı formülü $C_{17}H_{22}BrNO_3$ olan galantamin hidrobromürün molekül ağırlığı 368,27 g/mol dür.

Galantamin hidrobromür beyaz renkte kokusuz tozdur. Galantamin hidrobromür sıcak suda, alkol, aseton, kloroformda kolay çözünür, benzen ve eterde çözünmez. Kaynama noktası 126-127°C'dir. Yoğunluğu 1,249 g/cm³'tür. Kırılma indisi 1,592'dir (2). Baz haldeki galantaminin kapalı formülü $C_{17}H_{21}NO_3$, molekül ağırlığı 287,354 g/mol dür.

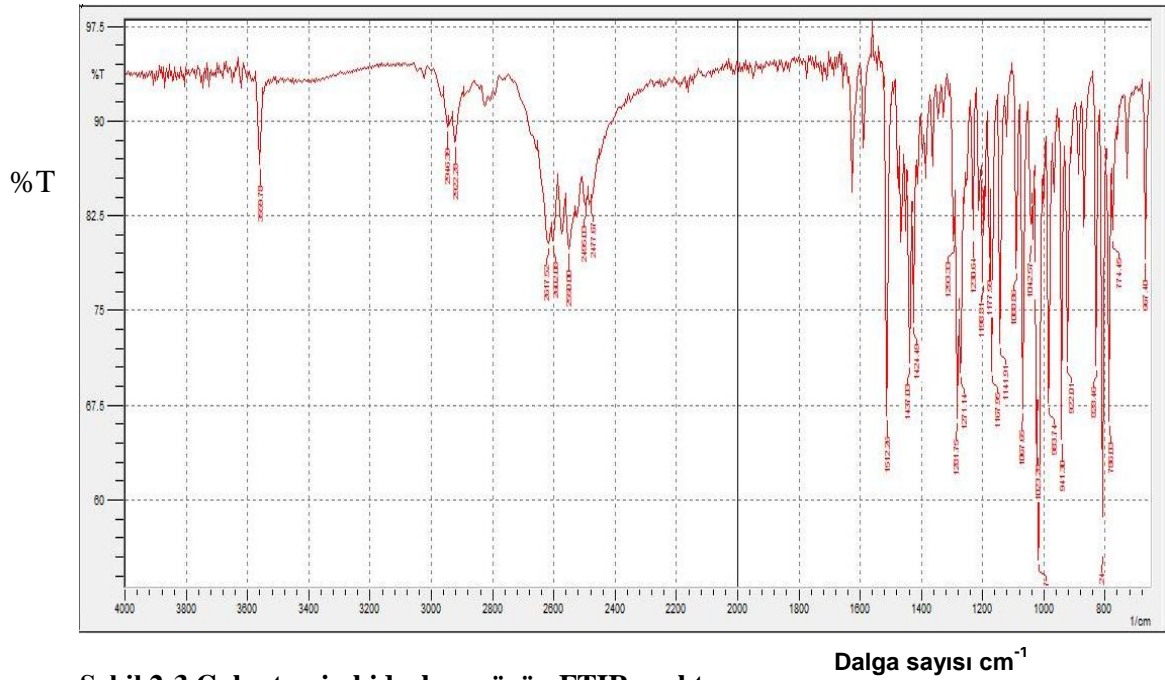


Şekil 2-1 Galantamin hidrobromürün kimyasal formülü

Galantamin hidrobromürün metanolde alınan UV spektrumu Şekil 2.2'de, Fourier Dönüşümlü İnfrared (FT-IR) spektrumu Şekil 2.3'te görülmektedir.



Şekil 2-2 Galantamin Hidrobromürün (40 µg/ mL) UV Spektrumu (metanolde)



Şekil 2-3 Galantamin hidrobromürün FTIR spektrumu

Dalga sayısı cm⁻¹

2.1.2. Farmakolojisi

Tersiyer bir alkaloid olan galantamin asetilkolinesteraz enziminin (AChE) kompetitif ve seçici bir inhibitörüdür. Kesin etkisi bilinmemesine rağmen, galantaminin terapötik etkisini kolinerjik işlevi artırarak gösterdiği sayılmaktadır. Asetilkolinin yıkımından sorumlu enzim olan asetilkolinesterazı inhibe eder ve asetilkolin düzeyinin artmasını sağlar. İlaç bu etkisini kolinesteraz enzimini reversibl olarak inhibe ederek gösterir. Kolinesteraz enziminin blokajı asetilkolin'in hidrolizinin reversibl olarak inhibisyonuna neden olur. Eğer bu mekanizma doğru ise, galantamin'in etkisi hastalık süreci ilerledikçe ve işlevsel kolinerjik nöronların sayısı azaldıkça giderek zayıflayabilir.

Galantamin hidrobromür SSS'de bulunan antikolinesteraz'a, periferdeki butilkolinesteraza göre çok daha yüksek afinite gösterir. Hâlbuki organofosfatlar, akridinler, karbamatlar, fizostigmin ve kuarterner amonyum yapıları antikolinesteraz ilaçlar (ambenonyum, neostigmin, piridostigmin gibi) her iki enzime de eşit afinite gösterirler. Ancak kuarterner amonyum yapısındaki antikolinesteraz inhibitörleri mutad dozlarda kullanıldıklarında kan beyin engelini aşamazlar ve bu nedenle esas olarak periferdeki kolinesteraz enzimini etkilerler.

Serebral kortekste asetilkolin düzeylerinin artması düşünme, öğrenme ve hafızada sağlanan olumlu gelişmelerden sorumlu tutulmaktadır. Bu mekanizma sağlam kolinerjik nöronların varlığını gerektirir. Alzheimer hastalığının ilerlemesi sağlam kolinerjik nöronların sayısının azalmasına neden olduğundan, galantamin hidrobromür'ün bu tür olgulardaki etkinliği daha düşüktür. Galantamin hidrobromür tedavisinin demansa yön veren gidişatı etkilediğine işaret eden herhangi bir bulgu yoktur.

Galantamin hidrobromür oral yoldan alınır. Oral yoldan absorpsiyonu iyidir. Mutlak biyoyararlanımı yaklaşık %90'dır. Terminal eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 7 saattir. Farmakokinetiği 8-32 mg/gün aralığında doğrusaldır. Sağlıklı erkek deneklerde oral yoldan tek doz 8 mg uygulandıktan bir saat sonra asetilkolinesteraz aktivitesindeki maksimum inhibisyon yaklaşık %40'tır. Galantamin hızlı ve tam olarak absorbe olur. Doruk konsantrasyona ulaşma süresi 1 saattir. Tablet ve oral çözeltisinin biyoyararlanımı birbirine eşittir. Besinlerle birlikte alınması AUC değerini etkilememesine rağmen, C_{maks} değerinin %25 azalmasına ve T_{maks} süresini 1,5 saat kısalmasına neden olur. Galantaminin ortalama dağılım hacmi 175 L'dir. Galantamin

terapötik konsantrasyonlarda plazma proteinlerine %18 oranında bağlanır. Tam kanda esas olarak kan hücrelerine %52,7 oranında bağlanır. Kan plazma konsantrasyon oranı 1:2 dir (1).

2.1.3. Analiz Yöntemleri

2.1.3.1. Farmasötik Preparatlarda Yapılan Analizler

Patel ve arkadaşları galantamin hidrobromürü farmasötik preparatlardan spektrofotometrik olarak tayin etmişlerdir. Bu yöntemde 282 nm eksitasyon dalga boyu, 607 nm emisyon dalga boyunda 2-14 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır (3).

Maria ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada yaygın kullanıma sahip asetilkolinesteraz inhibitörü olan galantaminin, eksitasyon-emisyon floresans matriksleri ve ikinci derece kalibrasyon yoluyla spektrofotometrik tayini verilmiştir. Bu maddenin floresans şiddetini artırmada çeşitli bileşimlerin etkileri incelenmiştir. Her ne kadar galantaminin farklı siklodekstrinlerle etkileşimleri zayıf olsa da bu etken maddenin siklodekstrinler varlığındaki floresans şiddetinin iki kat arttığı kanıtlanmıştır. Çalışılan misel ortamları arasında, anyonik yüzey aktif madde sodyum dodesil sulfat en yüksek sinyali üretmiş (6 kat artış) ve daha sonraki tayinler için ana belirteç olarak seçilmiştir. Bu yaklaşımla kalibre edilmemiş interferanslar varlığında ayırma adımlarına gerek kalmadan galantaminin ng/mL seviyesinde tayini mümkün kılınmıştır. Uygulanan ikinci derece kemometrik yöntemler parallel factor analysis (PARAFAC), unfolded partial least-squares coupled to residual bilinearization (U-PLS/RBL), and multidimensional partial least-squares coupled to residual bilinearization (N-PLS/RBL) 'dir. Sunulan metodun kalitesi galantaminin hem yapay hem de doğal su örneklerinde tayini ile belirlenmiştir (4).

Mittal ve arkadaşları ultraviyole spektrofotometrik yöntemle 287 nm dalga boyunda, farmasötik preparatlardan galantamin hidrobromürü tayin etmişlerdir. Çalışmada doğruluk $8,1 \times 10^{-5}$ - $2,1 \times 10^{-4}$ M konsantrasyon aralığında belirtilmiştir (5).

Tsvetkova ve arkadaşları farmasötik preparatlardan galantamin hidrobromürü TLC- dansitometrik yöntem ile validasyon yaparak tayin etmişlerdir (6).

Patel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada galantamin hidrobromürün tabletlerde tayini için UV-spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde doğrusallık 20-100 µg/mL konsantrasyon aralığında sağlanmıştır (7).

Mittal ve arkadaşları UV türev spektrofotometrisi yöntemiyle galantamin hidrobromürü farmasötik preparatlarda tayin etmişlerdir. Türev alınmadan önceki λ_{maks} 287 nm, 1. Türevinin λ_{maks} 'ı ise 277,4 nm olarak bildirilmiştir. Yöntemin konsantrasyon aralığı 30-80 µg/mL olarak bildirilmiştir (8).

Wang ve arkadaşları *Lycoris radiata*'dan Lycorine ve galantamini elektrokemilüminesans yöntemi kullanarak kapiler elektroforezle tayin etmişlerdir. Yöntemde konsantrasyon aralığı galantamin için 0,07-17 µg/mL, lycorine için 0,07-18 µg/mL olarak saptanmıştır. Yöntemin gözlenebilme sınırı galantamin için 0,008, lycorine için ise 0,002 µg/mL olarak bildirilmiştir (9).

Zhu ve arkadaşları tarafından geliştirilen kapiler elektroforez yöntemiyle farmasötik preparatlarda galantamin tayin edilmiştir. Doğrusallık galantamin için 0,97-15,6 mg/L, gözlenebilme sınırı ise 0,32 mg/L olarak belirlenmiştir (10).

Berkov ve arkadaşları galantamini tayin etmek için yeni bir GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Doğrusal aralığı 15-800 µg galantamin/örnek içeren örnekler için geri kazanım %95 olarak belirtilmiştir (11).

Deng ve arkadaşları *Bulbus Lycoridis Radiata*dan son kolon elektrokemilüminesans deteksiyonlu kapiler elektroforez yöntemiyle galantamini tayin etmişlerdir. Ayrılma pH 9,0 da 18 mmol/L fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal dedektör kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmada doğrusallık 0,8 ng/mL-2µg/mL ve deteksiyon limiti 0,25 ng/mL olarak bildirilmiştir (12).

Qian yaptığı çalışmada tabletlerde galantamin hidrobromürün tayini için HPLC yöntemi kullanmıştır. Çalışmada galantamin hidrobromürün doğrusallığı 10-100µg/mL bulunmuştur (13).

Patel ve arkadaşları galantamin hidrobromürün farmasötik preparatlarda tayini için RP-HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde C₁₈ kolon, mobil faz sistemi olarak da 1mM amonyum format:asetonitril (30:70) kullanılmıştır. Doğrusallık 100-1000µg/mL olarak saptanmıştır (14).

2.1.3.2. Biyolojik Sıvılarda Yapılan Analizler

Zhai ve arkadaşları geliştirdikleri HPLC yöntemi ile fare plazmasından galantamin hidrobromürü tayin etmişlerdir. Yöntem, Hipersil ODS2 kolonunda asetonitril:%0,1 trietilamin (60:40) mobil fazında 0,8 mL/dk da ve 30°C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon 290 nm eksitasyon dalga boyu, 320 nm emisyon dalga boyunda floresans dedektör ile yapılmıştır (15).

Wu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada köpek plazmasında galantamin HPLC yöntemiyle tayin edilmiştir. Dedeksiyon floresans dedektör ile eksitasyon dalga boyu 290 nm ve emisyon dalga boyu 320 nm de yapılmıştır. Yöntemde C₁₈ kolon ve mobil faz olarak metanol-25 mmol/L sodyum dihidrojen fosfat (84:16) sistemi kullanılmıştır. Doğrusallık 1-300 ng/mL olarak saptanmıştır (16).

Si ve arkadaşlarının bildirdiği bir çalışmada galantaminin plazmada tayini için HPLC yöntemi geliştirmiştir. Deteksiyon floresans dedektör ile 290 nm eksitasyon ve 320 nm emisyon dalga boylarında yapılmıştır. Ayrılma C₈ kolon ve mobil faz olarak asetonitril:su (30:70) %0,2 trietilamin mobil faz sisteminde gerçekleştirilmiştir (17).

Zhi ve Chang galantamin hidrobromürü HPLC ile tayin etmişlerdir. Yöntemde doğrusallık aralığı 30-210 µg/mL olarak bildirilmiştir. Yöntemde C₁₈ kolon ve metanol:asetonitril:su (6:1:3) mobil faz sistemi kullanmışlardır. Dedeksiyon 289 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir (18).

Xiang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada HPLC yöntemiyle fare plazmasında ve *Lycoris radiata* içerisinde lycoramin, lycorine ve galantaminin tayinini yapmışlardır. Kromatografik ayrılma inertsil ODS kolonunda gerçekleştirilmiştir. Yöntemde mobil faz sistemi olarak potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi (pH 6,35):metanol (50:50) kullanılmıştır. Eksitasyon dalga boyu 285 nm, emisyon dalga boyu 320 nm olarak bildirilmiştir (19).

Zhang ve arkadaşları insan plazmasından galantamini floresans dedektör kullanarak HPLC de analiz etmişlerdir. Çalışmada mobil faz olarak asetonitril-su-trietilamin (20:80:1, pH 7,0) kullanılmıştır. Kolon olarak ODS kullanılmıştır. 290 nm eksitasyon, 320 nm emisyon dalga boyunda 2-160 ng/mL konsantrasyon aralığında dedeksiyon sağlanmıştır. Internal standart olarak tramadolün kullanıldığı çalışmada LOQ 1 ng/mL olarak bildirilmiştir (20).

Malakova ve arkadaşları galantamini ve metabolitlerini biyolojik örneklerden HPLC yöntemi ile analiz etmişlerdir. Dedeksiyon floresans dedektörle 280 nm eksitasyon dalga boyunda, 310 nm emisyon dalga boyunda yapılmıştır. Yöntemin konsantrasyon aralığı, galantamin için 0,50-63,47 nmol/g, *O-desmetil*-galantamin için 0,32-41,42 nmol/g, *N-desmetil*-galantamin için 0,54-69,40 ve epigalantamin için 0,7-89,03 nmol/g olarak saptanmıştır. Yöntemin gözlenebilme sınırı ise galantamin için 0,04nmol/g, *O-desmetil*-galantamin için 0,19 nmol/g, *N-desmetil*-galantamin ve epigalantamin için 0,07 nmol/g olarak bildirilmiştir (21).

Tencheva ve arkadaşları insan plazması ve idrarında galantamini tayin etmek için UV dedektör kullanarak yeni bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrılma C₈ kolon ve (40:60) metanol-su içeren mobil faz sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon 280 nm dalga boyunda yapılmıştır. 0,1-10µg/mL aralığında doğrusallık sağlanmış LOD 0,05 µg/ml olarak bildirilmiştir. Çalışmada internal standart olarak kodein kullanılmıştır (20).

Park ve arkadaşları insan plazmasında galantamini glimepid internal standardını kullanarak LC-MS yöntemiyle tayin etmişlerdir. Yöntemde mobil faz olarak etil asetat/0,01 M amonyum asetat (95/5), kolon olarak da C₁₈ kolon kullanılmıştır. Doğrusallık 4-240 ng/mL olarak belirlenmiştir (22).

Liu ve arkadaşları UPLC-MS/MS yöntemiyle galantamin hidrobromürü köpek plazmasında tayin etmişlerdir. Yöntemde C₁₈ kolon, mobil faz olarak asetonitril:0,01 M amonyum asetat (%1 formik asit içeren) (40:60) sistem kullanılmıştır. Doğrusallık 2,38-609,60 µg/mL olarak saptanmıştır (23).

Noetzli ve arkadaşları insan plazmasında alzheimer ilaçlarını LC-MS ve UPLC-MS/MS yöntemiyle tayin etmişlerdir. Yöntemde C₁₈ kolonu kullanmışlardır. Gradient ayırım, pH 9,3 amonyum asetat tamponu ve asetonitril mobil faz sisteminde gerçekleştirmişlerdir. Kalibrasyon aralığı ise 1-300 ng/mL olarak saptanmıştır (24).

Wu ve arkadaşları insan plazmasında galantamin hidrobromürün farmakokinetik ve biyoeşdeğerlik çalışmalarını HPLC-MS cihazını kullanarak yapmışlardır. Yöntemde 20 sağlıklı gönüllü ile çalışılmıştır. Farmakokinetik ve biyoyararlanım parametreleri hesaplanmıştır. Test örneklerinde bağıl biyoyararlanım %106,2 olarak bildirilmiştir (25).

Lei ve arkadaşları LC-MS/MS yöntemi kullanarak galantamini insan plazmasında tayin etmişlerdir. Yöntemde Lichrosper kolonu ve metanol:asetat tamponu (50:50) içeren mobil faz sistemi kullanılmıştır (26).

Zhou ve arkadaşları lycorine ve galantamini fare plazmasından tayini için yeni bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde internal standart olarak difenhidramin kullanılmıştır. Ayrılma C₁₈ kolonda yapılmıştır. LOQ 3 ng/mL olarak bildirilmiştir. Fare plazmasından geri kazanım %82,15 tir (27).

Suresh ve arkadaşları fare plazmasından galantamin tayini için LC-MS/MS yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Internal standart olarak fenasetin kullanılmıştır. Kromatografik ayrılma %0,2 formik asit:asetonitril (50:50) mobil faz sisteminde ve C₁₈ kolonda gerçekleşmiştir. Yöntemde doğrusallık 0,12-525 ng/mL ve LOQ 0,12 ng/mL olarak bildirilmiştir (28).

Noetzli ve arkadaşları donepezil, galantamin, rivastigmin ve bunların majör metabolitlerini plazmadan HPLC-MS yöntemiyle tayin ederek yöntemi valide etmişlerdir. Yöntemde sabit faz olarak ters faz kolon, mobil faz sistemi olarak pH 9,3 asetat tamponu ve asetonitril kullanılmıştır. Deteksiyon kütle spektrometrisi ile yapılmıştır. Yöntemde doğrusallık 2-300 ng/mL olarak hesaplanmıştır (29).

Yine Noetzli ve arkadaşları terapötik ilaç izleme için insan plazmasından antidepresan ilaçlarını tayin etmek için LC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemi donepezil, galantamin, rivastigmin ve onların majör metabolitlerinin tayininde kullanmışlardır. Doğrusallık 2-300 ng/mL olarak saptanmıştır (30).

Nirogi ve arkadaşları insan plazmasından galantamini tayin etmek için LC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde internal standart olarak loratadin kullanılmıştır. galantaminin insan plazmasında lineer dinamik aralığı 0,5-100 ng/mL, LOQ ise 0,5 ng/mL olarak bildirilmiştir. Yöntem farmakokinetik, biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik çalışmaları için kullanılmıştır (31).

Thevis ve arkadaşları insan idrarından doping kontrolü için terapötiklerin (donepezil, galantamin, rivastigmin) analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu analizi LC/MS/MS yöntemini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Doğrusallık idrarda 15-20 ng/mL olarak bildirilmiştir (32).

Verhaeghe ve arkadaşları insan plazmasından galantamini LC-MS-MS yöntemiyle analiz ederek yöntemi valide etmişlerdir. Doğrusallık 1-500 ng/mL olarak verilmiştir. Ayrılma C₁₈ kolonda asetonitril-0,01M (15:85) amonyum asetat mobil faz sisteminde gerçekleştirilmiştir (33).

Nirogi ve arkadaşları insan plazmasından galantamin analizi için bir LC-ESI-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde internal standart olarak loratadin, kolon olarak C₁₈ kolon ve mobil faz olarak ise %0,03 formik asit:asetonitril (20:80) kullanılmıştır. Yöntemin doğrusal aralığı 0,5-100 ng/mL olarak hesaplanmıştır (20).

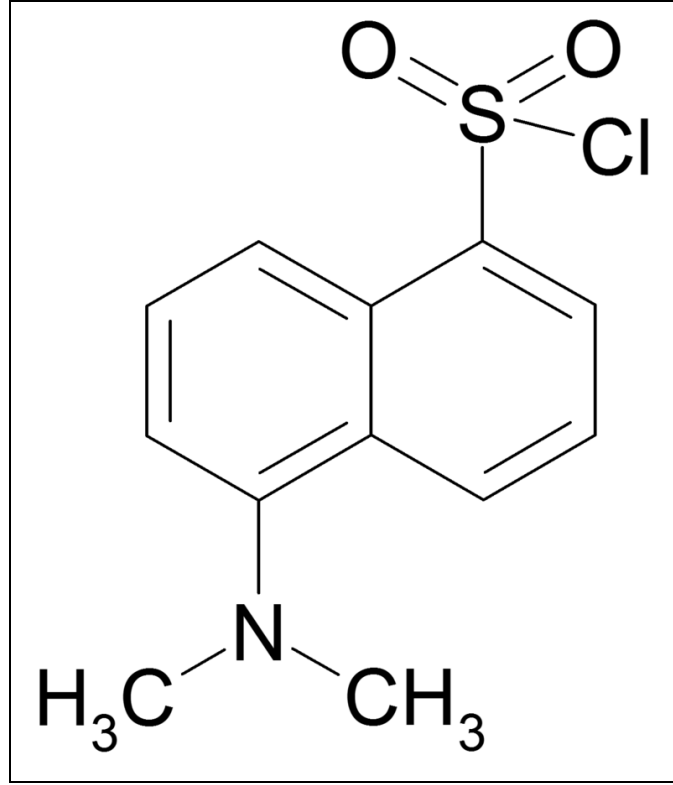
Steiner ve arkadaşları hayvan plazmasından galantamin N-oksit, N-desmetil galantamin, O-desmetil galantamin ve galantamini tayin etmek için LC-ESI-MS/MS bir metod geliştirmişlerdir. Internal standart olarak difenhidramin ve kodein fosfatın kullanıldığı bu yöntemde mobil faz olarak A fazında formik asit:glasiyal asetik asit:su (0,05:0,2:99,75%), B fazında formik asit:su :metanol (0,1:9,9:90%) kullanılmıştır. Dedeksiyon 280 nm eksitasyon, 310 nm emisyon dalga boyunda yapılmıştır. Doğrusallık 0,05-12,5 µg/mL olarak bildirilmiştir (20).

Cuartero ve arkadaşları asetilkolinesteraz inhibitörü olan galantamini insan idrarında ve farmasötik preparatlardan analizi için kinetik-potansiyometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmada asetilkolin-seçici elektrod kullanılmıştır. Galantaminin doğrusal aralığı 2×10^{-8} - 1×10^{-6} M, deteksiyon limiti ise $5,4 \times 10^{-9}$ M olarak bildirilmiştir (34).

2.2.2.Dansil Klorür

2.2.2.1. Genel Bilgi

Kimyasal adı 5-dimetilamino-naftalen-1-sülfonil klorür olan dansil klorürün kapalı formülü C₁₂H₁₂ClNO₂S dır. Molekül ağırlığı, 269,75 g/mol dür. Dansil klorür aseton ve suda kolay çözünen, sarı-oranj renkte kristalize bir tozdur. Dansil Klorürün kaynama noktası 70°C'dir. Dansil klorür primer ve sekonder aminlerle, fenolik hidroksil gruplarıyla kuvvetli fluoresans gösteren türevler oluşturur (35).



Şekil 2-4 Dansil klorürün kimyasal formülü

2.2.2.2. Analiz Yöntemleri

Aydoğmuş ve arkadaşları; tabletlerden ve insan plazmasından aliskireni dansil klorür ile türevlendirerek spektrofotometrik olarak tayin etmişlerdir. Türevin eksitasyon dalga boyu 378 nm, emisyon dalga boyu ise 501 nm olarak belirlenmiştir (36).

Karasakal ve Ulu nizatidini farmasötik preparatlardan spektrofotometrik olarak tayin etmek için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde nizatidin dansil klorür ile türevlendirildikten sonra farmasötik preparatlarda tayin edilmiştir. Dansil türevi 513 nm emisyon ve 367 nm eksitasyon dalga boylarında ölçülmüştür. Doğrusallık 25-300 ng/mL olarak belirlenmiştir (37).

Karasakal ve Ulu amoksapini insan plazması ve idrarda dansil klorür ile türevlendirip spektrofotometrik olarak tayin etmişlerdir. Doğrusallık plazma için 250-2500ng/mL ve idrar için 50-1250 ng/mL olarak bildirilmiştir. Türevin floresans şiddeti 397 nm (eksitasyon) ve 514 nm (emisyon) dalga boylarında ölçülmüştür (38).

Abd El-Ghaffar ve arkadaşları farmasötik preparatlarda fenoterol ve ritodrin tayini için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde dansil klorür ile

türevlendirme yapılmıştır. Türevin emisyon dalga boyu 517 nm,eksitasyon dalga boyu ise 515 nm olarak belirlenmiştir. Doğrusallık 0,25-6,0 µg/mL olarak bildirilmiştir (39).

Aksamija ve arkadaşları doğal reçinelerdeki triterpenoidlerin analizi için HPLC yöntemi kullanmışlardır. Dansil türevleri 347 nm eksitasyon dalga boyu ve 530 nm emisyon dalga boyunda fluoresans dedektör ile analiz edilmiştir (40).

Higashi ve arkadaşları yan yana dört butirofenon tayin etmek için yeni bir HPLC yöntemi önermişlerdir. Kolon öncesi dansil klorür ile türevlendirilme yapılmıştır. Tayinde C₁₈ kolon ve metanol-su-asetik asit (650:350:4) içeren mobil faz sistemi kullanılmıştır (41).

Wang ve arkadaşlarının geliştirdikleri HPLC yönteminde insan idrarında sistin dansil klorür ile türevlendirilerek tayin edilmiştir. Yöntemde C₁₈ kolon ve mobil faz olarak 0,05M sodyum asetat-metanol (35:65) sistemi kullanılmıştır. Gözlenebilme sınırı 0,3 mg/L, doğrusallık ise 1-500 mg/L dir(42).

Romero ve arkadaşları biyojenik aminleri dansil klorür ile türevlendirip türevlerin analizini gerçekleştirmek için HPLC yöntemini kullanmışlardır. Dedeksiyon 340 nm eksitasyon ve 520 nm emisyon dalga boylarında fluoresans dedektör ile yapılmıştır (43).

Higashi ve arkadaşlarının antidepresanları tayin etmek için kolon öncesinde dansil klorürle türevlendirerek HPLC yöntemi kullanmışlardır. Dedeksiyon fluoresans dedektör ile 370 nm eksitasyon dalga boyu ve 506 emisyon dalga boylarında yapılmıştır (44).

Dugo ve arkadaşları kırmızı şarapta biyojenik aminlerin analizi için dansil klorür ile kolon öncesi türevlendirme yapmışlardır. Geliştirilen HPLC yönteminde 254 nm de DAD dedektör kullanılmıştır. Konsantrasyon aralığı 0,10-0,80 µg/mL olarak verilmiştir (45).

Lamshoeft ve arkadaşları insan idrarında morfini dansil klorür ile türevlendirerek LC/MS yöntemi ile analiz etmişlerdir. Gözlenebilme sınırı 35 fmol/mL ve tayin sınırı 87,5 fmol/mL olarak belirlenmiştir (46).

Gong ve arkadaşları insan serumunda icariini dansil klorür ile türevlendirip LC-MS/MS yöntemiyle tayin etmişlerdir. Doğrusallık 10pg/ml-4ng/mL dir (47).

Beach ve arkadaşları domoik asidin dansil klorürle türevlendirme işlemini gerçekleştirmiş ve türevleri LC-MS/MS yöntemi ile tayin etmişlerdir. Geri kazanım aralığı (%83-107) ve $RSD \leq 5\%$ olarak verilmiştir (48).

Yao ve arkadaşları idrarda benzo(a)piren ve 3-hidroksibenzo(a)pireni dansil klorür ile türevlendirip, LC-MS/MS yöntemiyle tayin etmişlerdir. Doğrusallık 0,25-40,0 pg/mL olarak bildirilmiştir (49).

Nirogi ve arkadaşları katekolaminleri tayin etmek için kolon öncesinde dansil klorür ile türevlendirme yapmışlardır. Tayin LC-MS/MS ile yapılmıştır. Kolon olarak C_{18} kolon kullanmışlardır. Tayin sınırları 0,068-0,059 pmol/mL olarak bildirilmiştir (50).

Dillen ve arkadaşları bakteri ve memeli hücre sistemlerinde azid ve azidoalanin dansil klorürle türevlendirip LC-MS/MS yöntemiyle tayin etmişlerdir. Yöntemin tayin sınırı 10,0 ng/mL olarak bildirilmiştir (51).

Salomonsson ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada midyede β -N-metilamin-L-alanin dansil klorür ile türevlendirilmiştir. Dansil türevi UPLC-ESI-MS/MS ile analiz edilmiştir (52).

Wang ve arkadaşları süt ve süt tozundaki endokrin bozucu kimyasalları (progestojen, androjen, östrojenler ve fenoller) dansil klorür ile türevlendirdikten sonra oluşan türevleri UPLC/QTOF-MS yöntemiyle tayin etmişlerdir (53).

Lin ve arkadaşlarının geliştirdikleri LC-ESI/MS/MS yönteminde insan plazmasında piperazin tayin edilmiştir. Yöntemde dansil klorür ile kolon öncesi türevlendirme yapılarak, C_{18} kolonu ve 10mM amonyum asetat tamponu (pH 3,0)-metanol (50:50) içeren mobil faz sistemi kullanılmıştır. Doğrusallık 0,1-15 μ g/mL olarak saptanmıştır (54).

Beaudry ve arkadaşları vanillin tayini için LC-ESI/MS/MS yöntemi önermişlerdir. Türevlendirme dansil klorür ile yapılmıştır. Tayin C_{18} kolonda ve asetonitril:formik asit (%0,5) (75:25) içeren mobil faz çözeltisi ile yapılmıştır (55).

Beaudry ve arkadaşları propofolü dansil klorürle türevlendirmiş ve bu analiz için LC-ESI/MS/MS yöntemini kullanmışlardır. Analiz C_{18} kolonda ve asetonitril- 0,5% formik asit (80:20) içeren mobil faz sistemiyle yapılmıştır. Doğrusallık 20-20,000 ng/mL olarak verilmiştir (56).

Yine Beaudry ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada fare plazmasında eugenol tayini için LC-ESI-QIT yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrılma C_8 kolonda ve

asetonitril-%0,1 formik asit (75:25) mobil faz sisteminde gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğrusalılığı 100-20000 ng/mL olarak verilmiştir (57).

Maraschiello ve arkadaşları köpek plazmasında antitümör ajanları dansil klorür ile türevlendirmişlerdir. Türevler HPLC yöntemi ile C₁₈ kolonda ve asetonitril:su (95:5) içeren mobil faz sistemiyle analiz edilmiştir (58).

Kwakman ve arkadaşları serumda östrodiol tayini için dansil klorür ile türevlendirme yaparak HPLC yöntemi kullanmışlardır. Yöntemde LOD, 5×10^{-10} M olarak bildirilmiştir (59).

Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bazı nitrozaminler dansil klorürle türevlendirilip oluşan türevler HPLC ile tayin edilmiştir. Ayrılma C18 kolon ve asetonitril:su (73:27) içeren mobil faz sistemi ile yapılmıştır. Dedeksiyon 530 nm emisyon ve 350 nm eksitasyon dalga boylarında fluoresans dedektör ile yapılmıştır (60).

Nirogi ve arkadaşları dopamin ve norepinefrin tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde dansil klorür türevleri LC-MS ile analiz edilmiştir. Ayrılma C₁₈ kolon ile yapılmıştır. Doğrusallık dopamin için 0,068–13,614 pmol/mL ve norepinefrin için 0,059–11,893 pmol/mL dir (61).

Wang ve arkadaşlarının insan idrarında amfetamin analizi için geliştirdikleri HPLC yönteminde dansil klorür ile türevlendirme yapılmıştır. Yöntemde ayırma ODS kolonda asetonitril/su (70:30) mobil faz sisteminde gerçekleştirilmiştir (62).

Clausing ve arkadaşları plazma, beyin dokusu ve beyinde D-fenfluramin, D-norfenfluramin and fluoksetin tayininde türevlendirme ajanı olarak dansil klorür kullanmışlardır. Ayrılma HPLC cihazında C₁₈ kolonda yapılmıştır. Dedeksiyon fluoresans dedektör ile 375 nm eksitasyon dalga boyunda 470 nm emisyon dalga boyunda fluoresans dedektör ile yapılmıştır (63).

Saaida ve arkadaşları yiyeceklerdeki biyojen aminlerin tayininde dansil klorür ile türevlendirme yapmışlardır. Türevler HPLC ile analiz edilmiştir. Doğrusallık 0,1-5 µg/mL olarak verilmiştir (64).

Lin Cai ve arkadaşları insan idrarında monoamidlerin ve amino asitlerin tayini için UPLC–MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir (65).

Kang ve arkadaşları biyolojik numunelerden nöroaktif proteinlerin tayini için geliştirdikleri dansil klorür ile türevlendirme yönteminde ayırmayı C18 kolonda HPLC ile gerçekleştirmişlerdir (66).

Maraschiello ve arkadaşları köpek plazmasında antitumor ajanların tayini için dansil klorür kullanmışlardır. Ayırmayı HPLC de C₁₈ kolonda gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz olarak asetonitril-su (95:5) kullanılmıştır. Yöntemin maksimum absorbansı 254 nm dalga boyu olarak belirlenmiştir (67).

Lamshöft ve arkadaşları idrardan morfin tayini için dansil klorürle türevlendirdikten sonra LC-MS/MS ile analiz etmişlerdir. Analizde LOQ 87,5 fmol/ml (25 pg/ml) ve LOD 35 fmol/ml (10 pg/ml) olarak tespit edilmiştir (68).

Cohen ve arkadaşları robenidinin türevlendirme ile analizi için dansil klorürü kullanmışlardır. Dedeksiyon eksitasyon dalga boyu 320 nm ve emisyon dalga boyu 485 nm de floresans dedektör ile yapılmıştır. LOD 0,4 µg/mL olarak verilmiştir (69).

Omar ve arkadaşları insan plazmasından antidepresan ilaçların tayini için geliştirdikleri spektrofluorimetrik yöntemde eksitasyon dalga boyu 347 nm ve emisyon dalga boyu 450 nm saptanmıştır. Doğrusallık 0,02-0,14 µg/mL dir (70).

Ding ve arkadaşları 2-hidroksipiridin N-oksit tayini için dansil klorür ile türevlendirme yöntemini kullanmışlardır. Ayrılma LC-MS/MS ile C₁₈ kolonda yapılmıştır. Doğrusallık 0,1-25 ng/mL olarak bildirilmiştir (71).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Galantamin hidrobromür (Sigma Aldrich, Missouri, USA)

Reminyl® 8 mg kapsül (Janssen İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul)

5-dimetilamino-naftalen-1-sülfonil klorür (Dansil klorür) (Sigma Aldrich, Missouri, USA)

Sodyum bikarbonat (Merck, Darmstadt, Almanya)

Sodyum hidroksit (Merck, Darmstadt, Almanya)

Eter (Sigma Aldrich, Missouri, USA)

Diklorometan (Sigma Aldrich, Missouri, USA)

Kloroform (Sigma Aldrich, Missouri, USA)

Hidroklorik asit (%37) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Aseton (Sigma Aldrich, Missouri, USA)

Metanol (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Asetonitril (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)

o-Fosforik asit (Merck, Darmstadt, Almanya)

Borik asit (Merck, Darmstadt, Almanya)

Potasyum dihidrojen fosfat (Riedel De Hæn, Almanya)

* Tüm çalışmalar İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

Potasyum klorür (Merck, Darmstadt, Almanya)

Etil asetat (Merck, Darmstadt, Almanya)

n-Heptan (Merck, Darmstadt, Almanya)

İsopropil alkol (Merck, Darmstadt, Almanya)

3.1.2. Çözeltiler

3.1.2.1. Galantamin ve Dansil Klorür Çözeltileri

Stok çözelti: 10 mg galantamine eşdeğer galantamin hidrobromür 10 mL'lik balonjojede metanol ile hacmine tamamlandı. Optimum koşullarının belirlenmesinde stok çözeltinin su ile seyreltilmesiyle hazırlanan 100 µg/mL konsantrasyonunda galantamin çözeltisi kullanıldı. HPLC çalışmalarında 10 µg/mL konsantrasyonunda galantamin çözeltisi kullanıldı. Reaksiyon koşullarının belirlenmesinde Dansil klorürün 200 µg/mL konsantrasyonda asetonda hazırlanmış çözeltisi kullanıldı.

3.1.2.2. Tampon Çözeltiler

a. Borat Tamponu Çözeltileri

pH'sı 10,0 olan tampon çözeltisini 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 saf suyla 200 mL'ye tamamlandı.

b. Fosfat Tamponu Çözeltileri

pH sı 7,0 olan tampon çözeltisini 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. pH sı 2,7 fosfat tampon çözeltisi için, 100 mL 200 mM potasyum dihidrojen fosfat çözeltisine gerekli miktarda o-fosforik asit eklenerek pH sı ayarlandıktan sonra saf su ile 200 mL ye tamamlandı.

b. Karbonat Tamponu Çözeltileri

50 mL 0,1 M sodyum bikarbonat çözeltisine gerekli miktarlarda 0,1 M NaOH ilave edilerek pH sı 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 ve 11,0 olan çözeltiler hazırlandı. pH sı ayarlanan çözeltilerin hacmi 200 mL' ye saf su ile tamamlandı.

3.1.2.3. Mobil Faz Çözeltisi

Mobil faz çözeltisi ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra süzölmüş, 40:60 (v/v) asetonitril:10mM H₃PO₄ (pH 2,7) olacak şekilde hazırlandı.

3.2. Aletler ve Gereçler

1. HPLC aleti (RF- 10 AXL)

LC-20AT Pompa Ünitesi

DGU-20A5 Degaze Ünitesi

CTO-10ASVP Kolon Fırını

SIL-20AHT Otomatik Numune

CBM-20 Alite Sistem Kontrol Ünitesi

C₁₈ Analitik kolon (Inertsil,150 mmx4.6mm I.D., 5µm parçacık büyüklüğü)

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

2. Spektrofluorimetre (Shimadzu RF-1501)

3. Spektrofotometre (Shimadzu UV-160A)

4. 1 cm lik kuartz küvetler (QS 1000) (10x10x45 mm)

5. 1 cm lik cam küvetler (OS 1000) (10x10x45 mm)

6. Terazi (Denver Instrument)

7. Girdap karıştırıcı (Elektro-mag)

8. Santrifüj (Janetzki T.32B)

9. Ultrasonik banyo (Branson 221)

10. Ultra saf su cihazı (Younglin Instrument)

11. Mobil faz süzme filtresi (Milipor, HVLP 47 mm)

12. Örnek süzme filtresi (Anotec, 0.20 µm)

13. Reaksiyon tüpleri (Vidalı, kapaklı, 12 mL lik)

14. Otomatik pipetler (Microlit, 10-100 µL, 100-1000 µL)

3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesiyle İlgili Çalışmalar

3.3.1. Galantaminin Dansil klorür İle Reaksiyonun Koşullarının İncelenmesi

Yapılan literatür araştırmasından edinilen bilgiler sonucunda, Dansil klorür ile primer, sekonder amin ve hidroksil grubu içeren maddeler arasındaki reaksiyonun alkali pH'larda, sıcakta ya da oda sıcaklığında yürüdüğü belirlenmiştir. Oluşturulan türevin organik bir çözücüyle ekstre edildikten sonra floresans ölçümünün yapıldığı görülmüştür. Bu bilgiler doğrultusunda, galantamin ile dansil klorür arasındaki reaksiyonun hangi koşullarda en etkin gerçekleştiğini araştırmak amacıyla aşağıdaki denemeler planlanmıştır.

3.3.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü

100 µg/mL konsantrasyondaki galantamine eşdeğer galantamin hidrobromür tuzu içeren çözeltilerden 100 µL alınarak reaksiyon tüpüne kondu. 100 µL pH 10,5 sodyumbikarbonat tamponu ve 100 µL 200 µg/mL konsantrasyondaki dansilklorür çözeltisi eklenerek, girdap karıştırıcıda karıştırıldı. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu aşamadan sonra eter, kloroform, diklorometan ve karbontetraklorür ile 3 kez 2 mL ile ekstraksiyon gerçekleştirildikten sonra hacimler ilgili çözücülerle 10 mL'ye tamamlandı.

Çözeltilerin floresansları, aynı koşullarda hazırlanmış boş denemelere karşı spektrofluorimetreye ölçüldü. Sonuçlar Bölüm 4.1.1.1'de özetlenmiştir.

3.3.1.2. pH

Değişik pH'larda tampon çözeltisinin reaksiyon verimine etkisi araştırılmak üzere, 100 µg/mL galantamine eşdeğer galantamin hidrobromür tuzu çözeltisinden 100'er µL alındı, üzerine çeşitli pH'larda tampon (9,0-11,0) çözeltilerinden 100 µL ve 200 µg/mL konsantrasyondaki dansil klorür çözeltisinden 100 µL eklenerek girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Aynı şartlarda her bir pH denemesi için bir boş deneme hazırlandı ve tüm örnekler oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu.

3x2 mL diklorometan ile ekstraksiyon yapılarak, hacimler 10 mL'ye tamamlandı ve boşa karşı floresans şiddetleri ölçüldü. Sonuçlar Bölüm 4.1.1.2'de özetlenmiştir.

3.3.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

Sıcaklık ve reaksiyon süresinin reaksiyon verimine etkisi araştırılmak üzere, 100 µg/mL galantamine eşdeğer galantamin hidrobromür tuzu çözeltisinden 100 µL, pH 10,5 sodyum bikarbonat tamponundan 100 µL ve 200 µg/mL konsantrasyondaki dansil klorür çözeltisinden 100 µL alınarak, girdap karıştırıcıda karıştırıldı.

Her bir deneme için bir adet de boş hazırlanarak, oda sıcaklığında, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C ve 70 °C sıcaklıklarda, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakika bekletildi.

Tüpler sıcak su banyosundan çıkartılır çıkartılmaz, soğuk suyla soğutuldu. 3x2 mL diklorometan ile ekstre edilerek, hacimler 10 mL'ye tamamlandı ve boşa karşı fluoresans şiddetleri ölçüldü. Sonuçlar Bölüm 4.1.1.3'te özetlenmiştir.

3.3.1.4. Belirteç Miktarı

100 µg/mL galantamine eşdeğer galantamin hidrobromür tuzu çözeltisinden 100 µL, pH 10,5 sodyum bikarbonat tamponundan 100 µL eklendikten sonra 25-250 µL arasında değişen miktarlarda 200 µg/mL konsantrasyondaki dansil klorür çözeltisi ve toplam hacmi 450 µL'ye tamamlayacak miktarda aseton eklenerek, girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.

Çalışmanın geri kalan adımları bölüm 3.3.1.3'te anlatıldığı şekilde tamamlandı. Sonuçlar Bölüm 4.1.1.4'te özetlenmiştir.

3.3.2. Galantaminin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisiyle (HPLC) Analizi

3.3.2.1. Galantamin-Dansil Türevinin Hazırlanması

Spektrofluorimetride optimize edilen koşullar kullanılarak yapılan türevlendirme ve ekstraksiyon işlemleri sonrasında, türev azot akışı altında kurutularak, mobil fazda çözülerek enjeksiyona hazırlandı. Sonuçlar Bölüm 4.1.2.1'de verilmiştir.

3.3.2.2. Detektör Dalga Boyu ve Kolon Seçimi

Galantamin-Dansil türevinin gösterdiği maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları spektrofluorimetride çalışmalarında elde edilen değerleri başlangıç noktası olarak, türeve ait pikin detektörde saptandığı anda akışın durdurulmasıyla denenen dalga boyları değerlendirilerek tespit edildi.

Sonuçlar Bölüm 4.1.2.2'de verilmiştir.

3.3.2.3. Mobil Faz Seçimi

Mobil faz seçiminde ters faz sistemi kullanıldığı için polar çözücü sistemleri denendi. Asetonitril:su, metanol su, metanol-o-fosforik asit, asetonitril:o-fosforik asit 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 (v/v) içeren değişik kompozisyonlarda mobil faz sistemi kullanıldı. Galantamin-dansil türevinin pikleri en iyi asetonitril:o fosforik asit (pH 2,7) 40:60 (v/v) mobil faz sisteminde ayrıldı.

Sonuçlar 4.1.2.3'de verilmiştir.

3.3.2.4. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrisi Hazırlanması

Galantamine eşdeğer galantamin hidrobromür tuzu içeren 10 µg/mL çözeltiden 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında olacak miktarlarda 0,5 mL su içeren kapaklı cam tüplere alındı. Bu çözeltilere 100 µL pH 10,5 sodyumbikarbonat tamponu ve 100 µL 200 µg/mL konsantrasyondaki dansil klorür çözeltisi eklenerek, girdap karıştırıcıda karıştırıldı. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 2x2,5 mL diklorometan ile ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyondan sonra 2 dakika santrifüjlendi. Birleştirilen organik fazlarının 4,5 mL si azot akımında uçuruldu. Kalıntı 200 µL asetonitril:10 mM ortofosforik asit (pH 2,7) 40:60 (v/v) mobil faz sisteminde çözündürüldü. 20 µL enjeksiyon yapılarak 1,2 mL/dak. akış hızında sisteme verildi. Her bir konsantrasyon için dört kez çalışılarak alanlar hesaplandı. Galantamin-dansil pik alanları değerlerine karşılık konsantrasyon arasında ölçü eğrisi hazırlandı. Sonuçlar Bölüm 4.1.2.5'de verilmiştir.

3.3.2.5. İdrarda Ölçü Eğrisi Hazırlanması

1 mL idrar örneği 100 mL distile su ile seyretildi. Seyreltilmiş bu idrar örneğinin 0,5 mL sine 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında olacak miktarlarda galantamine eşdeğer galantamin hidrobromür tuzu içeren 10 µg/mL çözeltiden ilave edildi. Çalışmanın geri kalan adımları bölüm 3.3.2.4'te anlatıldığı şekilde tamamlandı. Sonuçlar Bölüm 4.1.2.6'da özetlenmiştir.

3.3.2.6. Plazma Proteinlerinin Çöktürülmesi ve Ekstraksiyon İşlemleri

Reaksiyon tüplerine 10 µg/mL konsantrasyonundaki galantamine eşdeğer galantamin hidrobromür tuzu çözeltisinden 100 µL ve 0,5 mL plazma eklendikten sonra, girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Çalışmalar iki şekilde sürdürüldü:

- a) Protein çöktürmek için 2 mL metanol ilave edilerek girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 30 dakika 4500 rpm'de santrifüj edildi. Berrak kısımdan alınarak, azot altında uçuruldu, Bölüm 3.3.2.4'de tarif edilen işlemlerden sonra HPLC için türevler hazırlandı.
- b) Her birinden ikişer adet olmak üzere, 0,5 mL pH 7,0, pH 10,0 borat tamponları ve 0,1N NaOH protein çöktürücüsü olarak eklendikten sonra girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Setlerden birine ekstraksiyon çözücüsü olarak 5 mL etil asetat, diğerine 5 mL ve n-heptan:isopropil alkol (99:1) karışımı eklendi. Girdap karıştırıcıda 2 dakika ekstraksiyon yapıldıktan sonra 30 dakika 4500 rpm'de santrifüj edildi. Üst fazdaki berrak kısım alınarak, azot altında uçuruldu, Bölüm 3.3.2.4'de tarif edilen işlemlerden sonra HPLC örnekleri hazırlandı. Sonuçlar Bölüm 4.1.2.4'de verilmiştir.

3.3.2.7. Plazmada Ölçü Eğrisi Hazırlanması

12 mL lik dibi sivri ve kapaklı reaksiyon tüplerinde bulunan 0,5 mL plazma örnekleri üzerine konsantrasyonu 125-2000 ng/mL galantamine eşdeğer galantamin hidrobromür içeren çözeltiden katıldı ve 0,5 mL 0,1 N NaOH çözeltileri ilave edildi ve 20 saniye karıştırıldı. 5 mL etilasetat ile 2 dakika girdap karıştırıcıda karıştırılarak ekstre edildi. 30 dakika 4500 rpm'de santrifüjlendikten sonra organik faz ayrıldı. Bu işlemle NaOH ilavesiyle çöken plazma proteinlerinin ayrılması da sağlanmış oldu. Çökelti üzerindeki berrak organik tabakanın 4,5 mL si azot akımında uçurularak kalıntı Bölüm 3.3.2.4 de anlatıldığı gibi türevlendirilerek çalışıldı. Kalıntı 200 µL asetonitril:10 mM ortofosforik asit (pH 2,7) 40:60 (v/v) mobil faz sisteminde çözündürüldü, süzüldü çözeltilinin 20 µL si 1,2 mL/dak akış hızında C₁₈ kolona uygulandı. Sonuçlar Bölüm 4.1.2.7'de verilmektedir.

3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

İlaç uygulamaları için Uluslararası Harmonizasyon Konferansında (ICH, *International Conference Harmonization*) belirlenen parametreler incelendi (72).

3.4.1. Doğrusallık

Galantamin içeren idrar ve plazma örneklerinin belli konsantrasyon aralığındaki doğrusallığını belirlemek için 5 farklı konsantrasyonda 4 adet çözelti hazırlandı. Bu çözeltilerle Bölüm 3.3.1.4’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Doğrusallık sonuçlarının pik alanları ortalaması, standart sapma, % RSD hesaplanarak grafiksel değerlendirilmesi yapıldı. Sonuçlar Bölüm 4.2.1’de verilmiştir.

3.4.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri denklem (3-2) ile hesaplandı. Hesaplanan değerler Bölüm 4.2.2 de verilmiştir.

$$\text{LOD} = 3,3 \times \text{SD}/m \quad (3-2)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}/m$$

SD: Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

3.4.3. Kesinlik ve Doğruluk

3.4.3.1. Gün içi Tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda (125, 500 ve 2000 ng/mL) galantamin içeren idrar ve plazma örnekleri Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Gün içinde herbirinin üçer pik alanları ölçüldü. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.2.3.1 de verilmiştir.

3.4.3.2. Günler arası Tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda (125, 500 ve 2000 ng/mL) galantamin içeren idrar ve plazma örnekleri Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Analizler birbirini takip eden 3 günde ve her defasında yeni çözeltilerle çalışılmak koşuluyla tekrarlandı. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.2.3.2’de verilmiştir.

3.4.4. Robustness (Yöntemin Sağlamlığı)

Yöntemin mobil faz bileşiminde ($\pm\% 2$), akış hızında ($\pm 0,1$ mL), reaksiyon pH’sında ($\pm 0,1$), eksitasyon ve emisyon dalga boyları (± 1 nm) ve kolon sıcaklığı ($\pm 2^\circ\text{C}$) parametrelerinde ufak değişiklikler yapılarak yöntemin sağlamlığı araştırıldı.

Bulunan sonuçlar Bölüm 4.2.4’te verilmiştir.

3.4.5. Uygunluk Testi

Bir kromatogramın yorumlanabilmesi için bazı sistem uygunluk testlerinin (SUT) yapılması gerekir. SUT, kromatografik yöntemlerin bir parçasıdır ve yöntemin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte olduğunu belirtir. Gerekli işlem ve hesaplamalar yöntem geliştirilmesi ve validasyon işlemlerinin tamamlanmasından sonra veya işlemler sırasında yapılır (73).

Uygunluk testi için önemli parametreler retensiyon zamanı (t_R), kapasite faktörü (k'), kuyruklanma faktörü (T) ve teorik plato eşdeğer yüksekliği (N) değerlendirildi. Sonuçlar kabul edilen değerlerle karşılaştırılarak bölüm 4.2.5'te verilmiştir.

3.4.6. Galantamin-Dansil Türevinin Stabilitesi

500 ng/mL konsantrasyonda hazırlanmış numuneler oda sıcaklığında karanlıkta ve aydınlıkta ve 4 °C karanlıkta tutularak, başlangıç değerleri, 6, 24 ve 72 saat sonraki değerleri ölçüldü. Alınan sonuçlar Bölüm 4.2.6'da verilmiştir.

3.4.7. İdrar ve Plazmadan Geri Kazanım

Galantamin-dansil türevinin idrar ve plazmadan geri kazanım oranının saptanması için, idrardan ve plazmadan elde edilen ölçü eğrisinin eğimi sulu çözeltilerden elde edilen ölçü eğrisi denkleminin eğimine oranlanarak hesaplama yapıldı. Sonuçlar Bölüm 4.2.7'de verilmektedir.

3.5. Kapsüllerde Galantamin Miktar Tayini

3.5.1. Geliştirilen HPLC Yöntemiyle Miktar Tayini

10 adet kapsül içindeki kapsül tozu tartılıp, ortalama ağırlığı saptandı ve kapsül tozu porselen havanda ince toz haline getirildi. 50 mg galantamine eşdeğer miktarda kapsül tozu hassas olarak tartılıp 50 mL lik balonjojeye aktarıldı, 25 mL metanol ile 30 dakika mekanik karıştırıcıda çalkalandı. Metanol ile hacmine tamamlandıktan sonra mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 5 mL'si atıldı. Geri kalan kısımdan 10 mL alınıp 100 mL'lik balonjojede metanol ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltilerden 1 mL alınıp, su ile 10 mL'ye tamamlandı, 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığına ait ölçü eğrisinin çalışma koşullarında Bölüm 3.3.2.4'de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Analiz işlemi 6 kez tekrarlandı. Galantamin miktarı daha önce bu konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisinin denklemi ($A=174,92C-7876$) yardımıyla hesaplandı.

3.5.2. Kıyas Yöntemi İle Miktar Tayini

Kapsüllerde galantamin miktar tayini için kıyas yöntemi olarak USP XXXII de bulunan HPLC yöntemi esas alındı (74).

Tampon çözelti: 5,34 gr disodyum fosfat dihidrat 1 L su içerisinde çözeltisi hazırlandı. Fosforik asitle pH'sı 6,5 a getirilerek karıştırıldı.

Çözelti A: 950 mL tampon çözeltisi ve 50 mL metanol karışımı hazırlandı.

Çözelti B: Asetonitril:metanol (95:5) karışımı hazırlandı.

Mobil Faz: Çözelti A ve Çözelti B nin değişik karışımları kromatografik sisteme direkt olarak verildi.

Çözücü: 35,4 g EDTA disodyum 950 mL suda çözülür üzerine 50 mL metanol eklenerek karıştırıldı.

Standart çözelti hazırlanması: 0,48 mg/mL galantamin hazırlanan çözücüdeki çözeltisi hazırlandı.

Analiz çözeltisi: 10 tablet tartıldı. Galantamin konsantrasyonu 0,48 mg/mL olacak şekilde hesaplama yapılarak çözücüsünde çözündürüldü. 0,45-µm lik politetrafloroetilen filtreden süzüldü.

Örnek çözelti: Bölüm 3.5.1.' de anlatıldığı gibi ince toz haline getirilen kapsül tozundan galantamin konsantrasyonu 0,48 mg/mL olacak şekilde hesaplama yapılarak çözücüsünde çözüldü. 0,45µm lik politetrafloroetilen filtreden süzüldü.

Kromatografik sistem:

Dedektör: : UV-Absorbans dedektör 230 nm

Akış hızı: 1,5 mL/dak

Kolon: C₁₈ Analitik Kolon (4,6mmx10 cm; 3,5 µm)

Kolon sıcaklığı: 35°C

Enjeksiyon hacmi: 20µL

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

C_s = Standart çözeltisinin konsantrasyonu (0,48 mg/mL)

C_u = Örnek çözeltisinin konsantrasyonu (0,48 mg/mL)

r_s = Standart çözeltilisinin pik alanı

r_u = Örnek çözeltilisinin pik alanı

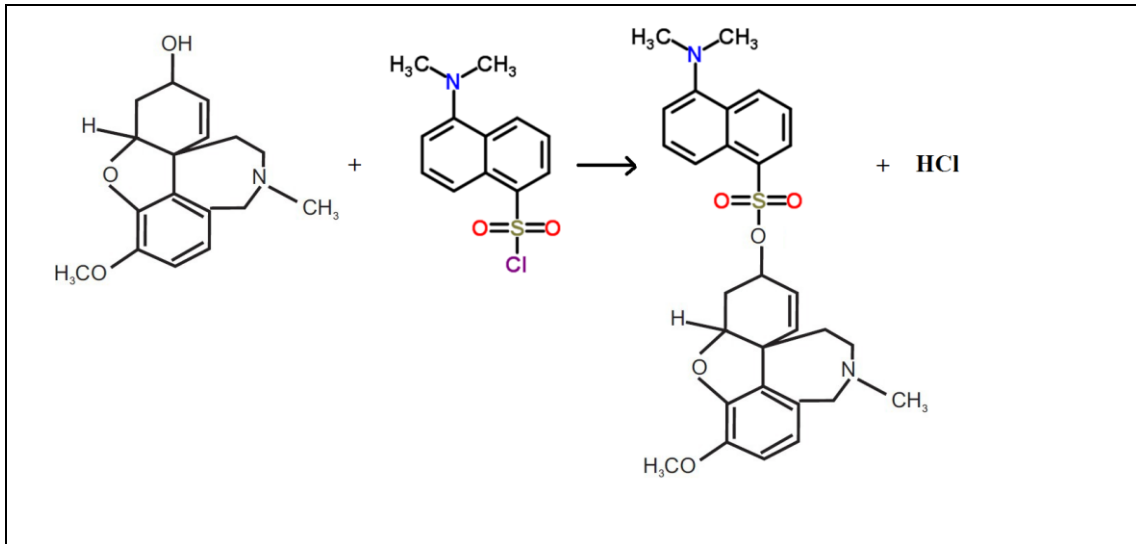
Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.8'de belirtilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesiyle İlgili Çalışmalar

4.1.1. Galantaminin Dansil klorür ile Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi galantamin ile dansil klorür arasındaki reaksiyon sonucu meydana gelen ve fluoresans gösteren galantamin-dansil türevinin sulu ortamdan ekstraksiyonu için en uygun organik çözücü araştırıldı. Galantamin ile dansil klorür arasındaki reaksiyonun hangi koşullarda en etkin şekilde gerçekleştiğini araştırmak amacıyla ve türevin oluşumu üzerine pH, sıcaklık, reaksiyon süresi ve belirteç miktarı gibi parametrelerin etkisi incelendi.



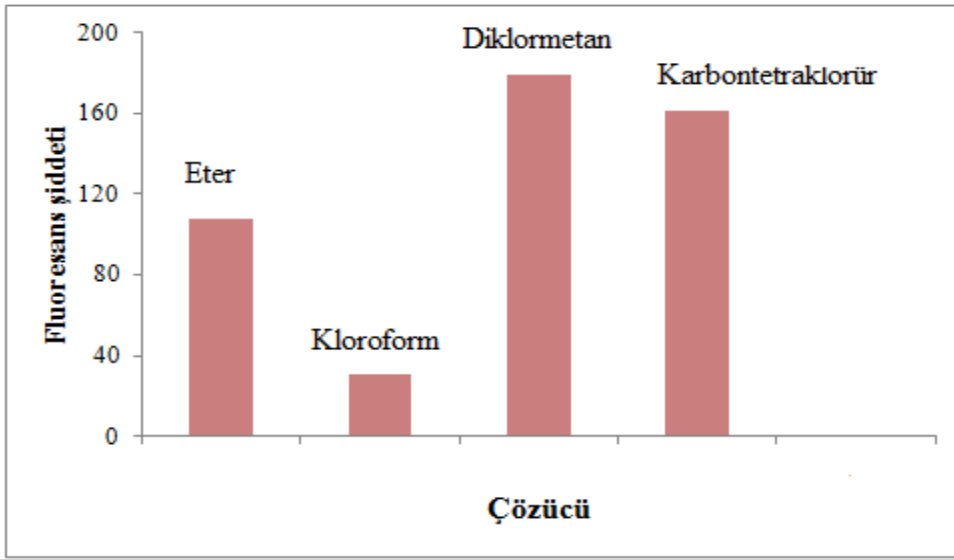
Şekil 4-1 Galantaminin Dansil klorür ile Reaksiyonu

4.1.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü

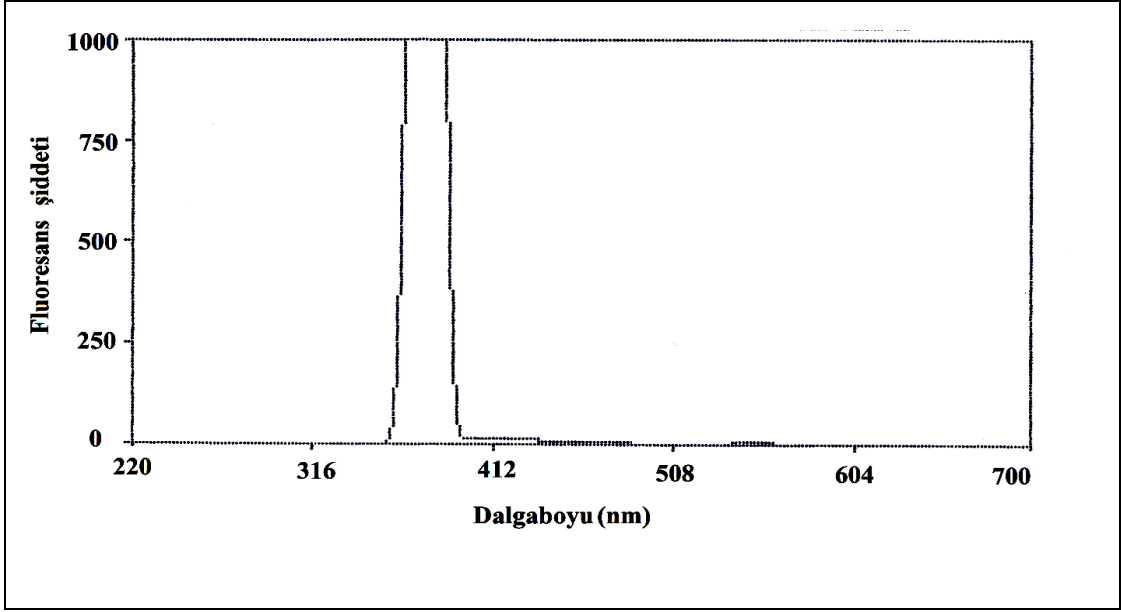
Galantamin türevinin sulu ortamdan ekstraksiyonu için en uygun organik çözücüyü saptamak üzere Bölüm 3.3.1.1’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Oluşan türevin çeşitli çözücülerde fluoresans spektrumları alındı. Bu spektrumlarda Galantamin-Dansil türevinin denenen organik çözücülerde gösterdiği maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları ve fluoresans şiddeti değerleri elde edilmiştir. Tablo 4-2 ve Şekil 4-2’de yer alan bu değerler incelendiğinde türevin ekstraksiyonu için en uygun çözücünün diklorometan olduğu saptanmıştır. Şekil 4.3’de boşun ve Şekil 4.4’de galantamin-dansil türevinin diklorometandaki emisyon spektrumları görülmektedir

Tablo 4-1 Galantamin-Dansil türevinin çeşitli organik çözücülerdeki maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları ile fluoresans şiddeti değerleri

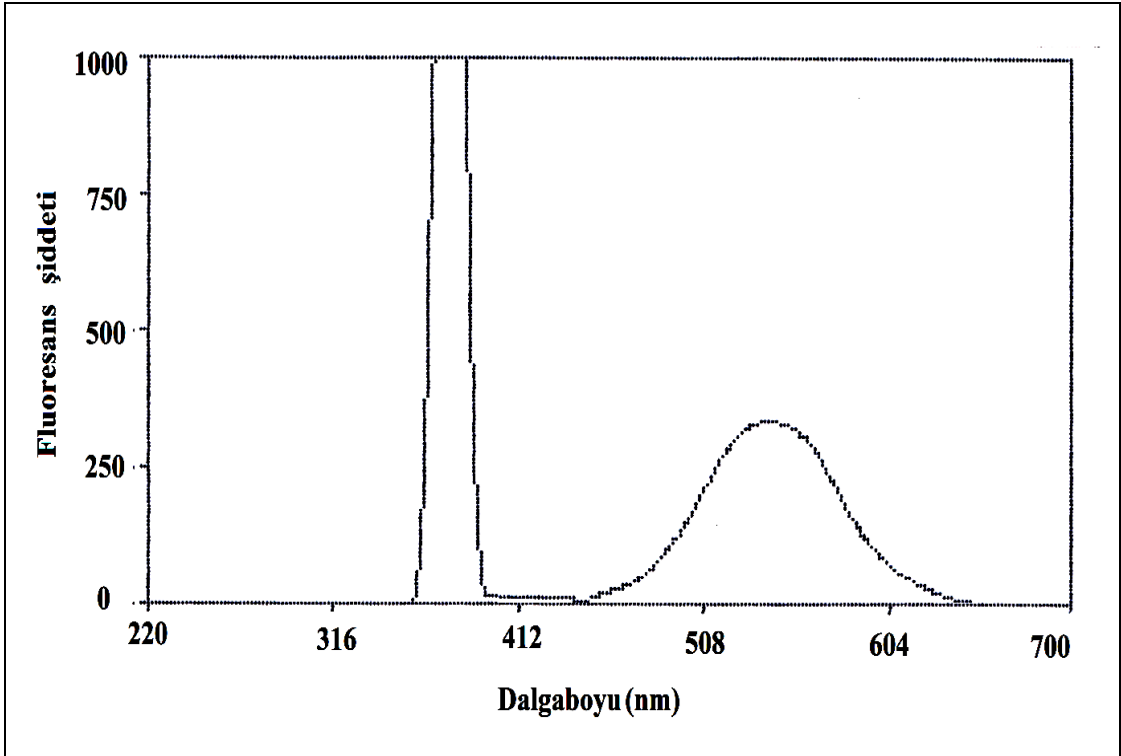
	Fluoresans Şiddeti	$\lambda_{\text{eks}} / \lambda_{\text{em}}$ (nm)
Eter	108	374 / 510
Kloroform	31	415 / 516
Diklorometan	179	375 / 537
Karbontetraklorür	161	354 / 545



Şekil 4-2 Galantamin-dansil türevinin çeşitli organik çözücülerdeki fluoresans şiddeti



Şekil 4-3 Boşun diklorometandaki emisyon spektrumu ($\lambda_{\text{eks}}=375 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=537 \text{ nm}$)



Şekil 4-4 Galantamin-Dansil (500 ng/mL) türevinin diklorometandaki emisyon spektrumu ($\lambda_{\text{eks}}=375 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=537 \text{ nm}$)

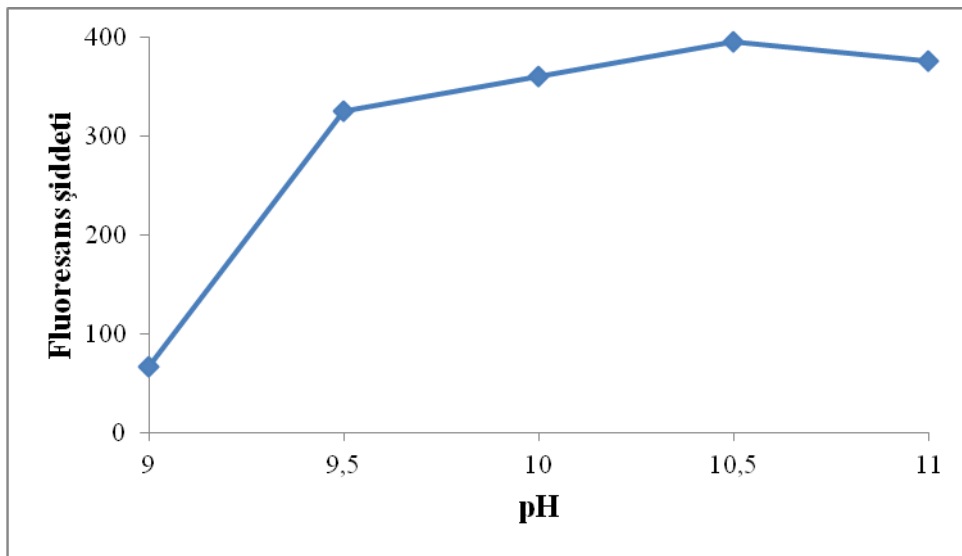
4.1.1.2. pH

Galantamin ile Dansil klorür arasındaki reaksiyonun en iyi hangi pH'da yürüdüğünü saptamak amacıyla pH 9,0–11,0 arasında hazırlanmış bir seri tampon çözeltiyle Bölüm 3.3.1.2'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Elde edilen veriler incelendiğinde

galantamin-Dansil türevinin pH 10,5’da karbonat tamponuyla kantitatif olarak oluştuğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4-2 ve Şekil 4.5.de verilmiştir.

Tablo 4-2 Çeşitli pH larda oluşturulan Galantamin-Dansil türevine ait floresans şiddeti değerleri

pH	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
Floresans Şiddeti	67	326	361	396	377



Şekil 4-5 Galantamin-Dansil türevinin oluşumu üzerine pH nın etkisi

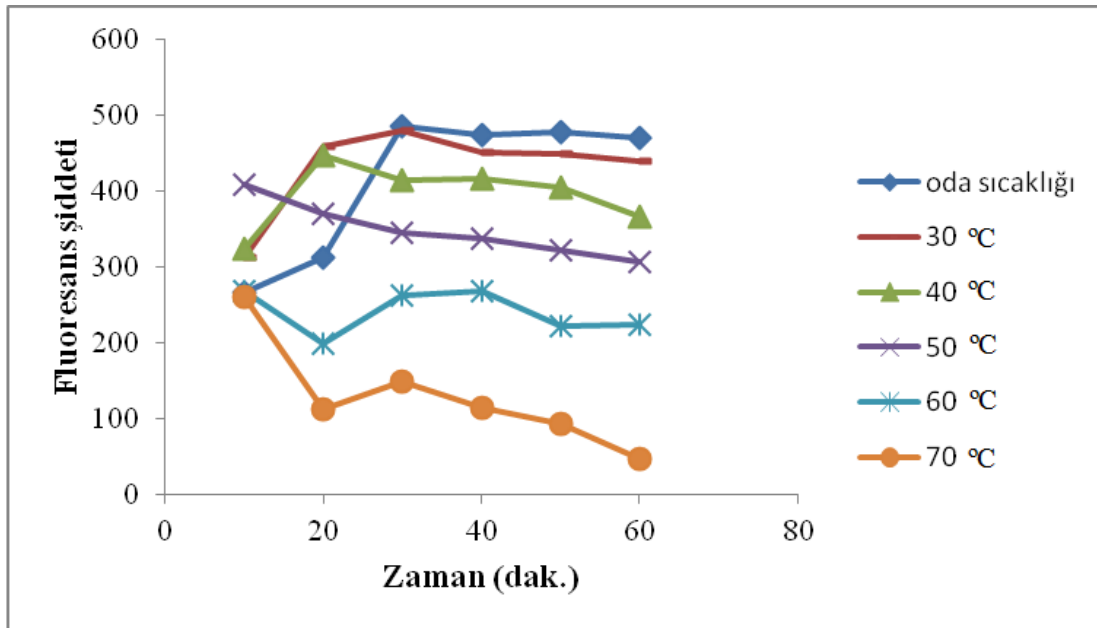
4.1.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

Galantamin ile dansil klorürün reaksiyona girdiği en uygun sıcaklık ve reaksiyon süresini saptamak amacıyla Bölüm 3.3.1.3’te anlatıldığı gibi oda sıcaklığında, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda çalışıldı. Her sıcaklıkta 10 ile 60 dakika arasında türev oluşumu izlendi.

Elde edilen galantamin–dansil türevlerine ait floresans şiddeti değerlerinin, sıcaklık ve zamana karşı gösterdiği değişim Tablo 4-3 ve Şekil 4.6’da verilmiştir. Bu verilere dayanılarak, galantamin ile dansil klorürün arasındaki reaksiyonun tamamlanması için oda sıcaklığında 30 dakika süreyle bekletmenin yeterli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4-3 Çeşitli sıcaklık ve zamanlarda oluşturulan Galantamin-Dansil türevine ait floresans şiddeti değerleri

Zaman (dak.)	10	20	30	40	50	60
Sıcaklık(°C)						
30	313	459	480	451	449	440
40	325	447	415	417	406	367
50	410	371	345	337	322	307
60	268	199	263	268	223	225
70	261	112	149	115	94	47
Oda sıcaklığı	267	312	487	474	479	471



Şekil 4-6 Galantamin-Dansil türevinin oluşması üzerine sıcaklık ve zaman etkisi

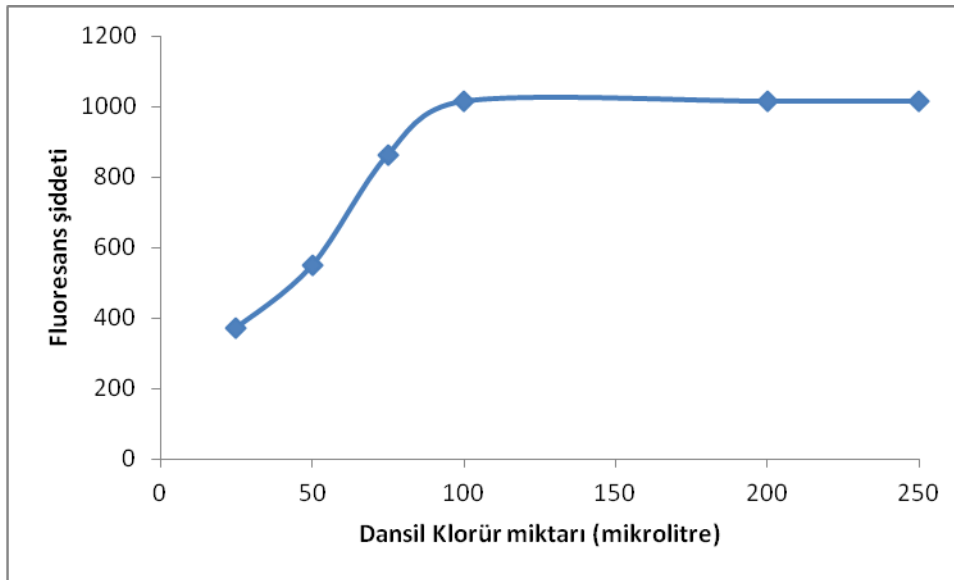
4.1.1.4. Belirteç Miktarı

Dansil klorür ile galantamin arasındaki reaksiyonun maksimum oranda ürün vermesi için gerekli belirteç miktarını saptamak amacıyla asetonda hazırlanan 200 µg/mL dansil klorür çözeltisinin hacmi 25-250 µL olacak şekilde hazırlanan bir seri

belirteç çözeltisi ile bölüm 3.3.1.4' de anlatıldığı gibi çalışıldı. Tablo 4-4 ve Şekil 4.7 de galantamin-dansil türevinin oluşması için optimum belirteç hacmi 100 μL olarak belirlendi.

Tablo 4-4 Çeşitli hacimlerdeki dansil klorür miktarına karşı Galantamin-Dansil türevine ait fluoresans şiddeti değerleri

Dansil klorür çözelti hacmi (μL)	25	50	75	100	200	250
Fluoresans Şiddeti	372	610	863	1015	1015	1015



Şekil 4-7 Galantamin-Dansil türevinin oluşumu üzerine belirteç miktarının etkisi

4.1.2. Galantaminin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Analizi

Galantamin-Dansil türevinin ters faz sıvı kromatografisi ile analizi için, detektör, dalga boyu ve ayırıcı kolon seçimi yapıldıktan sonra, mobil faz sistemi belirlendi ve optimize edildi. Optimize edilmiş türevlendirme aşamaları ve ekstraksiyon koşullarında elde edilen galantamin-dansil türevleri analiz edildi.

4.1.2.1. Galantamin-Dansil Türevinin Hazırlanması

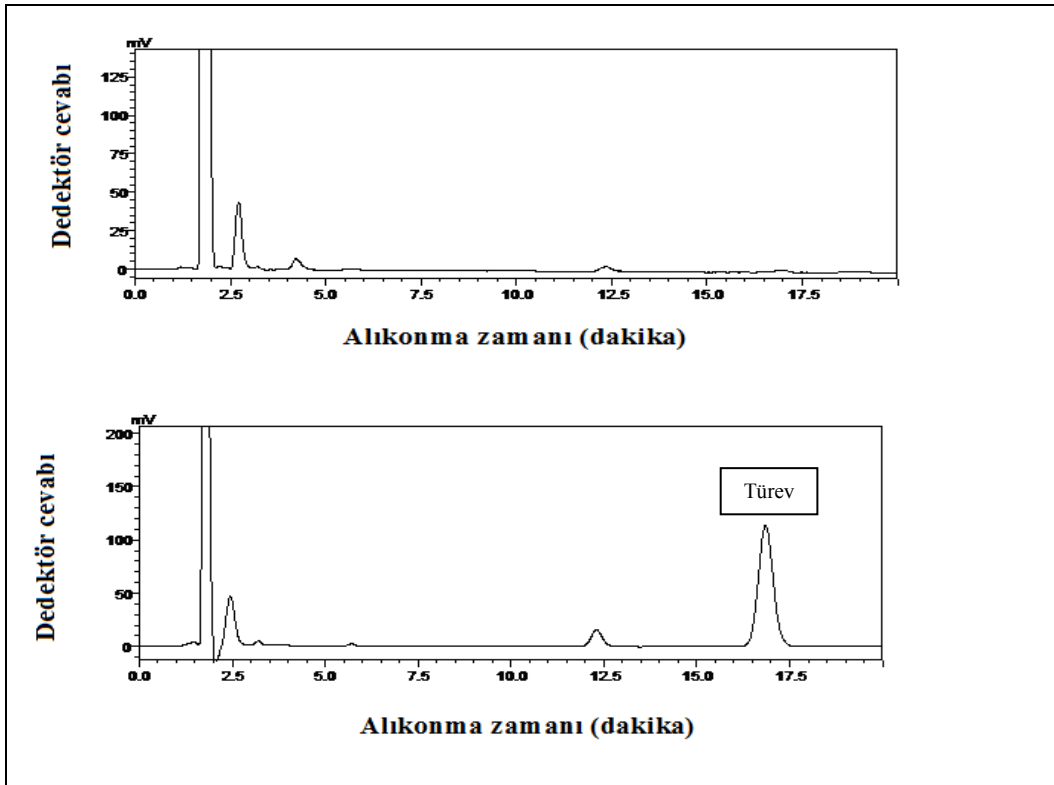
Spektrofluorimetric optimize edilen koşullarda yapılan türevlendirme ve ekstraksiyon işlemleri sonrasında, türevler azot akışı altında kurularak, türev çözücüsü olarak mobil faz kullanıldı. Otomatik enjeksiyon sistemiyle 20 μL enjeksiyon yapıldı.

4.1.2.2. Detektör Dalga Boyu ve Kolon Seçimi

Bölüm 3.3.2.2’de anlatıldığı gibi çalışılarak, eksitasyon dalga boyu 375 nm, emisyon dalga boyu 537 nm olarak belirlendi. Kolon seçimi için Inertsil C₁₈ kolonuyla (150 mm, 4,6 mm ID, 5 µm parçacık büyüklüğü) çalışılmıştır. Çözücü sarfiyatı az olacağı için daha kısa olan Inersil C₁₈ kolonu analitik çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.1.2.3. Mobil Faz Seçimi

İzokratik yöntemle galantamin-dansil türevinin ayrılmasında kullanılan mobil faz sistemleri olarak asetonitril:su, metanol su, metanol-o-fosforik asit, asetonitril:o-fosforik asit 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 (v/v) denenmiştir. Galantamin-dansil türevi en iyi asetonitril:o-fosforik asit (pH 2,7) 40:60 (v/v) mobil faz sisteminde ayrılmıştır. Türevin bu mobil faz sisteminde, İnertsil C₁₈ kolonda ve 1,2 mL/dak mobil faz akış hızında alıkonma zamanı 16,8 dakika olarak saptanmıştır. Türevin gösterdiği maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları, floresans detektörde sırasıyla 375 ve 537 nm olarak belirlenmiştir.



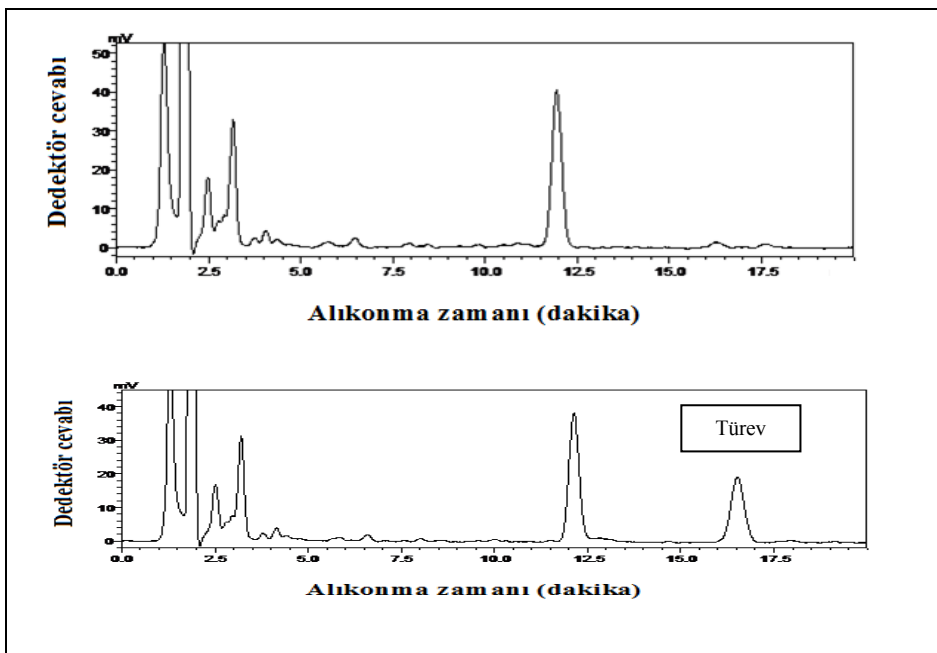
Şekil 4-8 Boş ve (2000ng/mL) galantamin-dansil türevinin kromatogramı

4.1.2.4. Plazma Proteinlerinin Çöktürülmesi ve Ekstraksiyon İşlemleri

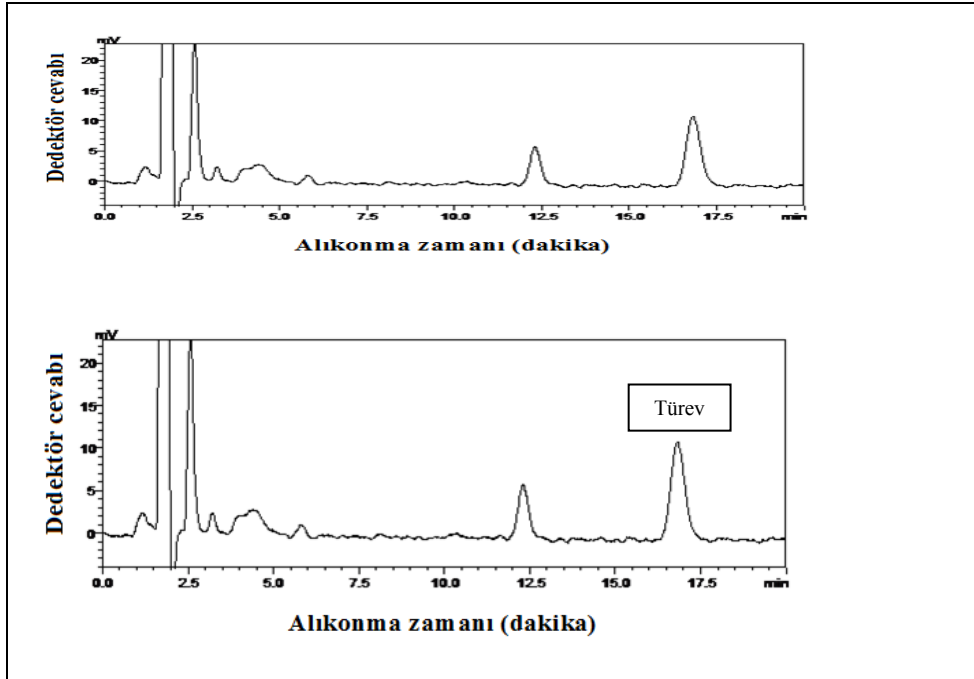
Plazma veya serum örneklerinde yapılan ilaç analizlerinde öncelikle proteinlerin çöktürülerek ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu konudaki çalışmalar incelendiğinde proteinleri çöktürmek amacıyla en çok etanol, metanol, asetonitril, Na_2CO_3 , NaHCO_3 çözeltileri, pH 7 fosfat tamponu, alkali pH (8,0-10,0) larda fosfat, karbonat ve borat tamponları, NaOH çözeltileri kullanıldığı görülmüştür. Proteinlerin çöktürülmesinden sonra, bazı çalışmalarda çökelti üzerindeki berrak sıvı kısım analiz edilmiş, bazı çalışmalarda ise kısmi bir temizleme amacıyla organik bir çözücü veya çözücü karışımı ile ekstraksiyon yapılmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda Bölüm 3.3.2.6 da anlatıldığı gibi yapılan incelemeler sonucunda elde edilen veriler Tablo 4-5'da verilmiştir. Tablodan da görülebileceği gibi, yapılan çalışmalar sonucunda en etkin sonuçlar 0,1 N NaOH'da ve etil asetatlı sistemde alınmıştır.

Tablo 4-5 Plazma proteinlerinin çöktürülmesi ve ekstraksiyon işleminin pik alanına etkisi

Çöktürücü	Metanol	Fosfat Tamponu (pH 7,0)		Borat Tamponu (pH 10,0)		0,1 N NaOH	
		Etil asetat	n-heptan-isopropil alkol (99:1)	Etil asetat	n-heptan-isopropil alkol (99:1)	Etil asetat	n-heptan-isopropil alkol (99:1)
Ekstraksiyon Çözücüsü	-	Etil asetat	n-heptan-isopropil alkol (99:1)	Etil asetat	n-heptan-isopropil alkol (99:1)	Etil asetat	n-heptan-isopropil alkol (99:1)
Pik Alanı	157816	192486	225869	199734	105222	291889	126210



Şekil 4-9 Boş ve (500 ng/mL) galantamin-dansil türevinin katkılı idrar örneğine ait kromatogram



Şekil 4-10 Boş ve (125 ng/mL) galantamin-dansil türevinin katkı plazma örneğine ait kromatogram

4.1.2.5. Sulu Çözeltide Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi

Bölüm 3.3.2.5 te anlatıldığı gibi çalışılarak 125, 250, 500, 1000, 2000 ng/mL konsantrasyonlarında dört kez çalışıldı. Kromatogramlar değerlendirilirken Galantamin-Dansil türevi pik alanları grafik edilerek, ölçü eğrisi oluşturuldu. Pik alanları ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s), ve bağıl standart sapma ($s/\bar{A} \times 100$) değerleri Tablo 4-6'da özetlenmiştir. Ayrıca şekil 4.7'de sulu çözeltide hazırlanan Galantamin-dansil türevinin kromatogramı verilmiştir.

Tablo 4-6 Galantaminin 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltilerde hazırlanan ölçü eğrisi

C (ng/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	\bar{A}	s	s/ $\bar{A} \times 100$
2000	399804	323140	320619	331622	343796	37633,96	10,94
1000	158637	166702	166702	156777	162205	5248,49	3,23
500	81542	86831	81922	76801	81774	4097,96	5,01
250	33617	36047	35231	37627	35630,50	1670,66	4,68
125	15817	15317	14412	14553	15024,80	661,08	4,39

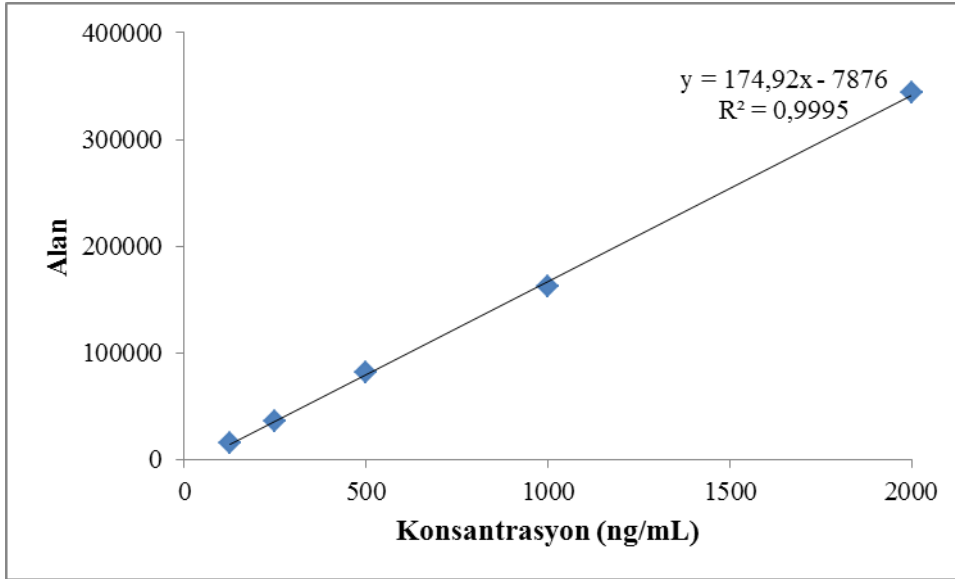
\bar{A} değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:

$$A = 174,92 C - 7876$$

$$r = 0,9995$$

Tablo 4-7 Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizine Ait Parametreler

	1	2	3	4	Ortalama
a	204,34	163,70	163,39	168,25	174,92
b	-20483	-1257,70	-2847,30	-6916,60	-7876
r	0,9909	0,9985	0,9988	0,9995	0,9995



Şekil 4-11 Galantaminin 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisi

Çalışmada elde edilen veriler değerlendirildiğinde Galantamin-Dansil konsantrasyonları ile pik alanları arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlendi.

4.1.2.6. İdrarda Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi

Bölüm 3.3.2.6'da anlatıldığı gibi çalışılarak galantaminin 125, 250, 500, 1000, 1000 ve 2000 ng/mL konsantrasyonlarında dört kez çalışıldı. Kromatogramlar değerlendirilirken Galantamin-dansil türevinin pik alanları ve konsantrasyonları arasında ölçü eğrisi oluşturuldu. Pik alanlarının ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s), ve bağıl standart sapma ($s/\bar{A} \times 100$) değerleri Tablo 4-9'da özetlenmiştir ve Şekil 4.8'de idrarda hazırlanan galantamin-dansil türevinin kromatogramı gösterilmiştir.

Tablo 4-8 Galantaminin 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında idrarda hazırlanan ölçü eğrisi

C ng/mL	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	\bar{A}	s	s/ $\bar{A} \times 100$
2000	356864	320619	320619	311999	327525	19976,81	6,09
1000	152438	152435	158637	156777	155072	3136,23	2,02
500	75059	72452	75207	72040	73689,40	1676,36	2,27
250	35192	34512	35750	32543	34499,30	1398,97	4,05
125	16633	16278	16951	16181	16510,80	351,98	2,13

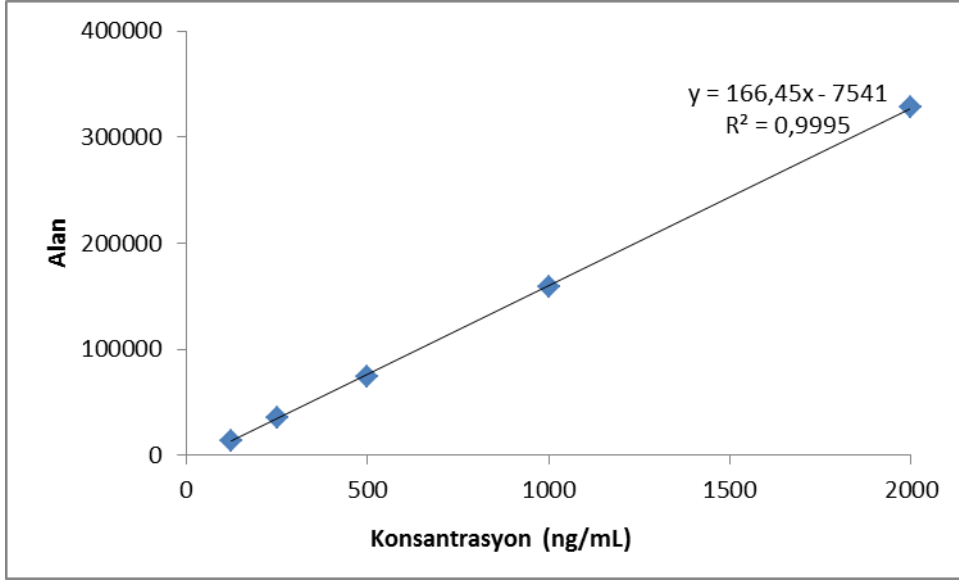
\bar{A} değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:

$$A = 166,45 C - 7541$$

$$r = 0,9995$$

Tablo 4-9 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	4	Ortalama
a	181,30	162,77	162,57	159,17	166,45
b	-13272	-6884,90	-4561,50	-5445,30	-7541
r	0,9952	0,9995	0,9999	0,9996	0,9995



Şekil 4-12 Galantaminin 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında idrarda hazırlanan ölçü eğrisi

4.1.2.7. Plazmada Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi

Bölüm 3.3.2.6'da anlatıldığı gibi çalışılarak galantaminin 125, 250, 500, 1000 ve 2000 ng/mL konsantrasyonlarında dört kez çalışıldı. Kromatogramlar galantamin-dansil türevinin pik alanları ve konsantrasyonları arasında ölçü eğrisi oluşturularak değerlendirildi. Şekil 4.10'da boş ve galantamin-dansil türevinin katkılı plazma örneğine ait kromatogram verilmiştir. Pik alanları ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s), ve bağıl standart sapma ($s/\bar{A} \times 100$) değerleri Tablo 4-10'da ve ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler ise Tablo 4-11'de özetlenmiştir.

Tablo 4-10 Galantaminin 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrisi

C ng/mL	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	\bar{A}	s	s/ $\bar{A} \times 100$
2000	327655	327891	325799	329411	327689	1480,91	0,45
1000	158973	158560	158786	158930	158812	186,21	0,12
500	74280	74504	74755	74600	74534	198,83	0,27
250	34780	34755	34740	34633	34727	64,80	0,19
125	13750	13893	13510	13424	13644	215,71	1,58

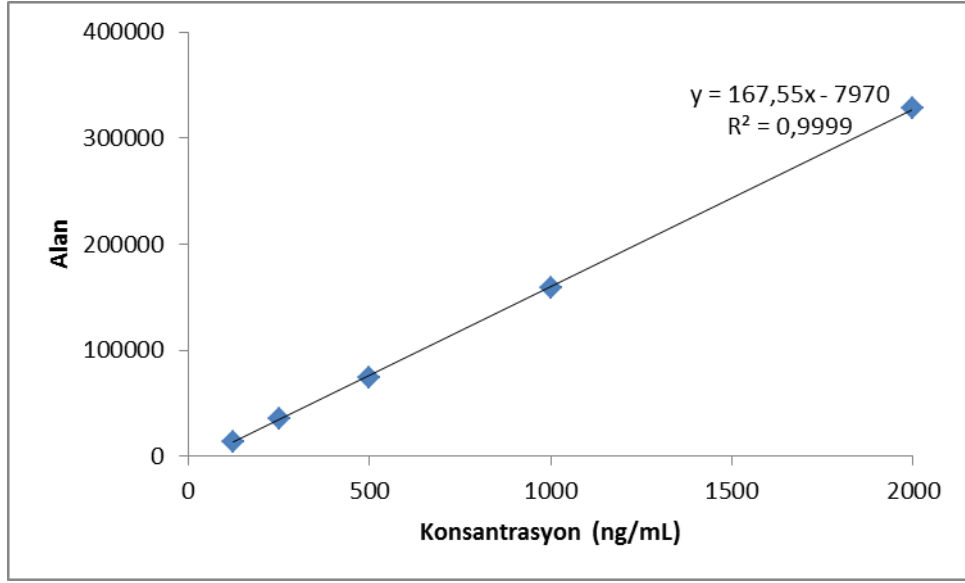
\bar{A} değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:

$$A = 167,55 C - 7970$$

$$r = 0,9999$$

Tablo 4-11 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	4	Ortalama
a	167,54	167,56	166,56	168,54	167,55
b	-7953,2	-7938,4	-7566,3	-8422	-7970
r	0,9999	0,9999	1	0,9999	0,9999



Şekil 4-13 Galantaminin 125-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrisi

4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

4.2.1. Doğrusallık

Sulu çözeltide (Tablo 4-6), idrarda (Tablo 4-8) ve plazmada (Tablo 4-10) hazırlanan ölçü eğrilerinin regresyon analizleri sonucunda elde edilen r değerleri, (sulu:0,9995, idrar:0,9995, plazma:0,9999) sulu çözelti, plazma ve idrarda galantamin-Dansil türevine ait detektör cevabının, eşdeğer galantamin miktarıyla doğrusal bir orantı içinde ilişkilendiğini göstermektedir.

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

Gözlenebilme sınırı Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi hesaplanarak idrar ve plazmada sırasıyla 70,99 ve 6,27 ng/mL bulunmuştur. Tayin sınırı ise idrarda 212,97 ng/mL, plazmada ise 18,81ng/mL olarak bulunmuştur (Tablo 4-12 ve Tablo 4-13).

Tablo 4-12 İdrarda Gözlenebilme ve Tayin Sınırları

Parametreler	Değerler
Doğru denklemi	A =166,45 C-7541
Eğim ± SD	166,45 ± 10,03
Intersept ± SD	7541 ± 3938,87
LOD ng/mL	78,09
LOQ ng/mL	236,64

Tablo 4-13 Plazmada Gözlenebilme ve Tayin Sınırları

Parametreler	Değerler
Doğru denklemi	A =167,55 C-7970
Eğim ± SD	167,55 ±0,82
Intersept ± SD	7970 ± 350,5
LOD ng/mL	6,90
LOQ ng/mL	20,92

4.2.3. Kesinlik ve Doğruluk

4.2.3.1. Aynı Gün İçinde İdrar ve Plazmada Yapılan Analizlerin Tekrarlanabilirliği

Üç farklı konsantrasyonda (125, 500 ve 2000 ng/mL) galantamin içeren idrar ve plazma örnekleri Bölüm 3.4.3.1 de anlatıldığı gibi çalışıldı.

Her bir konsantrasyon için 6 farklı örnekle çalışıldı. Bağlı standart sapma, idrar için; %0,24 ile 0,59 plazma için; %0,35 ile 1,03 arasındadır. Sonuçlar Tablo 4.14’de, ve Tablo 4.15’de verilmiştir.

Tablo 4-14 Aynı Gün İçinde İdrarda Yapılan Analizlerin Tekrarlanabilirliği

	İdrardaki konsantrasyon (ng/mL)		
	2000	500	125
Bulunan	1996,54	496,24	125,00
	2009,27	498,60	124,62
Konsantrasyon	1996,39	497,13	124,65
	2001,27	496,38	125,00
(ng/mL)	2003,59	501,23	126,44
	2003,68	496,40	125,23
Ortalama	2001,79	497,66	125,15
Standart Sapma	4,89	2,08	0,74
Bağıl standart sapma			
(% RSD)	0,24	0,41	0,59

Tablo 4-15. Aynı Gün İçinde Plazmada Yapılan Analizlerin Tekrarlanabilirliği

	Plazmadaki konsantrasyon (ng/mL)		
	2000	500	125
Bulunan	1986,49	501,90	126,39
	1988,12	502,88	125,05
Konsantrasyon	1986,77	501,90	124,78
	1986,32	493,73	124,79
(ng/mL)	1988,36	492,81	125,65
	2003,13	492,23	126,21
Ortalama	1989,87	497,58	125,48
Standart Sapma	7,09	5,13	0,71
Değişme katsayısı			
(% RSD)	0,35	1,03	0,56

4.2.3.2. Farklı Günlerde İdrar ve Plazmada Yapılan Analizlerin Tekrarlanabilirliği

Üç farklı konsantrasyonda (125, 500 ve 2000 ng/mL) galantamin içeren idrar ve plazma örnekleri Bölüm 3.4.3.2 anlatıldığı gibi çalışıldı.

3 farklı günde, her seferinde yeni örnek hazırlanarak yapılan çalışmalarda, bağıl standart sapmaları idrarda % 0,13 ile % 0,51, plazmada ise % 0,04 ile % 0,17 arasında bulundu. Sonuçların Tablo 4-16 ve Tablo 4-17’de verilmiştir.

Tablo 4-16 Farklı Günlerde İdrarda Yapılan Analizlerin Tekrarlanabilirliği

	İdrardaki konsantrasyon (ng/mL)		
	2000	500	125
Bulunan	1998,38	496,44	126,46
	2003,69	496,39	125,23
Konsantrasyon	1997,42	496,45	125,01
	1997,39	496,68	124,90
(ng/mL)	1996,45	499,78	124,62
	1996,31	497,57	125,24
Ortalama	1998,27	497,22	125,24
Standart Sapma	2,78	1,33	0,64
Değişme katsayısı			
(% RSD)	0,13	0,27	0,51

Tablo 4-17 Farklı Günlerde Plazmada Yapılan Analizlerin Tekrarlanabilirliği

	Plazmada konsantrasyon (ng/mL)		
	2000	500	125
Bulunan Konsantrasyon (ng/mL)	1983,81	498	126,52
	1983,83	498,69	126,71
	1985,55	497,79	126,66
	1983,90	498,02	126,69
	1984,11	500,02	126,20
	1985,04	497,72	126,45
Ortalama	1984,37	498,37	126,53
Standart Sapma	0,74	0,87	0,19
Değişme katsayısı (% RSD)	0,04	0,17	0,15

4.2.4. Yöntemin Sağlamlığı (Robustness)

Mobil faz bileşiminde ($\pm 2\%$), akış hızında ($\pm 0,1$ mL), reaksiyon pH ($\pm 0,1$), eksitasyon ve emisyon dalga boyları (± 1 nm) ve kolon temperaturünde ($\pm 2^\circ\text{C}$) yapılan ufak değişikliklerde bir fark görülmemiştir.

4.2.5. Uygunluk Testi

Geliştirilen yöntem sonucunda Farmakope tarafından tanımlanan SUT parametreleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 4-18).

Tablo 4-18 Uygunluk testi sonuçları

Parametreler	Kabul edilen deęer	İdrarda	Plazmada
Alıkonma zamanı (t_R)		16,8 dakika	16,8 dakika
Ölü zaman (t_0)		1,0 dakika	0,8 dakika
Kapasite faktörü (k)	$k > 2$	15,8	20
Kuyruklanma faktörü (T)	$T < 2$	1,058	1,077
Teorik plato sayısı (N)	$N > 2000$	7919	6327

4.2.6. Galantamin-Dansil Türevinin Stabilitesi

Galantamin-dansil türevinin dayanıklılığını incelemek üzere Bölüm 3.4.6.'da anlatıldığı gibi çalışıldı. Oda sıcaklığında, karanlıkta ve gün ışığında ve 4°C karanlıkta bırakılan örneklere ait sonuçlar Tablo 4-19'da görölmektedir. Elde edilen verilere göre 4°C karanlıkta en az bir gün dayandığı görölmektedir.

Tablo 4-19 Galantamin-Dansil Türevinin Stabilitesi

	Fluoresans Şiddeti			
	0 saat	6 saat	24 saat	72 saat
20 °C Karanlık	273	215	204	192
20 °C Aydınlik	273	204	203	198
4 °C Karanlık	270	273	269	264

4.2.7. Geri Kazanım

Galantaminin plazma ve idrardan geri kazanım oranının saptanması için Bölüm 3.4.7 de anlatıldığı gibi, plazma ve idrar ölçü eğrisi denkleminin eğimi ($A = 167,55C - 7970$ ve $A = 166,45 C + 7541$) sulu çözeltiden elde edilen ölçü eğrisi denkleminin ($A = 174,92 C - 7876$) eğimi ile oranlandığında geri kazanılma oranı sırasıyla % 95,78 ve % 95,15 olarak hesaplandı.

4.3. Kapsüllerde Galantamin Miktar Tayini

8 mg Galantamin içeren Reminyl® kapsüller Bölüm 3.5.1 ve 3.5.2’de anlatıldığı gibi geliştirilen HPLC-Fluoresans yöntemi ve Farmakope HPLC-UV yöntemiyle analiz edildi. Her iki yöntemde elde edilen sonuçlar Tablo 4.20’de özetlenmektedir.

Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemiyle elde edilen sonuçlar ortalamalar yönünden student (t) testiyle ve standart sapmalar yönüyle Fisher (F) testiyle karşılaştırıldı. Tablo 4.20’deki sonuçların incelenmesiyle de görüleceği gibi, hesaplanan t ve hesaplanan F değerleri ilgili % 95 olasılık düzeyi cetvel değerlerinden daha küçük olduğundan geliştirilen yöntem ile kıyas yöntemi arasında gerek doğruluk, gerek kesinlik yönünden anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

Tablo 4-20 8 mg Galantamin İçeren Kapsüllerin Analiz Sonuçları ve Sonuçların İstatistiki Olarak Değerlendirilmesi

	Geliştirilen HPLC Yöntemi		Kıyas Yöntemi		
	n	mg /kapsül	%	mg / kapsül	%
1		8,07	100,87	8,06	100,75
2		8,01	100,12	8,02	100,25
3		8,05	100,62	8,01	100,12
4		8,06	100,75	8,03	100,37
5		8,07	100,87	8,05	100,62
6		8,02	100,25	7,98	99,75
\bar{x}		8,04		8,03	
s		0.02		0.03	
RSD		0,24		0.37	
t,s/\sqrt{n}		0,021		0,031	
Güven sınırları		8,024-8,056		8,018-8,042	
t = 1,09		$n_1 = n_2 = 6$		$t_{\text{tablo}} = 2,23$	
F = 2,25		P = 0,05		$F_{\text{tablo}} = 5,05$	

5. TARTIŞMA

Farmasötik preparatlarda, idrar ve plazmada galantamin tayini için geliştirilen HPLC yöntemi, aromatik hidroksil grubu içeren bu madde ile dansil klorür arasındaki reaksiyona dayanmaktadır. Dansil klorür primer, sekonder aminlerle ve hidroksil gruplarıyla şiddetli floresans gösteren türevler oluşturur.

Dansil klorür ile amin ve hidroksil grubu içeren maddeler arasındaki reaksiyon alkali pH larda, sıcakta yürüdüğü ve oluşan ürünün genellikle organik bir çözücüye ekstre edildiği daha önce bu belirteç ile yapılan araştırmalarda belirtilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda galantamin-dansil türevinin kantitatif olarak elde edilebilmesi için en uygun reaksiyon koşulları araştırıldı. En iyi sonuçlar pH 10,5 karbonat tamponuyla çalışıldığında gözlemlendi. Optimum sıcaklık ve reaksiyon süresini saptamak amacıyla oda sıcaklığı, 40, 50, 60 ve 70°C de 10-60 dakika arasında çalışıldı ve galantamin ile dansil klorür arasındaki reaksiyonun tamamlanması için oda sıcaklığında 30 dakika olarak belirlendi. Türevin kantitatif oranda oluşması için gerekli belirteç miktarı Dansil klorür/galantamin mol oranı olarak incelendiğinde 2,13 kat belirtecin yeterli olduğu görüldü.

Oluşan ürününün sulu çözeltiden ekstraksiyonu için organik çözücüler denendi ve en yüksek floresans şiddeti diklorometan ile elde edildi. Bu çözücü içinde türeve ait maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 375 ve 537 nm dir.

Galantamin-Dansil türevinin dayanıklılığı araştırıldığında, diklorometan içinde +4°C de karanlıkta 24 saat dayanıklı kalırken, oda sıcaklığında karanlıkta ve gün ışığında 24 saat bekletildiğinde floresans şiddetinin sırasıyla azaldığı gözlemlenmiştir.

Dansil türevlerinin HPLC yöntemiyle analizlerinde genellikle ters fazlı sistemler kullanıldığından Galantamin-Dansil türevinin analizi için öncelikle bu sistemin koşulları araştırıldı. Bu incelemeler doğrultusunda yapılan sıvı kromatografik çalışmalarda en uygun mobil faz sisteminin asetonitril:o-fosforik asit (pH 2,7) (40:60) olduğu belirlendi. Bu mobil faz sisteminde, İnertsil C₁₈ kolonda ve 1,2 ml/dk. akış hızında çalışıldı. Floresans detektörde türeve ait maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 375 nm ve 537 nm olarak saptandı.

Belirlenen optimum koşullarda çalışılarak idrar ve plazmada ölçü eğrisi hazırlandı ve galantamin konsantrasyonları ile pik alanları arasındaki doğrusal ilişkinin

125-2000 ng/mL konsantrasyon aralıklarında olduğu belirlendi. Bağlı standart sapma, idrar için; %0,24 ile 0,59 plazma için; %0,35 ile 0,56 arasındadır

Farmasötik preparatlarda galantamin tayini için literatürde bildirilen analiz yöntemleri incelendiğinde gerek spektrofotometrik (5,7,8) gerek bu maddenin doğal floresans göstermesine dayanan spektrofluorimetrik (3,4) ve çalışmaların duyarlılığının geliştirilen yönteminkine kıyasla oldukça az olduğu görülmektedir. Literatürde türevlendirme yöntemine rastlanmamıştır. Bu tezde bildirilen yöntemde ilk kez türevlendirme yapılarak floresans detektör kullanılmaktadır.

Galantamin tayini için geliştirilen HPLC yöntemi, bu maddenin idrar ve plazmada analizine de uygulanmıştır. Çalışmanın bu bölümünde öncelikle plazma proteinlerini çöktürmek ve verimi arttırmak amacıyla çeşitli ön denemeler yapıldı. Bunun için plazma proteinleri 0,1 N NaOH çözeltileriyle proteinler çöktürüldükten sonra sulu çözeltiler etilasetat ile ekstraksiyon yapıldı. İdrar ve plazmada yapılan analizlerde bazıklandırmeden sonraki sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemin duyarlılığının artmasına büyük ölçüde katkıda bulunduğu gibi bu işlem aynı zamanda kromatogramda girişim yapan maddelerin azalmasını da sağlamıştır.

Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmalarında gözlenebilirlik sınırı idrar ve plazma için sırasıyla 70,99 ve 6,27 ng/mL ve tayin sınırı idrar ve plazma için 212,97 ve 18,81 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

Keskinlik için yapılan çalışmalarda, elde edilen gün içi idrar için (%0,24-0,59) plazma için (%0,35-1,03) ve günler arası idrar için (%0,13-0,51), plazma için (%0,04-0,15) tekrarlanabilirlik değerleri yöntemin zaman içinde uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

Yöntemin sağlamlığının (robustness) analizi için mobil faz bileşiminde ve kolon sıcaklığında yapılan küçük bilinçli sapmaların yöntem üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.

Türevlendirilmiş ve mobil fazda çözülmüş örneklerin stabilitesiyle ilgili yapılan testlerde, oda sıcaklığında ve ışıktaki örneğin hızla bozunduğu ancak karanlıkta ve soğukta stabilitesini koruduğu gözlenmiştir.

Geri kazanım değerleri idrar için %95,78, plazma için %95,15 olarak hesaplanmıştır. Sulu ölçü eğrisinde, idrarda ölçü eğrisinde ve plazmadaki ölçü eğrisinde

yapılan tüm işlemlerin, birebir tekrarlanmış olmasının, geri kazanım değerinin oldukça iyi olmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Galantamin hidrobromür içeren kapsüllerin geliştirilen bu yöntemle analizinden elde edilen sonuçlar, kıyas yöntemiyle elde edilen sonuçlarla % 95 olasılık düzeyinde ve 6 deneme üzerinden standart sapmalar yönünden F-testi, ortalamalar yönünden t-testi uygulanarak istatistiksel olarak kıyaslandığında her iki yöntem arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Sonuç olarak, geliştirilen yöntem gerek farmasötik preparatlarda gerek idrarda gerekse plazmada galantamin tayininde kullanılabilir. Bu çalışmayla galantaminin dansil klorür ile flüoresans türevlendirilmesi için uygun koşullar da ilk defa ayrıntılı olarak araştırılmış olmaktadır.

Geliştirilen yöntem gerek rutin farmasötik analizlerde gerek galantaminin plazma ve idrarda biyoyararlanım çalışmalarında rahatlıkla önerilebilir

KAYNAKLAR

1. Rx Media Pharma (2015). İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı.
2. The Merck Index (2001). 13th ed. USA.
3. Patel, Amit V., Patel, Vishal J., Patel, Avani V., Dave, Jayant B., Patel, Chhaganbhai N.(2013). Determination of galantamine hydrobromide in bulk drug and pharmaceutical dosage form by spectrofluorimetry. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences* **5(4)**, 314-317,9
4. Culzoni, M.J., Aucelio, R.C., Escander, G.M. (2010). Spectrofluorimetry in organized media coupled to second-order multivariate calibration for the determination of galantamine in the presence of uncalibrated interferences. *Talanta* **81**, 325-332
5. Mittal, K., Dhingra, T., Upadhyay, A., Mashru, R., Malik, J., Thakkar, A.(2013). Estimation of uncertainty for measuring galantamine hydrobromide in pharmaceutical formulation using ultraviolet spectrophotometry. *Journal of pharmaceutical Research (Bangalore, India)* **12(1)**, 34-38
6. Tsvetkova, Dobrina., Obreshkova, Danka., Danchev, Nikolai. (2011). Validation of TLC-densitometric method for determination of galanthamine hydrobromide in pharmaceutical dosage preparations. *Comptes Rendus de l'Academic Bulgare des Sciences* **64(12)**, 1689-1694
7. Patel, Hitesh N., Patel, Amit V., Patel, Vishal J., Dave, Jayant B., Patel, Chhaganbhai N. (2010). UV-spectrophotometric method development and validation for estimation for Galatamine Hydrobromide in tablet dosage form. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **2(2)**, 44-49
8. Mittal, Karan., Kaushal, Ramni., Mashru, Rajashree., Thakkar, Arti. (2010). Estimation of the galanthamine using derivative spectrophotometry in bulk drug and formulation. *Journal of biomedical Science and Engineering* **3(4)**, 439-441

9. Wang, Yanchao., zhu, Guimei., Li, Xia. (2014). Simultaneous determination of galanthamine and lycorine in *Lycoris radiata* by a capillary electrophoresis with and electrochemiluminescence method. *Journal of Separation Science*, 37, 3007-3012
10. Zhu, Yan., Ge, Shu-Li., Wang, Xue., Shu, Lu., Wang, Qing-jiang., He, Pin-gang., Fang, Yu-zhi. (2013). Determination of four central nervous system drugs by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Chinese journal of Analysis Laboratory* **32(3)**, 73-76
11. Berkov, Strahil., Bastida, Jaume., Viladomat, Francesc. (2011). Development and validation of a GC-MS method for rapid determination of galanthamine in *Leucojum* and *Narcissus* ssp.: A metabolic approach. *Talanta*, **83**, 1455-1465
12. Deng, Biyang., Xie, Fang., Li, Linqiu. (2010). Determination of galanthamine in *bulbus Lycoridis Radiatea* by coupling capillary electrophoresis with end-column electrochemiluminescence detection. *Journal of Separation Science*, **33**, 2356-236
13. Qian, Nanping. (2005) Determination method for dissolution of galanthamine hydrobromide dispersion tablets. *Zhongguo Yaoshi (Wuhan, China)* **8(2)**, 125-12
14. Patel, Krupresh B., Patel, Amit V., Patel, Vishal J., Dave, Jayant B., Patel, Chhaganbhai N.(2010). Quantitative determination of Galantamine Hydrobromide in pharmaceutical dosage form by RP-High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **2(2)**, 36-43
15. Zhai, Xue-jia., Yu, Ye., Lu, Yong-ning. (2012). Determination of concentration of galanthamine hydrobromide in rat plasma by HPLC with post-column modification and fluorescence detection. *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi* **32(24)**, 1968-1961
16. Wu, Jing., Hua, Yang., Tang, Daoquan., gao, Yuanyuan., Yin, Xiaoxing. (2011). Pharmacokinetics of galanthamine hydrobromide sustained-

- release tablets in Beagle dogs. *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi* **42(6)**, 438-440, 446
17. Si, Tian-mei., Sun, Li-li., Shu, Liang., Zhang, Hong-yan. (2003). Improvement of detection limit in HPLC determination of galantamine in plasma. *Zhongguo Xinyao Zazhi* **12(10)**, 842-844
18. Zhi, Cuimei., Chang, Yu. (2007). Determination of galanthamine hydrobromide by HPLC. *Yingyong Huagong* **36(3)**, 292-294
19. Xiang, Qiuyue., Chen, Ying., Chen, Zilin. (2014). Sensitive and simultaneous determination of active components in *Lycoris radiata* and rat plasma by HPLC with fluorescence detection. *Analytical Methods*, **6**, 8979-8985
20. Biomedical Chromatography (2014) /*Bioanalytical methods for quantitation of drugs to treat Alzheimer's*/ **28**, 1431-1490
21. Malakova,J., Nobilis, M., Svoboda, Z. (2007). High-Performance Liquid chromatographic method with UV photodiode-array, fluorescence and mass spectrometric detection for simultaneous determination of galantamine and its phase I metabolites in biological samples. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **853**, 265-274
22. Park, Yoo-sin., Kim, Shin-Hee., kim, Sang-Yeon., Kim, Youn-Hee., Lee, Min-Ho., Yang, Seok-Chul., Shaw, Leslie M., Kang, Ju-Seop. (2012). Quantification of Galantamine in Human Plasma by Validated Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry using Glimepride as an Internal Standard: Application to Bioavailability Studies in 32 Healthy Korean Subjects. *Journal of Chromatographic Science* **50(9)**, 803-809
23. Liu, Tong-bin., Wu, Xiang-dong., Yang, Dong-jing., wang, Xue-qin.(2012). Determination of Galanthamine Hydrobromide in the dog plasma by UPLC-MS/MS. *Huaxi Yaoxue Zazhi* **27(3)**, 321-323
24. Noetzli, Murial., Ansermot, Nicolas., Dobrinas, Maria., Eap, Chin B. (2012). Simultaneous determination of antidementia drugs in human

- plasma: Procedure transfer from HPLC-MS to UPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* **64-65**, 16-25
25. Wu, Yan., Li, Hualong., Mi, Yaxian., Wen, Aidong., Yang, Lin. (2009). Study of pharmacokinetic and bioequivalence of galantamine hydrobromide orally disintegrating tablets in human. *Zhongguo Yaoshi (Beijing, China)* **23(1)**, 29-32
26. Lei, Min., Hang, Tai-jun., Song, Min., Wang, Shung., Zhang, Yin-di., Zahng, Jin-song. (2008). Determination of concentration of galanthamine hydrobromide in Chinese healthy volunteers by LC-MS/MS and study on its bioequivalence. *Yaoxue Jinzhan* **32(1)**, 33-37
27. Zhou, Minghao., Su, Lei. (2008). RP-HPLC determination of related substances in galanthamine hydrobromide. *Yaowu Fenxi Zazhi* **28(3)**, 466-469
28. Suresh P.s., Mullangi, Ramesh., Sukumaran, Sathesh Kumar. (2014). Highly Sensitive LC-MS/MS Method for determination of galantamine in rat plasma: application to pharmacokinetic studies in rats. *Biomedical Chromatography*, **28**, 1633-1640
29. Noetzli, M., Choong, E., Ansermot, N. (2011). Simultaneous determination of antidementia drugs by HPLC-MS: validation data of the method and plasma level determinations in 300 patients. *Therapeutic Drug Monitoring*, **33**, 501-501
30. Noetzli, Muriel., Choong, Eva., Ansermot, Nicolas. (2011). Simultaneous Determination of Antidementia Drugs in Human Plasma for Therapeutic Drug Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*, **33**, 227-238
31. Nirogi, R.V.S., Kandikere, V.N., Mudigondo, K. (2007). Quantitative determination of galantamine in human plasma by sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry using loratadine as an internal standard, *Journal of Chromatographic Science*, **45**, 97-103
32. Thevis, M., Wilkens, F., Geyer, H. (2006). Determination of therapeutics with growth-hormone secretagogue activity in human urine for doping

- control purposes, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20**, 3393-3402
33. Verhaeghe, T., Diels, L., de Vries, R. (2003). Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of galantamine in human heparinised plasma. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **789**, 337-346
34. Cuartero, Maria., Soledad Garcia, Maria., Garcia-Canovas, Francisco. New approach for the potentiometric-enzymatic assay of reversible-competitive enzyme inhibitors. Application to acetylcholinesterase inhibitor galantamine and its determination in pharmaceuticals and human urine. *Talanta*, **110**, 8-14
35. Wikipedia/ www.wikipedia.com/DansylChloride
36. Aydogmus, Z., Sari, F., Ulu Tatar, S. (2012). Spectrofluorimetric Determination of Aliskiren in Tablets and Spiked Human Plasma through Derivatization with Dansyl Chloride. *Journal of Fluorescence* **22**, 549-556
37. Karasakal, A., Ulu Tatar, S. (2014). New Spectrofluorimetric Method for the Determination of Nizatidine in Bulk Form and in Pharmaceutical Preparations. *Optics and Spectroscopy* **115**, 306-309
38. Karasakal, A., Ulu Tatar, S. (2014). Development and validation of a sensitive spectrofluorimetric method for the determination of amoxapine in human plasma and urine. *Luminescence* **3**, 284-287
39. Abd El-Ghaffar, M.E., El-Wasseef, D.R., El-Sherbiny, D.T. (2011) Spectrofluorimetric Determination of Two beta-Agonist Drugs in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms via Derivatization with Dansyl Chloride. *Journal of Analytical Chemistry* **66**, 476-481

40. Aksamija A., Mathe C., Vieillescazes C. (2012). Liquid chromatography of triterpenic resins after derivatization with dansyl chloride. *Journal of Liquid Chromatography&Related Technologies* **35**, 1222-1237
41. Higashi Y., Sakata M., Nakamura S.(2008). Simultaneous determination of N-dealkylated metabolites of four butyrophenone-type agents by HPLC with fluorescence detection after pre-column derivatization with dansyl chloride. *Journal of Liquid Chromatography& Related Technologies* **31**, 2762-2770
42. Wang Y., Kang Xue-J., Ge Wei-H. (2007). Simple, rapid, and accurate RP-HPLC method for determination of cystine in human urine after derivatization with dansyl chloride. *Chromatographia* **65**, 527-532
43. Romero L., Keunchkarian S., Reta M. (2006). Extraction of biogenic amines and their dansyl derivatives with reverse microemulsions of bis [2-ethylhexyl] sulphosuccinate (AOT) prior to high-performance liquid chromatographic determination. *Analytica Chimica Acta* **565**, 136-144
44. Higashi, Y., Fujii, Y., (2004). Sensitive determination of the binding of antidepressants to synthetic melanin by liquid chromatography after pre-column derivatization with dansyl chloride. *Journal of Liquid Chromatography&Related Technologies* **27**, 1903-1914
45. Dugo, G., Vilasi, F., La Torre G.L., (2006) Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines. *Food Chemistry* **95**, 672-676
46. Lamshoeft, M., Grobe, N., Spiteller M. (2011). Picomolar concentrations of morphine in human urine determined by dansyl derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science* **879**, 933-937
47. Gong, Y., Yip S., Chung, Thamarai Sennappan, K. (2007). Trace analysis of icariin in human serum with dansyl chloride derivatization after oral administration of Epimedium decoction by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*

B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science **860**, 166-172

48. Beach Daniel, G., Liu H., Quilliam Michael, A. (2015). Sensitive determination of domoic acid in mussel tissue using dansyl chloride derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Methods* **7**, 1000-1007
49. Yao, L., Yang, J., Liu, B. (2014). Development of a sensitive method for the quantification of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene by solid phase extraction, dansyl chloride derivatization and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *Analytical Methods* **6**, 6488-6493
50. Nirogi, R., Komarneni, P., Kandikere, V. (2013). A sensitive and selective quantification of catecholamine neurotransmitters in rat microdialysates by pre-column dansyl chloride derivatization using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science* **913**, 41-47
51. Dillen, L., Sips, Luc., de Vries, R. (2013). Quantitative LC-MS/MS analysis of azide and azidoalanine in in vitro samples following derivatisation with dansyl chloride. *Analytical Methods* **5**, 3136-3141
52. Salomonsson, Matilda, L., Hansson, A., (2013). Development and in-house validation of a method for quantification of BMAA in mussels using dansyl chloride derivatization and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Methods* **5**, 4865-4874
53. Wang, He-X., Zhou, Y., Jiang, Qing-W. (2013). Enhanced screening efficiency for endocrine-disrupting chemicals in milk and powdered milk using UPLC/QTOF-MS by the introduction of dansyl chloride derivatisation. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* **30**, 166-180
54. Lin, H., Tian Y., Zhang, Z. (2010). Quantification of piperazine phosphate in human plasma by high-performance liquid

- chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry employing precolumn derivatization with dansyl chloride. *Analytica Chimica Acta* **664**, 40-48
55. Beaudry, F., Ross, A., Vachon, P. (2007). Development of a LC-ESI/MS/MS assay for the quantification of vanillin using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Biomedicalchromatography* **21**, 113-115
56. Beaudry, F., Guenette, S.A., Winterborn A. (2005). Development of a rapid and sensitive LC-ESI/MS/MS assay for the quantification of propofol using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Journal of Pharmacetucal and Biomedical Analysis* **39**, 411-417
57. Beaudry, F., Guenette Sarah, A., Vachon P. (2006). Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Biomedical Chromatography* **20**, 1216-1222
58. Maraschiello, C., Miranda, E., Millan, E. (2003). Phenylisothiocyanate and dansyl chloride precolumn derivatizations for the high-performance liquid chromatography analysis of the antitumoral agent ES-285 in dog plasma. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sicence* **791**, 1-11
59. Kwakman, P.J.M., Kamminga, D.A., Brinkman, U.A.Th., de Jong, G.J. (1991). Liquid chromatographic determination of oestradiol in serum by pre-column derivatization with dansyl chloride or laryl chloride and peroxyoxalate chemiluminescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **9**, 753-759
60. Zhi, W., Hongda, X., Chengguang, F. (1992). Sensitive fluorescence detection of some nitrosamines by precolumn derivatization with dansyl chloride and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **589**, 349-352

61. Ramakrishna, N., Prashanth K., Vishwottam K., Rajeshkumar, B. (2013). A sensitive and selective quantification of catecholamine neurotransmitters in rat microdialysis by pre-column dansyl chloride derivatization using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **7**, 913–914
62. Wang, T.K., Fuh M.S. (1996). Determination of amphetamine in human urine by dansyl derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **686**, 285-290
63. Peter, C., Larry G., Rushing, G.D., Newport, J., Bowyer, F. (1997). Determination of D-fenfluramine, D-norfenfluramine and fluoxetine in plasma, brain tissue and brain microdialysis using high performance liquid chromatography after pre column derivatization with dansyl chloride. *Journal of Chromatography B* **692**, 419-426
64. Mardiana, S., Bahruddin, S., Abdussalam Salhin, M., Muhammad Idiris, S., Chanbasha B., Hian Kee, L. (2009). In situ derivatization hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of biogenic amines in food samples. *Journal of Chromatography A* **1216**, 5165–5170
65. Hua-Lin, C., Rong-Hua, Z., Huan-De, L., Jun, Z., Lan-Fang, L. (2011). MultiSimplex optimization of chromatographic separation and dansyl derivatization conditions in the ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of risperidone, 9-hydroxyrisperidone, monoamine and amino acid neurotransmitters in human urine. *Journal of Chromatography B* **879**, 1993– 1999
66. Xuejun, K., Jing, X., Xiao H., Zhongze, G. (2006). Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. *Clinica Chimica Acta* **366**, 352 – 356
67. Maraschielloa, C., Mirandab, E., Milla'n, E., Florianob, P., Vilageliu, J. (2003). Phenylisothiocyanate and dansyl chloride precolumn derivatizationfor the high-performance liquid chromatography analysis

- of the antitumoral agent ES-285 in dog plasma. *Journal of Chromatography B* **791**, 1–11
68. Marc, L., Nadja, G., Michael, S. (2011). Picomolar concentrations of morphine in human urine determined by dansyl derivatization and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **879**, 933–937
69. Huguet, C., Fred A., Harold, C. (1995). Sensitive fluorescence detection of robenidine by derivatization with dansyl chloride and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **694**, 407-413
70. Mahmoud, A. O., Osama, H. A., Sayed, M. D., Tamer, Z. A. (2014). Spectrofluorimetric protocol for antidepressant drugs in dosage forms and human plasma through derivatization with dansyl chloride. *Arabian Journal of Chemistry Note to users: Corrected proofs*.
71. Wei, D., Yande, H., Scott A. M., Mark, S. B. (2015). Trace level liquid chromatography tandem mass spectrometry quantification of the mutagenic impurity 2-hydroxypyridine N-oxide as its dansyl derivative. *Journal of Chromatography A* **1386**, 47–52
72. International Conference on Harmonization (2005) ICH Guideline, Q2(R1) Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology, London, UK
73. European Pharmacopoeia/8.Edition/*Volume 1*,72-79
74. USP Pharma pharmacopoeia/ *XXXII Edition/ Volume 34(6)*, 1452

ETİK KURUL KARARI



Sayı: B.30.2.İST.0.30.90.00/ 35452
Konu:

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi Dekanlığına



İstanbul/...../.....

11 Aralık 2012

İLGİ: 22.11.2012 tarihli, 1353 sayılı yazınıza;

Fakülteniz Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Sevgi ULU'nun danışmanlığında Doktora Öğrencisi Elif Kel ÖZDEMİR'in yürütücülüğünde "Galantaminin Biyolojik Sıvılarda Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi" başlıklı Doktora Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 04 Aralık 2012 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.
Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim.

Eki:
1 dosya

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ
Dekan Yardımcısı
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Not: Yanıtlarımızda yazımızın gün ve sayısının belirtilmesi rica olunur.
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/İSTANBUL
Telefon 0 (212) 414 32 52 Dahili: 22300 Faks: 0(212) 632 00 40 e-posta:etfetik@istanbul.edu.tr.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ELİF	Soyadı	ÖZDEMİR
Doğ.Yeri	ÜMRANİYE	Doğ.Tar.	25.10.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	22603212604
Email	elif.ozdemir@yeniuyuzyl.edu.tr	Tel	5414534515

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	<u>İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya</u>	2007-2010
Lisans	<u>İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya</u>	2003-2007
Lise	Habire Yahşi Lisesi	1998-2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi	2014-
2.	Servis Müdürü	Yiğit Gıda A.Ş.	2011-2012
3.	Mesul Müdür	İpekpınar Doğal Kaynak Suları	2008-2010

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	70	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office,	orta
Kromatografi	orta

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Sevgi Tatar Ulu, Elif Kel, Sensitive Spectrofluorimetric Method of Analysis for Gabapentin in Pure and Pharmaceutical Preparations, Chinese Journal of Chemistry Volume 29, Issue 3, pages 562–566, March, 2011

2. Ulu, Sevgi Tatar; Kel, Elif, Highly Sensitive Determination and Validation of Gabapentin in Pharmaceutical Preparations by HPLC with 4-Fluoro-7-Nitrobenzofurazan Derivatization and Fluorescence Detection, Journal of Chromatographic Science, Volume 49, Number 6, July 2011 , pp. 417-421(5)
3. Sevgi Tatar Ulu and Elif Kel, Spectrophotometric Determination of Bisoprolol in Pharmaceutical Preparations by Charge Transfer Reactions, Optics and Spectroscopy, 2012, Vol. 112, No. 6, pp. 864–867.
4. E. Kel Özdemir, Sevgi Tatar Ulu, D.Özer Ünal, Spectrophotometric Determination of Mirtazapine in Pure and Tablet Pharmaceutical Preparation, İstanbul Eczacılık Fakültesi Dergisi/J. Fac. Pharm. İstanbul, 42(2) 2012 s. 77-82

Sertifikalar:

ISO 9001–2000 Kalite Yönetim Eğitimi ve Sertifika Eğitimi (2007)
(Kimyagerler Derneği)

ISO 9001 – 2000 Kalite Yönetim Sistemi İç Tetkik Eğitimi ve Sertifika Eğitimi (2008) (Kimya Mühendisleri Odası)

Örnek Hazırlama Teknikleri ve Uygulamaları Sertifika Programı (2012)
(İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi)

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kitap okumak, Seyahat etmek, Bisiklete binmek.