

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

GHB VE BAZI BARBİTÜRAT TÜREVLERİNİN HPLC-UV-DAD İLE
EŞZAMANLI TAYİNİ

Proje No: TSA-08-556

Proje Türü

Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. İbrahim NARİN
Eczacılık Fakültesi/Analitik Kimya

Yrd. Doç. Dr. Beril ANILANMERT
Eczacılık Fakültesi/Analitik Kimya

Mart 2015

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

Özet	3
Abstract	4
1.Giriş	5
2. Genel Bilgiler	5
2.1.Kromatografi ve Temel Kavramlar	7
2.1.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	7
2.1.2.HPLC’de Hareketli Faz	8
2.1.3.HPLC’de Kolonlar	8
2.1.4.HPLC’de Dedektörler	8
3.Materyal ve Metot	9
3.1.Çözeltilerin Hazırlanması	9
3.2. Yöntemin Validasyonu	11
3.2.1.Kararlılık	11
3.2.2.Doğrusallık	11
3.2.3.Duyarlılık (LOD/LOQ)	11
3.2.4.Seçicilik	12
4. Sonuç	12
Kaynaklar	13

ÖZET

GHB ve barbitüratlar, suistimali olan maddeler olması sebebiyle Adli Eczacılık açısından önem taşımaktadır. Son yıllarda, uyuşturucu madde bağımlıları arasında GHB ve barbitüratların birlikte kullanımının da zaman zaman ortaya çıktığı adli uzmanlar tarafından rapor edilmektedir. Söz konusu maddelerin bir arada kullanıldığı durumları ortaya çıkarabilecek bir tayin yöntemi henüz geliştirilmemiştir. Çalışmanın amacı, GHB ve barbitüratların HPLC-UV DAD ile yan yana ayrımının ve miktar tayininin gerçekleştirilmesidir. HPLC, hastanelerde ve tayin laboratuvarlarında LC-MS ve GC-MS'ten daha fazla sıklıkla bulunması ve daha ucuz bir alet olması sebebiyle önemlidir. HPLC'de böyle bir tayin yönteminin bulunmuş olması, gerek GHB ve barbitüratların kombine istismarının, gerekse bu iki türün birlikte kullanılmasına bağlı ölüm sebeplerinin ortaya çıkarılması açısından önemli olacaktır.

Bu çalışmada GHB (γ -hidroxybutyrate), GBL, norketamin, ketamin, fenobarbital, fenitoin ve tiyopental olmak üzere potansiyel ilaçlı suçlarda kullanılan 7 ilacın hızlı hassas ve ekonomik olarak tayini yapılmıştır. Metotta örnek hazırlanmaksızın 12 dakika elüsyon zamanında iyi bir kromatografik ayırma yapılmıştır. Ayırma işlemi Phenomenex Onyx 100x4,6 mm C18 monolitik kolonda 215 ve 237 nm. UV dalga boyunda yapılmıştır. Tüm R^2 değerleri 0.99'dan büyük olup lineer olarak 0.9964 – 1.0000 arasında değişmektedir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2.88- 21.34 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ve 8.21 - 64.67 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik % 7,35'ten küçüktür.

Anahtar kelimeler: GHB, Barbitüratlar, HPLC, Validasyon.

Destekleyen Kurumlar: E.Ü. B.A.P. Araştırma Projesi (TSA-08-556)

ABSTRACT

GHB and barbiturates, due to abuse substances that are important in terms of Forensic Medicine. In recent years, drug addicts among the co-use of GHB and barbiturates that arise from time to time is reported by forensic experts. A combination of said article which can be revealed by the use determination method has not been developed. Study, GHB and separation of barbiturates juxtaposed with DAD and HPLC-UV assay is carried out. HPLC assay laboratories in hospitals and LC-MS and GC-MS more often than not and it is important because it is cheaper than a tool. Having found such a detection method in HPLC of the combined abuse of GHB and barbiturates, as well as the combined use of these two types depending on the detection of the cause of death will be important.

In this study; an easy, fast, precise and economical simultaneous determination of 7 drugs, GHB (γ -hidroxybutyrate), GBL, norketamine, ketamine, fenobarbital, fenitoin and thiopental which have the potential to be used in drug-facilitated crimes was performed. The method required no sample preparation and has 12 minutes elution time with a good chromatographic separation. The separation was carried out on a Phenomenex Onyx 100x4,6 mm C18 monolithic column with UV detection at 215 and 237 nm. All R^2 values were ≥ 0.99 and the linear ranges were between 0.9964 – 1.0000. The LOD and LOQ values were between 2.88- 21.34 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 8.21 - 64.67 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. The repeatability values were $\leq 7.35\%$.

Keywords: GHB, Barbiturates, HPLC, Validation.

Supported by: E.Ü. B.A.P. Research Project (TSA-08-556)

1. GİRİŞ

Bu çalışmada, adli eczacılıkta önemli olan ve birlikte kullanımları adli bilimciler tarafından yeni yeni rapor edilmekte olan GHB (γ -hidroksibutirat), hexobarbital ve amobarbital adlı barbitürat türevlerine ilişkin, UV DAD dedektör sistemli HPLC eşzamanlı bir tayin yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Literatür çalışmalarında bu üç maddenin tek tek analizleriyle ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte, eşzamanlı tayinine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

GHB (γ -hidroksibutirat), GABA (γ -aminobutirik asit)'in bir endojen metabolitidir [1]. Son birkaç yıldır, kulüplere giden uyuşturucu kullanıcıları arasında “sıvı ecstasy” adıyla popülerlik kazanmış olup, öfori ve seksüel gücü arttırmak için kullanılmaktadır [1,2]. Hipnotik veya kas geliştirici olarak ta kullanılmaktadır [3]. Bu sebeple kontrollü maddeler sınıfında yer almaktadır. Proseksüel etkilerinin yanında, ilaçla gerçekleştirilen tecavüz olgularında da kullanımına rastlanmıştır. Bu maddeden zehirlenenler arasında ölüm olguları da bulunmaktadır. Alındıktan sonra hızla metabolize olan GHB'nin yarılanma ömrü, doza bağlı olarak 20-35 dk'dır [1]. Yaşayan organizmanın kanından 6 saatte temizlenmekte olup, idrardaki GHB konsantrasyonları, kandakinin 10 katı oranındadır. Bu sebeple idrarda 12 saate kadar tayin edilebilmektedir. Vücutta normalde GHB düşük konsantrasyonlarda mevcut olup, dışarıdan alınmadığı durumlarda idrarda 10 $\mu\text{g/mL}$ 'nin altındaki konsantrasyonlarda bulunduğundan, tayinlerde tayin limiti 10 $\mu\text{g/mL}$ 'nin altında yanlış pozitif sonuç verecektir. Bu sebeple idrarda GHB tayini için inilmesi uygun olan tayin limiti 10 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Kanda ise önerilen eşik değeri 5 $\mu\text{g/mL}$ 'dir [4].

Barbitüratlar 5,5-disüstitüe barbitürik asit türevleri olup [5], sedatif hipnotik etkileri oldukça iyi bilinen ve bağımlılık yapıcı, yeşil reçeteye tabi bir ilaç grubudur. Bağımlılar, normalde bağımlı olmayan bir kişide akut toksisite meydana getirebilecek dozları tolere edebilmektedirler. Amobarbital, ayrıca, sıklıkla hayvan besin maddelerinin içine ilave edilerek istismar edilmektedir [6]. Dünyada barbitüratların hayvan yemlerine ve içme sularına katılmasını yasaklayan bazı yasal düzenlemeler getirilmiş bulunmaktadır.

GHB ile barbitüratların birlikte kullanımı intihar ve ölüm olgularında da önem taşımaktadır. HPLC'de böyle bir tayin yönteminin bulunması, gerek GHB ve barbitüratların kombine istismarının, gerekse bu iki türün birlikte kullanılmasına bağlı ölüm sebeplerinin ortaya çıkarılması açısından önemli olacaktır. Düşük molekül ağırlığı, yüksek polaritesi ve termal instabiliteleri nedeniyle GHB'nin GC-MS'te direkt analizinden ziyade, analiz öncesi türevlendirilmesi ya da GHB'nin GBL'ye dönüştürülmesi söz konusu olup analiz öncesi türevlendirilerek ya da GHB'nin GBL'ye dönüştürülmesi ile tayin edilmektedir. [1, 3]. Henüz GHB ve prekürsörlerine ilişkin hızlı bir tayin yöntemi rutin olarak uygulanmadığından, hastanelerde ve adli laboratuvarlarda GHB kullanan olgular atlanabilmektedir. HPLC, toksikoloji laboratuvarlarında sık kullanılan bir enstrüman olup, GHB (γ -hidroksibutirat) ve prekürsörü olan GBL (γ -butirolakton) un ayrılması ve tayidi için basit ve hızlı bir analitik yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır [7]. LC-MS ve GC-MS aletlerinin bulunmadığı laboratuvarlarda HPLC ile yapılan farmakokinetik amaçlı analizlerinin toplam giderlerinin düşük olması, HPLC'yi LC-MS ve GC-MS'e karşı çekici bir alternatif haline getirmektedir [8].

De Vriendt ve ark. [8], rat plazmasında HPLC yöntemi ve 220 nm’de UV deteksiyon ile γ -hidroksibutirik asit (GHB) için tayin yöntemi geliştirmişlerdir. GHB plazmadan kuvvetli anyon değiştirici SPE kolonlarla izole edilmiştir. Sabit faz olarak C18 Aqua kolon ve mobil faz olarak KH_2PO_4 (20 mM) kullanılmıştır. Çalışmada tayin limiti 10 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Kaufmann ve Alt ise GHB’yi n-butil ester türevine dönüştürmüş, gradient sistem kullanarak LC-MS ile idrar ve serumda tayin etmişlerdir [2]. Gradient elüsyonda mobil faz olarak amonyum formatın 5 mM’lık sulu çözeltisi ve aynı çözeltinin asetonitril ile karışımı kullanılmıştır. İdrarda 2,4 $\mu\text{g/mL}$, serumda ise 0,6 $\mu\text{g/mL}$ tayin limitine kadar inilmiştir. Fung ve ark. [3], tarafından 2004 yılında geliştirilen bir tayin yönteminde; kuvvetli anyon değiştirici SPE kartuşlarla biyolojik örneklerden GHB çekiltilenerek, %90 5 mM formik asit : %10 asetonitril karışımından oluşan mobil faz ve C18 kolon yardımıyla LC-MS’te tayin edilmiştir. Tayin limiti 0.1 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. 2004 yılında yapılan bir çalışmada ise [1], GHB ve prekürsörlerinin idrardaki tayinleri LC-MS-MS ile gerçekleştirilmiş olup, GHB, idrardan SPE yöntemi ile ayrıldıktan sonra C18 kolona verilmiş, elüsyon 0,1%’lik sulu formik asit çözeltisi:metanol (90:10) karışımı kullanılarak, 35°C’de gerçekleştirilmiştir. Çalışmada geri kazanımlar %90-107 arasında değişmektedir. Söz konusu çalışmada 1 $\mu\text{g/mL}$ tayin limitine kadar inilebilmiş olmasına karşın yazarlar; dışarıdan GHB alımı olmadığı durumda, idrardaki endojen GHB konsantrasyonlarının 10 $\mu\text{g/mL}$ ’ın altında kaldığını ve bu sebeple GHB tarama ve doğrulama testlerinde eşik konsantrasyonun 10 $\mu\text{g/mL}$ olarak alınmasının genel bir konsensus olduğunu vurgulamaktadırlar. Biyolojik ve adli örneklerde GC-MS ile GHB tayini, düşük molekül ağırlıklarından, yüksek polaritelerinden ve termal kararsızlıklarından dolayı GC ile analiz öncesi türevlendirme veya modifikasyon gerektirmektedir. Bu yaklaşımlardan biri de GHB’yi prekürsörü GBL’ye dönüştürmektir. Bu yöntem GHB’ye seçiciliği engelleyen bir durumdur. HPLC ise GHB ve prekürsörü GBL’nin ayrılması ve doğrulanması için basit ve hızlı bir analitik yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır [7]. HPLC’nin en büyük avantajı, hem serbest asit, hem de lakton türlerinin bir arada deteksiyonunun mümkün olabilmesi ve bu şekilde GHB ve GBL çözeltilerinin doğrudan bir arada analizine imkan vermesidir. Mercer ve ark [7], GHB’yi ve onun 5-karbon analogu olan GHV (γ -hidroksivalerat) adlı psikotrop maddeyi, sıvı-sıvı ekstraksiyon ile çekitleyerek çeşitli meşrubatlarda GC/MS ve HPLC ile karşılaştırmalı analizlerini gerçekleştirmiştir. GC/MS’te gerçekleştirilen analizde türevlendirme ajanı olarak ve trimetilklorosilanlı N,O-bis(trimetilsilil)trifloro-asetimid kullanılmıştır. HPLC UV/VIS yönteminde ise maddelerin 254 nm’de doğrudan analizleri yapılmıştır. Kullanılan HPLC yönteminde maddeler C18 kolonda, 80:20 (v/v) oranında fosforik asit ile pH’sı 3,0’e ayarlanmış olan 10 mM KH_2PO_4 çözeltisi ve metanol karışımında ayrılmış ve tayin edilmiştir. HPLC-UV/VIS yöntemi ile tayin limiti 10 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Çalışmamıza esas olacak makalelerden biri de söz konusu çalışmadır.

Zacharis ve ark. [9], GHB’yi 4-bromometil-7-metoksi kumarin ile dibenzo-18-taç-6-eter katalizörlüğünde, 70°C’de 70 dk’da türevlendirdikten sonra serebrospinal sıvı ve tükürükte, HPLC ve floresans detektörle tayin etmişlerdir. Türevlendirme ile maddeye floresan özellik kazandırılmış ve bu şekilde tayin limiti $2,4 \times 10^{-6}$ M’a kadar düşürülmüştür. Ayırma, pH=3’e gelinceye kadar H_3PO_4 ilave edilmiş 40 mM fosfat tamponunun, metanol ile farklı oranlarda karıştırılması suretiyle, 25 dk süren bir gradient elüsyon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gradient elüsyonda, başta metanol oranı %35 iken, 25 dk’nın sonunda %80’e çıkarılmıştır. Yöntemdeki türevlendirme işlemi zahmetli olup toksikolojik analizlerde yeterli görülen eşik limiti olan 10 $\mu\text{g/mL}$ ’ye daha sade bir yöntemle inilebilir ve söz konusu çalışmadaki gradient elüsyon yerine izokratik bir elüsyonla daha basit bir tayin gerçekleştirilebilir.

Drummer ve ark. [10], 1993'te bazı barbitüratların, NSAİ'lar, diüretikler, sülfonil üreler ve antikoagülanlar ile eşzamanlı tayinini HPLC UV-DAD ile gerçekleştirmişlerdir. Ayırma C18 kolon asetonitril:fosfat tamponu karışımı ve gradiyent elüsyon kullanılarak sağlanmıştır. Çalışmada geri kazanımlar %45-100 arasında değişmektedir. 1997'de yapılan bir çalışmada [11], barbitüratlar için yine HPLC-UV kullanılmış, maddeler 30:70 (v/v) 8µM fosfat tamponu:asetonitril karışımında TSK jel Süper ODS kolonda ayrılmış ve 215 nm'de gözlenmiştir. Wang ve ark. [12], barbital ve fenobarbital için insan idrarında kapiller elektroforezle 214 nm'de tayin yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz, Glisin-NaOH (pH=11) ve Glisin-HCl (pH=5,5) tamponları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnternal standart olarak sekobarbital kullanılmıştır. Barbital için 0,32 µg/mL, fenobarbital için 0,87 µg/mL tayin limiti bulunmuştur. Zhao ve ark. [6] GC/MS/MS ile ion trap MSD kullanarak domuzda barbital, amobarbital ve fenobarbital kalıntıları için hızlı tarama ve teyit analizleri geliştirmişlerdir. Domuzdaki barbitürat kalıntıları ultrasonik ekstraksiyonla çekitlenip, çoklu duvarlı karbon nanotüp dolgu maddesi içeren SPE kartuşlarında temizlenme işleminin ardından mikrodalga ışın altında CH₃I ile türevlendirilmiştir. Geri kazanımlar %75-96 arasında olup 0,5 µg/kg tayin limitine ulaşılmıştır.

Bu çalışmada, öncelikle madde kullanılarak işlenen cinsel saldırı suçlarında birlikte kullanılabilen GHB ve barbitüratların sulu çözeltide HPLC-DAD yöntemi ile birbirinden ayrılması ve tayin edilmesi için yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2.1.Kromatografi ve Temel Kavramlar

Kromatografi (chroma-renk, ve graphein-yazma anlamına gelmektedir) terimi ilk defa 1906 tarihinde Rus kimyacı ve botanikçi olan Michael Tswett (Mikhail Semenovich Tswett, 1872-1919) tarafından kullanılmıştır. Kromatografi alanında da ilk Nobel ödülü Tiselius (İsveç), Martin ve Synge'ne (İngiltere) verilmiştir.

Kromatografi, gaz veya sıvı haldeki hareketli fazda bulunan karışımdaki bileşenlerin, durgun fazdan geçme hızlarına bağlı olarak ayrıldıkları bir yöntemdir. IUPAC tarafından 1993 te yapılan tanıma göre, kromatografi, biri hareketli diğeri sabit olan iki faz arasında dağılmış bileşenlerin ayrılmasında kullanılan fiziksel bir metoddur.

Kromatografide bazı temel kavramlar vardır. Bunlardan en çok kullanılanları durgun faz, hareketli faz, alıkonma zamanı ve kolon ayırma gücüdür. Bir kolon içinde veya düz bir yüzeyde tutturulmuş faza durgun faz, durgun fazın üzerinden veya arasından geçen ve analiti de içeren faza da hareketli faz denir. Numune enjeksiyonundan sonra, analit pikinin dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı denir ve *t_R* ile gösterilir. Kolon ayırma gücü (*R_s*), kolonun iki analiti ayrılabilmesinin kantitatif bir ölçüsüdür.

2.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi polar, uçucu olmayan türler, termal yönden kararsız ve yüksek molekül kütesine (54'ten 450.000 daltona kadar) sahip bileşikler için tercih edilen bir ayırma tekniğidir.

Modern sıvı kromatografi sistemlerinde tanecik boyutu 2-10 µm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, özel pompa sistemleri kullanmak gerekir. Yüksek basınçlardaki sistem gereksinimleri HPLC cihazının gelişimiyle sağlanmıştır.

2.1.2. HPLC’de Hareketli Faz

HPLC’de kullanılacak hareketli faz, durgun fazla etkileşime girmeyecek, hızlı ve ekili ayırma yapabilecek özellikte olmalıdır. Hareketli faz, alıkonma zamanını etkileyen bir parametredir. Polaritesi düşük olan hareketli fazlar alıkonma süresini uzatabilmektedir.

Sıvı kromatografisindeki en büyük zorluk, uygun hareketli fazın seçimi ve deneysel Çartların optimizasyonudur. Sıvı-sıvı kromatografide hareketli faz apolariten durgun faz polardır. Sıvı-katı kromatografide bu durum tam tersidir. Dolayısıyla iki yöntemin uygulanmasında farklı hareketli faz ya da faz karışım oranları tercih edilir.

HPLC’de tek bir hareketli faz kullanmak suretiyle yapılan ayırmaya izokratik elüsyon, analiz sırasında hareketli fazın bileşiminde değişiklik yapılmasına gradient elüsyon adı verilir. Elüsyonda pH, polarite ve iyonik kuvvetlerin değiştirilmesi ile analiz süresi kısaltılabilir ya da ayırıcılık daha iyi hale getirilebilir. Hareketli fazda kullanılan çözücülerin birbirleri içinde karışabilir olması gerektiği unutulmaması gereken önemli bir noktadır.

2.1.3. HPLC’de Kolonlar

HPLC kolonları çoğunlukla, kimyasal korozyona karşı inert (özellikle düşük pH’larda klor ve lityum iyonları) ve HPLC basıncına dirençli paslanmaz çelik borulardan imal edilir. Analitik amaçlar için kullanılan kolonların iç çapları genellikle 2-5 mm’dir. Preparatif amaçlar içinse 10-25.4 mm arasında değişmektedir. Şayet 10 µm ya da daha düşük mikropartikül durgun faz kullanılıyorsa kolon uzunlukları 5, 10, 15 ya da 25 cm gibi boyutlarda olabilir.

HPLC’de kullanılan en yaygın kolon dolgu maddeleri silikat esaslıdır. Silika esaslı maddeler doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi bir katı yüzeyine film halinde kaplanabilir. Silika esaslı kolonların dezavantajı çalışma pH aralığının dar olmasıdır. Bu amaçla da alümina, polimer ve poröz grafit esaslı destek maddeleri de dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır.

2.1.4. HPLC’de Dedektörler

İdeal bir HPLC dedektörü yüksek duyarlılık, kararlı ve tekrarlanabilirliği iyi, sıcaklık ve basınç değişimlerine duyarsız, akış hızından bağımsız hızlı cevap verebilme, bant genişletme etkisi küçük, güvenilir ve kullanımı kolay olması gibi özelliklere sahip olmalıdır.

Sıvı kromatografide dedektörler temel olarak iki tiptir. Yığın özelliği dedektörleri, hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi, analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap veren dedektörlerdir. Analit özelliği dedektör tipi ise, analitin UV absorbansı, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı, bazı özelliklere cevap veren dedektörlerdir (Skoog ve diğ., 1998). Analit özelliği dedektörleri şunlardır; ultraviyole dedektörler (UV), fotodiyot ışın demeti dedektörleri (DAD), floresans dedektörler (FD), infrared dedektörler (IR), elektrokimyasal dedektörler, iletkenlik dedektörleri, refraktif indeks dedektörleri (RID), buharlaştırmalı ışık saçma dedektörleri, radyoaktif dedektörler ve kütle spektrometre dedektörleridir (MS).

3. MATERYAL VE METOT

Fenobarbital, tiyopental, ketamin ve norketamin standartları SIGMA şirketinden, HPLC saflıkta metanol, asetonitril, analitik saflıkta Na_2HPO_4 ve H_3PO_4 ise MERCK'ten alınmıştır. GHB, analitik saflıktaki GBL prekürsöründen faydalanılarak laboratuvar koşullarında sentezlenmiştir. Maddenin saflığını artırmak için tekrar kristallendirilmiş ve HPLC cihazı ile kontrol edilmiştir. Proje önerisinde barbitürat türevlerinden amobarbital ve hexobarbital tayin edileceği yazılmış olmakla birlikte, bunların referans standartlarına ulaşmak çok zor olduğu için, bunların yerine, Türkiye'de kullanımına en sık rastlanan fenobarbital ve tiyopental temin edilmiş ve barbitürat türevleri olarak bu iki madde kullanılmıştır. Bunlara ek olarak, ilaç ile işlenilen cinsel saldırı suçlarında kullanılan başka bir madde olan ketamin ve onun metaboliti olan norketamin standartları ve adli analizlerde barbitüratların yanında sıklıkla çıkan fenitoin maddesi de temin edilmiştir. Dolayısıyla çalışmada tayin edilecek analit sayısı 7'ye çıkarılmıştır.

Çalışmada Agilent 1200 marka Diyot Array UV-Vis Dedektörlü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazı kullanılmıştır. Sabit faz kolonu olarak Onyx C8 monolitik ters faz kolonu (100 mm x 4,6 mm) kullanılmıştır. Deiyonize su Millipore Elix 5 marka ultra saf su cihazından elde edilmiştir. Süzme işlemlerinde Sartorius marka vakum süzme seti ve Millipore marka selüloz asetat filtre(0,45 μm)'den faydalanılmıştır. Analitik tartım işlemleri 0,1 mg duyarlıklı Ohaus marka analitik terazide yapılmıştır. Bandelin, Sonerex marka Ultrasonik su banyosu ve pH ölçümleri için WTW Inolab pH720 marka cam elektrotlu pH metre kullanılmıştır.

3.1. Çözeltilerin Hazırlanması

GHB'den 75,0 mg diğer analitlerden ise 50,0'şer mg tartılıp 10 mL metanol ile çözüldükten sonra aynı çözücü ile 50,0 mL'ye tamamlanarak sırasıyla 1500 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik stok çözeltiler hazırlanmıştır. Çözeltiler analize kadar 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. İstenilen derişimlerdeki standart çözeltiler, bu stok çözeltilerden hareketli faz ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Kalibrasyon için, GHB, GBL, Ketamin, Norketamin Fenobarbital, Fenitoin ve Tiyopental çözeltileri sırasıyla; 7,5 -1500,0 $\mu\text{g/mL}$, 5-1000 $\mu\text{g/mL}$, 5-1000 $\mu\text{g/mL}$, 5-1000 $\mu\text{g/mL}$, 5-500 $\mu\text{g/mL}$, 2,5-500,0 $\mu\text{g/mL}$, 5-1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralıklarında hazırlanmıştır. Kalibrasyon doğrularının korelasyon katsayısı değerleri(R^2) 0,9990 – 0,9996 arasındadır.

Kromatografik koşulların optimizasyonu için, çalışılan maddelerin HPLC yöntemi ile aynı anda ayrılması için, sabit faz seçimi, hareketli fazın bileşimi, pH'sı ve akış hızının maddelerin kromatografik davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kromatografik sistemin test edilen kromatografik koşullardaki t_0 değerinin saptanması için metanol sisteme enjekte edilmiş ve metanolün alıkonma zamanı t_0 değeri olarak alınmıştır.

Oldukça polar olan GHB molekülünün pKa değeri 4,7 olduğundan, maddenin hemen hemen tamamının noniyonize formda bulunacağı pH=2,7 fosfat tamponu kullanılmıştır. Sabit faz olarak end capping Onyx C8 monolitik kolon kullanılmıştır. Bu pH değerinde, barbitüratlara ve ketamine göre daha polar olan GHB'nin, yine polaritesi C18 den daha yüksek olan C8 duran fazına daha iyi tutunabileceği düşünülmüştür. Diğer maddelerinde pKa değerleri 7,4-8,0 arasında olduğundan pH=2,7'de tamamen iyonize formda elüe yürütölmüşlerdir.

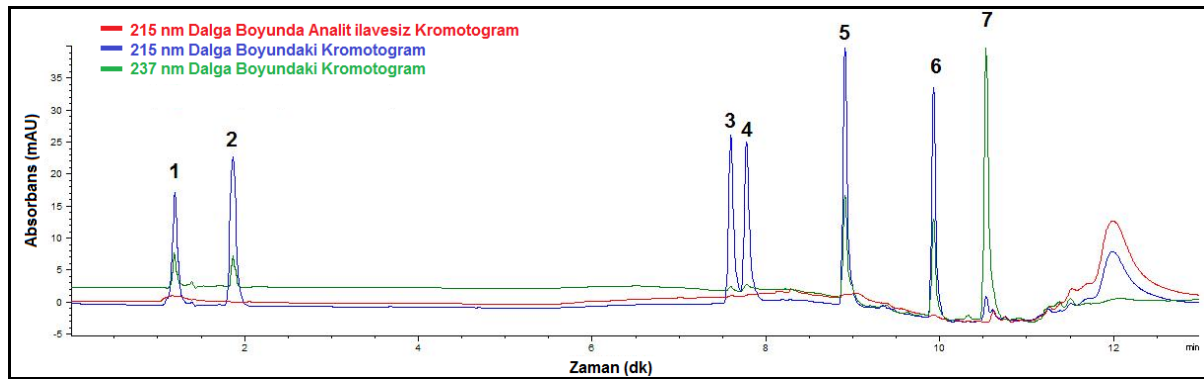
HPLC’de ayırma yöntemi gerçekleştirilirken önce farklı oranlarda metanol:pH=2,7 fosfat tamponu karışımları denenmiş metanol oranı %50-25 arasında, pH=2,7 fosfat tamponu ise %50-75 arasında izokratik ve gradiyent elüsyonlar uygulamak koşuluyla değiştirilerek en uygun mobil faz belirlenmeye çalışılmıştır. Norketamin ve ketamin yapıca birbirine çok yakın olduğundan, metanol:pH=2,7 fosfat tamponu sistemleriyle iyi ayıramamış, yöntem farklı oranlardaki pH=2,7 fosfat tamponu:metanol:asetonitril sistemleriyle optimize edilmeye çalışılmıştır. Optimum mobil faz kompozisyonu ve optimum gradiyent koşullara ulaşınca kadar;

pH=2,7 fosfat tamponu %50-100 arasında,
metanol %0-50 arasında,
asetonitril ise %0-40 arasında değiştirilmiştir.

HPLC ile optimum ayrılmanın elde edildiği gradiyent elüsyon koşulları Tablo 3.1.’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Geliştirilen HPLC Ayırma Yönteminde Analitlerin Eşzamanlı Analizi için Uygulanan Basamaklı Gradient Elüsyon Sistemi.

Süre	Fosfat tamponu (0,05M, pH=2,7)	Metanol	Asetonitril	Akış hızı (mL/dk)
0	90	7	3	1,3
4	90	6	4	1,5
6,5	80	11	9	1,8
10	60	5	35	3,8
11	55	5	40	4,0
12	55	5	40	4,0
13	90	7	3	1,3



Şekil 3.1. 25 µgmL⁻¹ Konsantrasyonlarda GHB (1), GBL (2), norketamin (3), ketamin (4), fenobarbital (5), fenitoin (6) ve tiyopental (7)’in analit ilavesiz kromotograma karşı 215nm ve 237 nm’deki Eşzamanlı Kromotogramları

Geliştirilmiş olan ayırma yönteminde, maddelerin gözlemlendiği dalga boyları ve alıkonma zamanları Tablo 3.2’de belirtilmiştir.

Tablo 3.2. Geliştirilen HPLC Ayırma Yönteminde Analitlerin Çalışılan Dalga Boyları ve Alıkonma Zamanları (n=6)

Analit	Dalgaboyu (nm)	Alıkonma zamanı (dk)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
GHB	215	1.215 (± 0.028)	5.5	16,7
GBL	215	1.889 (± 0.026)	5.6	16,8
Norketamin	215	7.494 (± 0.012)	7.9	24,0
Ketamin	215	7.687 (± 0.033)	21.3	64,7
Fenobarbital	215	8.856 (± 0.018)	2.7	8,2
Fenitoin	215	9.819 (± 0.244)	3.6	10,9
Tiyopental	237	10.570 (± 0.010)	2.9	8,7

$n \leq 95\%$ güven aralığında 3.3 LOD=3,3 LOQ ise 10 olarak hesaplanmıştır.

3.2. Yöntemin Validasyon Çalışmaları

3.2.1. Kararlılık

Tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde etmek için, validasyon çalışmalarının başlangıcında çalışılan maddelerin kararlılığı belirlenmelidir. Bu amaçla öncelikle metanol içinde, GHB, ketamin, norketamin, fenobarbital ve tiyopental analitlerini içeren 2,0 $\mu\text{g/mL}$ ’lik bir karışım stok çözeltisi hazırlandı. Kalibrasyon grafiğindeki her bir konsantrasyon düzeyi için SD ve %RSD değerleri hesaplandı, bunların ortalaması alındı.

3.2.2. Doğrusallık

Çalışılan maddelerin kalibrasyon çözeltilerinden 2 şer defa hazırlandı ve 3 er kez cihaza enjekte edildi (n=6). Her bir analize ilişkin pik alanları kaydedilerek, bu tekrarların ortalamasından kalibrasyon grafiği çizildi.

Tablo 3.3. Eşzamanlı Analiz için Geliştirilen HPLC Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrilerinin özellikleri (n=6).

Analit	Lineer Aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Regresyon Denklemi	Tamamlayıcılık Katsayısı R^2	(RSD%)
GHB	15,0-1500,0	$y=0.743(\pm 0.010)x-6.912(\pm 8.530)$	0,9996	4,96
GBL	10,0-1000,0	$y=0.838(\pm 0.006)x+3.863(\pm 3.554)$	0,9999	7,35
norketamine	50,0-1000,0	$y=1.093(\pm 0.031)x+13.160(\pm 20.068)$	0,9990	1,61
ketamine	50,0-1000,0	$y=1.106(\pm 0.007)x+77.260(\pm 4.680)$	1,0000	4,28
phenobarbital	5,0-500,0	$y=1.279(\pm 0.026)x+13.130(\pm 7.424)$	0,9988	6,82
phenytoin	5,0-500,0	$y=1.268(\pm 0.053)x+25.240(\pm 14.990)$	0,9964	6,61
thiopental	5,0-500,0	$y=1.421(\pm 0.066)x+0.176(\pm 21.639)$	1,0000	4,98

3.2.3. LOD ve LOQ Değerlerinin Hesaplanması

Eurachem yöntemi kullanılarak, her bir konsantrasyon düzeyi için gerçekleştirilen tekrarlı analizlerin %RSD değerleri hesaplandı. Eurachem yöntemine göre, konsantrasyon x eksenine, ve her bir konsantrasyon düzeyine karşılık gelen %RSD değerleri y eksenine yerleştirilerek, elde edilen eğriden elde edilen %15 RSD ye denk gelen konsantrasyon, LOQ olarak alındı. Her bir madde için LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup Tablo 3.4’de verilmiştir. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri oldukça düşüktür.

Tablo 3.2. Geliştirilen HPLC Ayırma Yönteminde Analitlerin Çalışılan Dalga Boyları ve Alıkonma Zamanları (n=6)

Analit	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
GHB	5.5	16,7
GBL	5.6	16,8
Norketamin	7.9	24,0
Ketamin	21.3	64,7
Fenobarbital	2.7	8,2
Fenitoin	3.6	10,9
Tiyopental	2.9	8,7

3.2.4. Seçicilik

Optimize edilmiş cihaz parametrelerinde enstrumantal yöntemin analite özgü olup olmadığını görmek için (seçicilik) analitlerin standart çözeltilerinin piklerinin elde edildiği kromatogramlar, bu maddeleri içermeyen çözücü (blank) kromatogramı ile kıyaslandı. Maddenin pikinin geldiği alıkonma zamanlarında çözücünden kaynaklanan bir girişim olup olmadığı gözlemlendi. Şekil.3.1’de görüldüğü gibi standart çözelti pikleriyle kör kromatogramları girişim olmadığı görülmüştür.

4. SONUÇ

Yapılan eşzamanlı analiz yönteminde monolitik kolon kullanılması, yüksek akış hızlarına çıkarak, daha kısa zamanda analiz yapılmasına olanak sağlamıştır. Bu sayede yöntemin hızı, yöntemin en büyük avantajı olmuştur. Projenin sonucunda sulu ortamda bu 7 maddenin HPLC-DAD ile eşzamanlı ve hızlı bir metot geliştirilerek bu maddelerin miktar tayini yapılmıştır. Yöntemin sulu ortamdaki bu ilaçların analizi için kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca yöntemin daha sonraki çalışmalar için (idrar ve kan örnek analizi vs) yol gösterebileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Wood, M., Laloup, M., Samyn, N., Morris, M.R., de Bruijn, E.A., Maes, R.A., Young, M.S., Maes, V., de Boeck, G., Simultaneous analysis of γ -hydroxybutyric acid and its precursors in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatog A*, 1056, 83-90, 2004.
2. Kaufmann, E., Alt, A., Determination of GHB in urine and serum by LC-MS using a simple one-step derivative, *Forensic Sci Int*, 168, 133-137, 2007.
3. Fung, H., Haas, E., Rybon, J., Xu, J., Fung, S., Liquid Chromatographic-mass spectrometric determination of endogenous γ -hydroxybutyrate concentrations in rat brain regions and plasma, *J Chromatog B*, 807, 287-291, 2004.
4. Kankaanpää, A., Liukkonen, R., Ariniemi, K., Determination of γ -hydroxybutyrate (GHB) and its precursor in blood and urine samples: A salting out approach, *Forensic Sci Int*, 170, 133-138, 2007.
5. Capella-Peiro, M.E. Gil-Agusti, M Martinavarro-Dominguez, A., Esteve-Romero, J., Determination in serum of some barbiturates using micellar liquid chromatography with direct injection, *Anal Biochem*, 309, 261-268, 2002.
6. Zhao, H., Wang, L., Qiu, Y., Zhou, Z., Zhong, W., Li, X., Multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of three barbiturates in pork by ion trap gas-chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) following microwave assisted derivatization, *Anal Chim Acta*, 586, 399-406, 2007.
7. Mercer, J.W., Oldfield, L.S, Hoffmann, K.N., Shakleya, D.M., Bell, S.C., Comparative Analysis of Gamma-Hydroxybutyrate and Gamma-hydroxyvalerate using GC/MS and HPLC, *J Forensic Sci*, 52, 383-388, 2007.
8. de Vriendt, C.A., van Sassenbroeck, D.K., Rosseel, M.T., van de Velde, E.J., Verstraete, A.G., van der Heyden, Y., Belpaire F.M., Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for the determination of γ -hydroxybutyric acid in rat plasma, *J Chromatog B*, 752, 85-90, 2001.
9. Zacharis C.K., Raikos, N., Giouvalakis, N., Tsoukali-Papadopoulou, H., Theodoridis, G.A., A new method for the HPLC determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) following derivatization with a coumarin analogue and fluorescence detection. Application in the analysis of biological fluids, *Talanta*, 356-361, 2008.
10. Drummer, O.H., Kotsos, A., McIntyre, I.M., A class-independent drug screen in forensic toxicology using a photodiode array detector. *J. Anal. Toxicol.*, 17, 225, 1993.

11. Tanaka, E., Terada, M., Tanno, K., Misawa, S., Wakasugi, C., Forensic analysis of 10 barbiturates in human biological samples using a new reversed-phase chromatographic column packed with 2-micrometre porous microspherical silica-gel, *Forensic Sci Int*, 85, 73, 1997.
12. Wang, Q., Fan, L., Zhang, W., Cao, C., Sensitive analysis of two barbiturates in human urine by capillary electrophoresis with sample stacking induced by moving reaction boundary, *Anal Chim Acta*, 580, 200-205, 2006.