

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

**GC- MS YÖNTEMİYLE BAZI DİÜRETİKLERİN
İDRARDA ANALİZLERİ**

Ceren Nur BİLER

Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Aytekin TEMİZER

ANKARA

2005

Sağlık Bilimleri enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Analitik Kimya Programında Bilim Uzmanlığı Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nuran Özaltın
Hacettepe Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Aytekin Temizer
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. E. Nursabah Elif Başçı
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sibel Özkan
Ankara Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sacide Altınöz
Hacettepe Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezim sırasında, deneysel ve teorik çalışmalarımıdaki katkılarından dolayı hocam Prof. Dr. Aytekin TEMİZER'e, tez çalışmalarım sırasındaki yardım ve desteklerinden dolayı başta Hatice YAPICI olmak üzere tüm Doping Kontrol Merkezi çalışanlarına ve çalışmalarım sırasında benden maddi ve manevi hiçbir desteklerini esirgemeyen eşim N. Atilla BİLER ve aileme teşekkür ederim.

ÖZET

Biler, C.N. GC-MS Yöntemiyle Bazı Diüretiklerin İdrarda Analizleri. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2005. Diüretiklerden, asetazolamit, diklofenamit, klortalidon ve furosemitin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi ile idrardan analizi yapılmıştır. Yukarıda adı belirtilen maddelerin idrardan tüketilme işlemlerinden sonra türevlendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Türevlendirme işleminde standart olarak yapılan üç saat fırında türevlendirmeye alternatif olmak üzere mikrodalga fırınla türevlendirme denenmiştir. Mikrodalga fırında 800 Watt güçte 15 dakika en iyi türevlendirme koşulu olarak seçilmiştir. Yöntemin geliştirilmesinin ardından yöntemin geçerli kılma çalışmaları yapılmıştır. Çalışılan maddeler için nitel analiz geçerli kılma parametreleri olan özgünlük ve gözlenebilme sınırı incelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan asetazolamit, diklofenamit, klortalidon ve furosemit için gözlenebilme sınırları sırasıyla; 90, 15, 15 and 15 ng/ml ve alıkonma zamanları sırasıyla 2,54, 4,18, 5,70 ve 5,47 dakikadır. Yöntem geçerli kılma çalışmalarının ikinci aşamasında furosemit kullanılarak yöntemin nicel geçerli kılma çalışmaları yapılmıştır. Buna göre furosemitin alt tayin sınırı 30 ng/ml, doğrusallık aralığı 30-1500 ng/ml bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin geçerli kılma parametrelerinin değerlendirilmesine göre bu çalışmada geliştirilen yöntem seçici, kesin, doğru, duyarlı ve tekrarlanabilir.

Anahtar Kelimeler: Diüretikler, analiz, mikrodalga fırında türevlendirme, validasyon.

ABSTRACT

Biler, C.N. Analysis of Some Diuretics in Urine by using GC-MS Method. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Master Thesis in Analytical Chemistry, Ankara, 2005. Diuretics such as acetazolamide, diclofenamide, chlorthalidone and furosemide were analyzed from the urine by using Gas Chromatography-Mass Spectrometer. The substances mentioned above are derivatized after extracted from urine. Microwave oven is essayed for derivatization as an alternative to standard derivatization method, three hours in the oven. The optimum condition such as 15 minutes in 800 Watt in microwave oven has been chosen for derivatization. After method development validation studies were held on. Qualitative validation parameters such as selectivity and limit of detection were examined. The limit of detection in this study for acetazolamide, diclofenamide, chlorthalidone, and furosemide has been found as 90, 15, 15 and 15 ng/ml, respectively. In the second stage of the validation studies, quantitative validation studies were held on using furosemide. With respect to this limit of quantitation for furosemide has been found as 30 ng/ml and linearity range was found as 30 - 1500 ng/ml. The developed method is selective, precise, accurate, sensitive and reproducible according to the evaluation of the validation parameters.

Keywords: Diuretics, Analysis, derivatization in microwave, validation.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER.....	xi
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Diüretikler	2
2.1.1. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	2
2.1.2. Ozmotik Diüretikler.....	4
2.1.3. Kıvrım Diüretikleri.....	5
2.1.4. Tiyazit Grubu Diüretikler.....	5
2.1.5. Potasyum Tutucu Diüretikler	8
2.1.5.1. Aldosteron Antagonistleri.....	8
2.1.5.2. Sikloamidin Türevleri	8
2.1.6. Yan Etkileri	9
2.2. Diüretiklerin Analiz Yöntemleri:.....	10
2.2.1. Sıvı Kromatografisi Analizleri	10
2.2.2. Gaz Kromatografisi Analizleri.....	12
2.2.3. Kütle Spektrometrisi Analizleri	15
2.2.4. Kapiler Elektroforez (CE) Analizleri.....	16
2.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)	16
2.3.1. Gaz Kromatografisi Teorisi.....	16
2.3.2. Gaz Kromatografisi Cihazının Bölümleri	18
2.3.2.1. Taşıyıcı gaz.....	19
2.3.2.2. Elektronik Basınç Kontrolü (EPC)	20
2.3.2.3. Enjeksiyon Bloğu.....	21
2.3.2.4. Fırın.....	23

2.3.2.5.	Kolon	24
2.3.2.6.	Dedektör	25
2.3.3.	Kütle Spektrometrisi Teorisi	26
2.3.3.1.	GC-MS Ara Bağlantıları.....	27
2.3.3.2.	İyon Kaynağı	28
2.3.3.3.	Kütle Analizörü	29
2.3.3.4.	Dedektör.....	31
2.3.3.5.	Vakum Sistemleri	35
2.4.	Gaz Kromatografisinde Türevlendirme	36
3.	GEREÇ ve YÖNTEM.....	39
3.1.	Kimyasal Maddeler	39
3.2.	Cihazlar	39
3.3.	Diğer Malzemeler	40
3.4.	Cam Malzemelerin Temizlenmesi	40
3.5.	Çözeltilerin ve Kimyasal Maddelerin Hazırlanması	40
3.5.1.	Stok Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	40
3.5.2.	Tampon Çözeltisinin Hazırlanması	40
3.6.	Diüretiklerin Biyolojik Materyalden Analizi	41
3.6.1.	Materyal	41
3.6.2.	Diüretiklerin İdrardan Analizi	41
3.6.2.1.	Tüketme	41
3.6.2.2.	Kurutma.....	42
3.6.2.3.	Türevlendirme	42
3.6.2.4.	GC-MS Sistemine Uygulama.....	42
3.6.3.	Yöntem Geçerli Kılma Çalışmaları	44
4.	BULGULAR.....	47
4.1.	Yöntem Optimizasyonu	47
4.2.	Yöntem Geçerli Kılma Çalışmaları	49
4.2.1.	Nitel Analize Yönelik Yöntem Geçerli Kılma Çalışmaları	49
4.2.2.	Nicel Analize Yönelik Yöntem Geçerli Kılma Çalışmaları....	57
4.2.2.1.	Duyarlılık	57
4.2.2.2.	Aralık ve Doğrusallık.....	57

4.2.2.3.	Doğruluk ve Kesinlik.....	60
4.2.2.4.	Geri Kazanım	61
4.2.2.5.	Tutarlılık.....	61
4.2.2.6.	Cihazın Tekrarlanabilirliği	62
4.2.2.7.	Tekrar Elde Edilebilirlik	62
5.	TARTIŞMA	63
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	68
	KAYNAKLAR	70
	EKLER	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
UV	Ultraviyole
DAD	Dizi diyot dedektör
nm	nanometre
ECD	Elektron yakalama dedektörü
EI	Elektron iyonizasyon
CI	Kimyasal iyonizasyon
LC-MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
t_R	Alıkonma zamanı
BSS	Bağıl standart sapma
SS	Standart sapma
$\bar{x}$	Aritmetik ortalama

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Enzim inhibisyonu	3
Şekil 2.2. Asetazolamit sentezi	4
Şekil 2.3. Ozmotik Diüretik yapıları	4
Şekil 2.4. Kıvrım Diüretiklerinin Yapıları	5
Şekil 2.5. Klortalidon sentezi	6
Şekil 2.6. Tiyazit (sülfamoiltiyazit) türevi diüretikler	7
Şekil 2.7. Aldosteron antagonistlerinin yapıları	8
Şekil 2.8. Sikloamidin türevi diüretik yapıları	9
Şekil 2. 9. Van Deemter Eğrisi	18
Şekil 2.10. Gaz Kromatografisi Cihazının Bölümleri	19
Şekil 2.11. Kullanılan Taşıyıcı Gaz Cinsinin Kromatografik Ayrım Üzerine Etkileri	20
Şekil 2.12. a. Bölmeli b. Bölmesiz Enjeksiyonlarda Akış Yolları	23
Şekil 2.13. Kuadropol GC-MS Sisteminin Şematik Gösterilişi	27
Şekil 2.14. Elektron bombardımanı ile iyonizasyon (EI)	29
Şekil 2.15. Kuadropol Kütle Analizörü	30
Şekil 2.16. Mathieu Kararlılık Diyagramı	31
Şekil 2.17.a. Dizi Dinot, b. Devamlı Dinot Elektron Çoğaltıcı Dedektörlerin Şematik Gösterilişi	33
Şekil 2.18. GC-MSD Cihazının AUTOTUNE Çıktısı	34
Şekil 3.1. Analiz Akış Şeması	43
Şekil 4.1. Asetazolamite Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu (5µg/ml)	50
Şekil 4.2. Klortalidona Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu (1µg/ml)	51
Şekil 4.3. Diklofenamite Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu (500 ng/ml)	52
Şekil 4.4. Furosemit Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu (200 ng/ml)	53

Şekil 4.5. Asetona Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu	54
Şekil 4.6. Türevlendirme Kontrolüne Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu	55
Şekil 4.7. Boş İdrara Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu	56
Şekil 4.8. İdrara eklenmiş Furosemid'e ait çalışma aralığının Saptanması	58
Şekil 4.9. Furosemit' e ait doğrusallık grafiği	59

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. Diüretikler için Ters Faz LC Koşulları	11
Tablo 2.2. Diüretiklerin gaz kromatografisi ile analizi için kullanılan türevlendirme yöntemleri ve tanımlama sistemleri	13
Tablo 2.3. Kütle Spektrometresinin Ayarlanmasında Kullanılan Kütlelerin Bağlı Çoklukları ve İzotop Kütle Oranları	35
Tablo 3.1. GC-MS Parametreleri	44
Tablo 4.1. Asetazolamit, Diklofenamit, Furosemit ve Klortalidon'un Metil Türevleri, Seçilen İyonları ve Alıkonma Zamanları	47
Tablo 4.2. Asetazolamit, Diklofenamit, Furosemit ve Klortalidon'un Mikrodalga Fırın Optimizasyonu için Üç Farklı Sıcaklık Sonuçları	48
Tablo 4.3. Asetazolamit, Diklofenamit, Furosemit ve Klortalidon'un 3 saat fırında türevlendirme ve mikrodalga fırında türevlendirme sonrası saptama alt sınırları	57
Tablo 4.5. GC-MS yöntemi ile analiz ettiğimiz furosemit ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri (n=6)	59
Tablo 4.6. Furosemitin GC-MS yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrışış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar*	60
Tablo 4.7. Furosemit için Gün İçi ve Günler Arası Kesinlik ve Doğruluk Değerleri	61
Tablo 4.8. Yöntemin Tutarlılığı için İstatistiksel Değerlendirmeler	62

1. GİRİŞ

Diüretikler genellikle klinik uygulamada geniş çapta hipertansiyon ve farklı türlerdeki ödemlerin tedavisinde kullanılırlar (1).

Diüretiklerin kullanımı, sporda kilo kategorileri içeren sporlarda yarışmadan önce hızlı kilo kaybı sağladığı, idrar konsantrasyonunu düşürerek doping maddelerinin görünmesini maskeleydiği ve doping maddelerinin atılımını hızlandığı için Dünya Dopingle Mücadele Ajansı'na yasaklanmıştır (2).

Diüretiklerin 1988'de yasaklı maddeler listesine Uluslararası Olimpiyat Komitesi'nce dahil edilmesinden bu yana, bu maddelerin idrar örneklerinde analizi için çok miktarda tarama ve doğrulama yöntemleri geliştirilmiştir (3).

Mevcut diüretiklerin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile tarama yönteminde 3 saatlik bir türevlendirme aşaması bulunmaktadır. Bu çalışmanın amaçlarından birisi, türevlendirme basamağı için gerekli enerji transferinin mikrodalga ışınlamaya maruz bırakılarak sağlandığı alternatif bir yöntemin geliştirilmesidir. Böylelikle üç saat gibi uzun bir türevlendirme basamağını dakikalara düşürmek amaçlanmaktadır.

Bunun için asetazolamit, diklofenamit, klortalidon ve furosemit seçilmiştir. Bu maddeleri seçerken farmakolojik özelliklerine göre farklı gruplardan olmasına dikkat edilmiştir.

Bu maddeler kullanılarak yöntem geliştirildikten sonra yöntemin geçerli kılınması çalışmaları yapılacaktır. Doping kontrol laboratuvarlarında diüretiklerin analiz sonuçları var/yok şeklinde değerlendirildiği için yöntemin nitel geçerli kılma parametrelerine göre geçerli kılınması yeterli olmaktadır. Bu nedenle çalışılan dört madde ile nitel geçerli kılma çalışmaları yapılması düşünülmektedir.

Geliştirilecek yöntemin yeni bir yöntem olacağı düşünülürse yöntemin geçerliliği açısından daha çok parametrenin incelenmesi amacıyla, en etkin ve günümüzde sporcular tarafından en çok kullanılan diüretiklerden biri olan furosemit ile nicel geçerli kılma çalışmaları yapılması da düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diüretikler

Diüretik ilaçlar, idrar hacmini artıran bileşiklerdir. Ayrıca vücuttan su ve tuz atılımını arttırdıkları için bu bileşiklere saliüretikler de denir. Diüretikler sadece idrar hacmini yani böbreklerden atılan su hacmini artırmak için değil, fakat esas olarak vücuttan sodyum iyonunun atılmasını artırmak için kullanılmaktadırlar (4,5). İdrar söktürücüler böbreklerden sodyum, potasyum gibi elektrolitlerin ve suyun atılımını artıran maddelerdir (2).

Diüretikler genellikle kalp ve böbrek yetmezliğinden kaynaklanan hipertansiyon ve ödem tedavisinde kullanılan ilaçlardır.

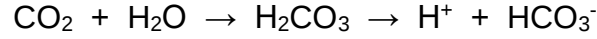
Diüretiklerin kullanılış yerleri şöyle sıralanabilir:

- Akut ödemler (örn; akciğer ödemleri)
- Kronik ödemler
- Hipertoni
- Akut ve kronik kalp yetmezliği
- Zehirlenmelere bağlı diürez güçlüğü
- Diabetes insipidus (şekersiz diabet)
- Glokom (karbonik anhidraz inhibitörleri)

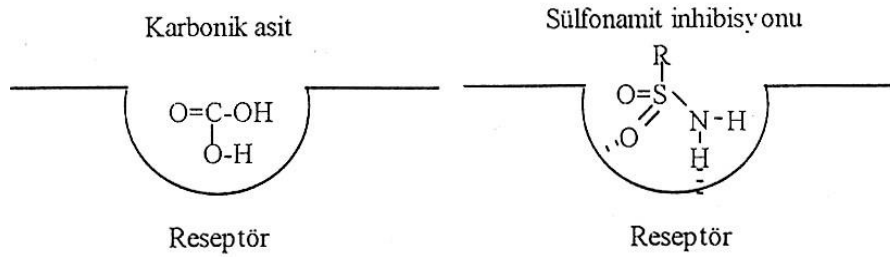
Diüretikler birkaç farklı biçimde sınıflandırılabilirler, ancak klinik kullanılışları bakımından daha anlamlı olanı temel farmakolojik özelliklerine göre yapılan sınıflandırmadır. Diüretikler farmakolojik özelliklerine göre 5 grupta sınıflandırılırlar (4).

2.1.1. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri, zayıf natiüretik ve diüretik etki gösterirler. Diüretik olarak tek başlarına nadiren kullanılırlar; bazı durumlarda diğer bir diüretikle kombine kullanılabilirler. Karbonik anhidraz, alyuvarlar, renal korteks, göz, santral sinir sistemi, gastrik mukoza ve renal tübüllerde bulunan bir enzimdir ve karbondioksitin karbonik aside dönüşümünü katalizler. Oluşan karbonik asit ise hidrojen ve bikarbonat iyonlarına disosiyasyon olur.



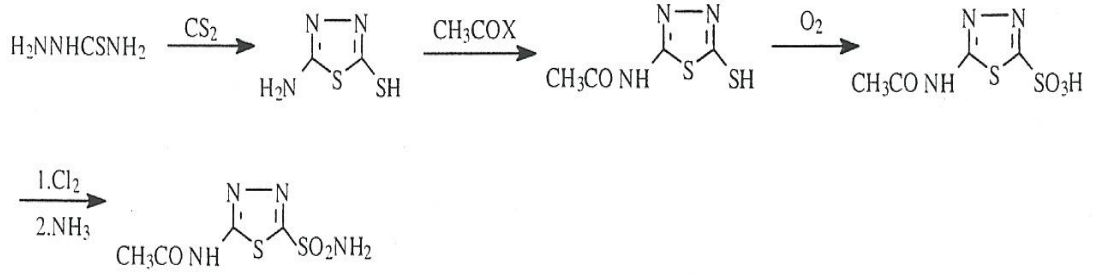
Açığa çıkan hidrojen iyonu sodyum ile değişerek tutulmasını sağlar. Karbonik anhidraz inhibitörleri hidrojen oluşumunu ve dolayısıyla bu değişimi engellerler. Sonuçta sodyum ve buna bağlı olarak suyun resorpsiyonu azalır. Ayrıca amonyum oluşumu azalırken amonyumun geri emilmesi artar. Sülfomoil gruplarının yapısal benzerlikleri nedeniyle karbonik anhidraz enziminin aktif noktasına bağlandıkları kabul edilir. Enzimin inhibisyonu hidrojenin konsantrasyonunun azalmasına ve sodyum ile bikarbonat iyonlarının atılımına yol açar.



Şekil 2.1. Enzim inhibisyonu

Karbonik asit inhibitörü diüretiklerin uzun süreli kullanımında, idrar çok fazla alkalileşir ve vücutta asidöz oluşur. Bu durumda karbonik anhidraz inhibitörleri etkinliklerini kaybederler ve vücutta normal asit baz dengesi oluşana kadar etkisiz kalırlar. Bu nedenle kullanımları sınırlıdır. Ayrıca potasyum kaybına yol açarlar. Karbonik anhidraz inhibitörleri günümüzde nadiren diüretik olarak kullanılmakla birlikte glokom tedavisinde sıklıkla kullanılırlar.

Asetazolamit, ilk bulunan oral etkili karbonik anhidraz inhibitörü olup 1952'de tedaviye girmiştir. Asetazolamit sentezinde, tiyosemikarbazit ve karbon sülfürün reaksiyonuyla hazırlanan 5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiyadiazolden hareket edilir. Beş numaralı konumdaki amino grubunun açılasyonundan sonra merkapt grubu oksitlenerek sülfonil klorür yapısı, bunun amonyak ile reaksiyonu sonucu asetazolamit elde edilir.

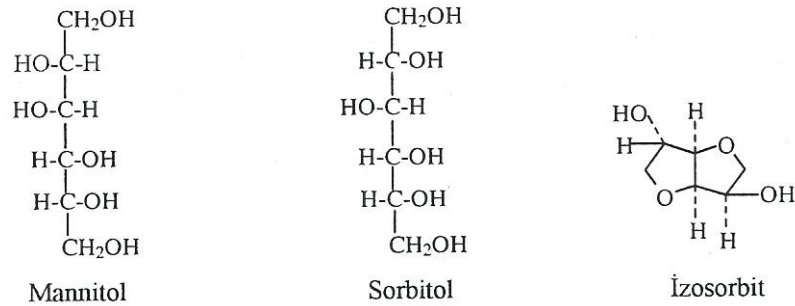


Şekil 2.2. Asetazolamit sentezi

Asetazolamit bir karbonik anhidraz inhibitörüdür ve günümüzde daha çok glokom tedavisinde kullanılmaktadır. Asetazolamit oral olarak tamamen absorblanır, yarı ömrü sekiz saattir ve % 70-90 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Metabolize olmaz, böbreklerden değişmeden atılır. Bu gruba diğer örnekler metazolamit, etaksazolamit, diklofenamit'tir.

2.1.2. Ozmotik Diüretikler

Ozmotik diüretikler, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Tam olarak metabolize olmazlar. Başlıca ozmotik diüretikler, mannitol, sorbitol ve izosorbittir.



Şekil 2.3 Ozmotik Diüretik yapıları

Elektrolitlerin sadece çok az bir kısmı bu bileşiklerle atılırlar. Glikoz ve sükroz gibi şekerler de diüretik etki gösterebilirler. Bu arada poliollerin de benzer bir ozmotik etkisi vardır. Ozmotik diüretikler, akut böbrek yetmezliği profilaksisinde suyun resorpsiyonunu inhibe etmek ve idrar

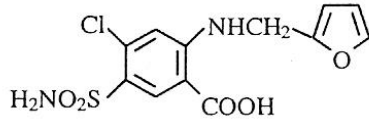
akışını sürdürebilmek için kullanılırlar. Günümüzde kıvrım diüretikleri bir çok durumda ozmotik diüretikler yerine kullanılmaktadırlar.

2.1.3. Kıvrım Diüretikleri

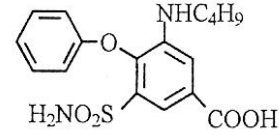
Kıvrım diüretikleri henle kulpunun çıkan kolunda etki gösterirler. Etki yerlerinden dolayı çok etkili (yüksek tavanlı) diüretiklerdir.

Bu grup diüretikler kendi içlerinde iki alt gruba ayrılırlar:

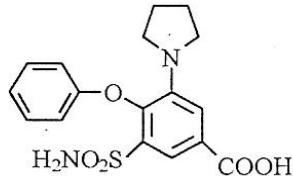
- Furosemit tipi kıvrım diüretikleri: Furosemit, Bumetanit, Piretanit, Azosemit
- Diğer kıvrım diüretikleri: Etakrinik asit, Etozolin, Ozolinon



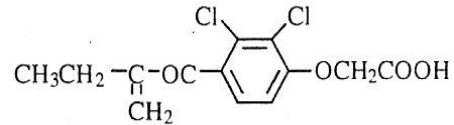
Furosemit



Bumetanit



Piretanit



Etakrinik asit

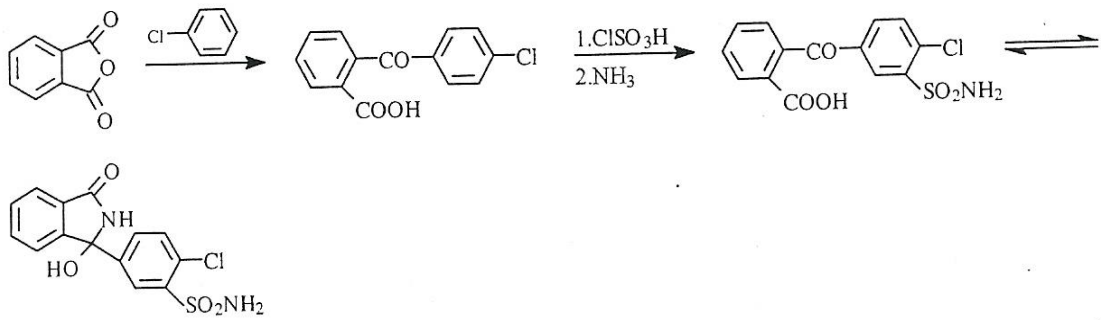
Şekil 2.4. Kıvrım Diüretiklerinin Yapıları

2.1.4. Tiyazit Grubu Diüretikler

Tiyazitler, bisiklik sülfonamid türevleridir ve bir tanesi halka sisteminde olmak üzere iki tane sülfonamid grubu taşırlar. Tiyazitler sodyum ve klorür iyonlarının atılımını artırır. Bu arada potasyum ve magnezyum iyonları da artarak elimine olurlar. Buna karşılık kalsiyum ve fosfat iyonlarının atılımında azalma görülür. Tiyazitler bu özellikleri nedeniyle kıvrım diüretiklerinden farklıdırlar. Tiyazitler karbonik anhidraz inhibitörlerinden farklı olarak kronik

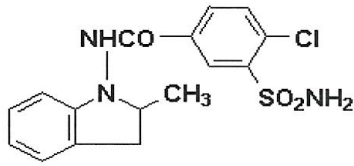
tedavide veya metabolik asidoz sırasında da etkilidirler. Bununla birlikte kronik tedavi sırasında salüretik etki belirgin olarak azalır. Tiyazitlerin büyük bir kısmı bağırsaklardan absorblanır ve glomerüler filtrasyon ve özellikle proksimal tübülde aktif sekresyonla atılırlar.

Klortalidon sentezinde, ftalik anhidrit klorobenzen ile reaksiyona girerek 2-(4-klorobenzoil) benzoik asidi oluşturur. Bu maddenin klorosülfonik asit ve amonyak ile reaksiyonuyla oluşan türevin yeniden düzenlenmesiyle bileşik elde edilir.

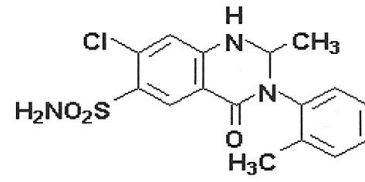


Şekil 2.5. Klortalidon sentezi

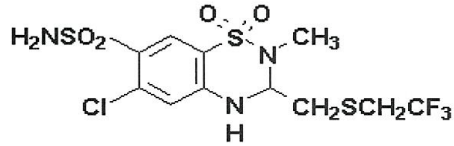
Klortalidon, oral olarak % 60-70 oranında absorblanır. Yarı ömrü 50-90 saattir ve %75 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Bileşiğin metabolize olduğu kromatografik olarak belirlenmesine rağmen metabolitler saptanamamıştır. Zayıf asit olması nedeniyle idrar pH'sını yükseltir ve buna bağlı olarak atılımını azaltır.



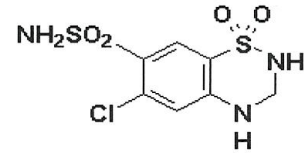
İNDAPAMİT



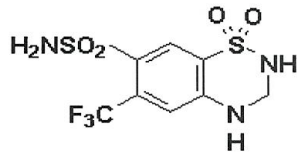
METOLAZON



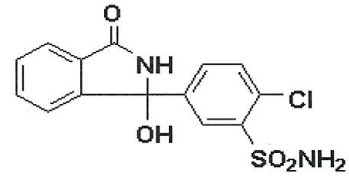
POLİTİAZİT



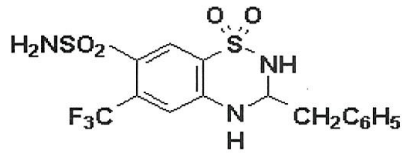
HİDROKLOROTİAZİT



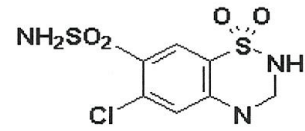
HİDROFLUMETİAZİT



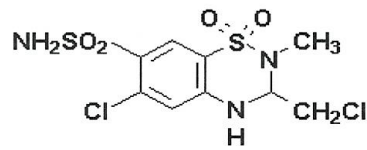
KLORTALİDON



BENDROFLUMETİAZİT



KLOROTİAZİT



METİLKLOROTİAZİT

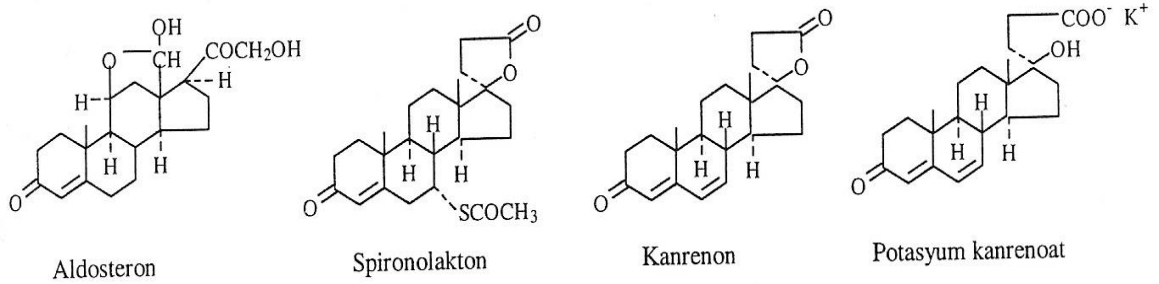
Şekil 2.6. Tiyazit (sülfamoiltiyazit) türevi diüretikler

2.1.5. Potasyum Tutucu Diüretikler

Diüretiklerin tümü sodyum, klorür ve potasyum iyonlarının eliminasyonunu farklı oranlar ve değişen miktarlarda artıran ilaçlar olarak tanımlanır. Buna ilaveten sodyum ve klorür iyonlarının eliminasyonunu artırmasına rağmen potasyum iyonlarının atılımını azaltan diüretikler de vardır. Bunların salüretik etkileri azdır çünkü sodyum ve klorür iyonlarının reabsorpsiyonu daha önce gerçekleşir. Çoğunlukla tiyazitler veya kıvrım diüretikleri ile kombine halde kullanılır. Bunlar potasyum tutucu diüretikler olarak adlandırılırlar ve iki grupta incelenirler.

2.1.5.1. Aldosteron Antagonistleri

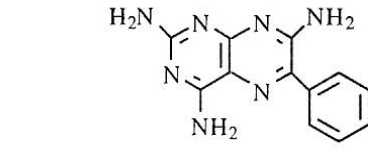
Aktif aldosteron antagonistleri 17-spirolakton steroid grubundadır. Bunlardan spironolakton ve onun metaboliti olan kanrenon ve potasyum kanrenoat tedavide kullanılır. Bu bileşiklerin etkileri geç başlar ve uzun sürer.



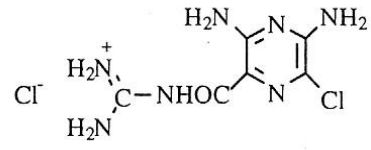
Şekil 2.7. Aldosteron antagonistlerinin yapıları

2.1.5.2. Sikloamidin Türevleri

Bu grup diüretiklerde sikloamidin yapısı içeren triamteren ve amilorit toplayıcı kanalda ve distal tübülün son kısmında sodyum kanallarını bloke ederek etkilerini gösterirler. Buna ilaveten, sodyum iyon-proton değişimini de inhibe ederler.



Triamteren
2,4,7-Triamino-6-fenilpteridin



Amilorit hidroklorür
3,5-Diamino-N-(aminoiminometil)-6-kloropirazino
karboksamit monohidroklorür dihidrat

Şekil 2.8. Sikloamidin türevi diüretik yapıları

2.1.6. Yan Etkileri (2, 6)

Bu maddeler doğrudan sportif performansı artırıcı etkiye bulunmazlar. Sporcular tarafından iki amaçla kullanılırlar. Birinci amaç idrar miktarını artırıp, idrardaki doping maddelerinin yoğunluğunu azaltmaktır. Böylece alınan yasaklı maddenin analiz sırasında saptanmasını zorlaştırmak hedeflenir. İkinci amaç ağırlık kategorilerinin yer aldığı güreş, boks, halter, judo gibi spor disiplinlerinde kısa zamanda ağırlık düşmektir.

İdrar söktürücü kullanan sporcularda oluşan yan etkiler sıvı ve elektrolit kaybı ile ilgilidir.

İdrar söktürücülerin yan etkileri:

Sıvı kaybı

Aşırı ağırlık kaybı,

Kan hacminde azalma,

Elektrolit dengesi bozukluğu

Yüksek ya da düşük kan potasyum düzeyi,

Böbrek bozuklukları,

Kan basıncında azalma,

Kalp ritim bozuklukları

Şeker hastalığı ciddileşme riski,

Ürik asit miktarı artışı: Gut hastalığı,

Kas gücünde azalma,

Kas verimi düşüklüğü,

Dayanıklılık kapasitesinde düşme,

Kas krampları,
Sistemik alkalozis,
Düşük kan şekeri,
Geçici sağırılık

2.2. Diüretiklerin Analiz Yöntemleri:

Diüretiklerin 1988 yılında sporda yasaklı maddeler listesine dahil edilmesinden beri bu maddelerin idrarda bulunuşunu tespit etmek üzere çok sayıda tarama doğrulama yöntemi geliştirilmiştir (3,7). Burada daha çok diüretiklerin doping kontrolünde kullanılan analiz yöntemleri üzerinde durulacaktır.

2.2.1. Sıvı Kromatografisi Analizleri

Diüretiklerin analizi ile ilgili optimize edilmiş yöntemler Herraes ve ar. tarafından gözden geçirilmiştir (7). Bir grup diüretiği tarama analizi için sıvı kromatografisi yöntemleri Tablo 2.1’de gösterilmiştir. Bileşiklerin ayrılması genellikle 5 µm parçacık boyutlu oktadesilsilan kolonları kullanılarak başarılmıştır. Diüretik gruplarına ait olan farklı polariteye sahip bileşiklere bağlı olarak çoğu yazar gradient programını tercih etmişlerdir. Çoğu durumda, farklı dalga boylarında görüntüleyebilme olasılığına ve bulunan piklerin tanımlanmasını kolaylaştıran UV spektrumu elde etmek için dizi diyot dedektörü kullanılır. Furosemit, bumetanit, amilorit ve triamteren gibi bazı bileşikler için, UV dedektörlerden daha seçici ve duyarlı teşhise imkan veren floresans dedektörler de aynı zamanda kullanılmıştır (3).

Tablo 2.1 Diüretikler için Ters Faz Sıvı Kromatografisi Koşulları (7)

Bileşikler	Kolon	Hareketli Faz	Dedektör
9 asidik diüretik (tiazitler)	μ Bondapak C ₁₈ 10 μ m, 30x0.39 cm	Asetik asit %1, asetonitril İzokratik elüsyon	UV: 271 nm
20 diüretik (asidik, bazik ve nötr)	Lichrosorb RP C ₁₈ 5 μ m, 15x0.46 cm	Farklı hareketli fazlar İzokratik elüsyon	UV: 238 veya 275 nm
20 diüretik (asidik, bazik ve nötr)	Lichrosorb RP C ₁₈ , C ₈ veya C ₂₅ μ m, 15x0.46 cm	Su veya 0.05 M fosfat tamponu pH 3, asetonitril İzokratik elüsyon	UV: 238 veya 275 nm
16 diüretik (tiazitler)	Farklı kolonlar	Asetik asit %1, asetonitril İzokratik elüsyon	UV: 271 nm
12 asidik diüretik (tiazit ve kıvrım diüretikleri)	Lichrosorb RP-18 5 μ m, 12.5x0.44 cm	0.05 M fosfat tamponu pH 3 Asetonitril, gradient elüsyon	DAD: 271 nm
12 diüretik (asidik, bazik ve nötr)	Nucleosil C ₁₈ veya C ₈ 25x0.46 cm	0.1% Fosforik asit, Asetonitril, gradient elüsyon	UV: 216, 254, 275 nm
22 diüretik (asidik, bazik ve nötr)	Hypersil ODS 5 μ m, 20x0.46 cm Lichrosorb RP-18 5 μ m, 20x0.46 cm	0.05 M sodyum fosfat tamponu 0.016 M propilamin, pH 3 Asetonitril, gradient elüsyon	DAD: 230, 275 nm
13 diüretik (asidik, bazik ve nötr)	Hypersil ODS 5 μ m, 10x0.46 cm	Potasyum fosfat tamponu pH 6.8, Asetonitril gradient elüsyon	DAD: 220, 273, 328 nm
9 diüretik (asidik, bazik ve nötr)	Ultrasphere ODS 5 μ m, 15x0.46 cm	0.05 M amonyum asetat veya fosfat tamponu, pH 3 Asetonitril, gradient elüsyon	DAD
13 diüretik (asidik, bazik ve nötr)	Bondclone ODS 10 μ m, 30x0.39 cm	0.05 M sodyum fosfat tamponu 0.016 M propilamin, pH 3 Asetonitril, gradient elüsyon	DAD: 230, 275 nm
20 diüretik (asidik, bazik ve nötr)	Ultrasphere ODS 3 μ m, 7.5x0.46 cm	0.1 M amonyum asetat tamponu pH 3, asetonitril gradient elüsyon	DAD: 240, 270, 290, 300, 318, 350 nm
11 diüretik (asidik, bazik ve nötr)	Hypersil ODS 5 μ m, 25x0.4 cm	0.05 M sodyum fosfat veya asetat tamponu, 0.016 M propilamin, pH 3 Asetonitril gradient elüsyon	DAD: 230, 254, 275 nm

2.2.2. Gaz Kromatografisi Analizleri

Çoğu diüretiklerin polar yapısı, GC ile doğrudan analizini güçleştirir ve diüretiklerin gaz kromatografik davranışının gelişmesi için bir türevlendirme basamağına gerek duyulur. Diüretikleri türevlendirmek için çoğunlukla metilleme tepkimesi seçilmiştir (3) (Tablo 2.2). Üç temel metilleme yöntemine değinilmiştir: ekstraktif metilleme, kolonda metilleme veya flaş metilleme ve asetonda metil iyodürle metilleme. Bu yöntem bileşiğin kuru asetondaki çözeltisinin geri soğutulmasından ve hafif bazik bir yoğunlaştırıcı reaktifle (kuru potasyum karbonat) maddeyi alkilemekten oluşur. Karboksilik asit ve sulfonamid fonksiyonlarına ek olarak, bu yöntem primer amin fonksiyonlarının (triamtereninkiler gibi) metillenmesine olanak verir. En büyük sakıncasız bazı bileşikler için gerekli olan türevlendirme zamanının uzun oluşudur: 60°C'de 2-8 saat türevlendirmeden bahsedilmiştir. Alkali pH'da etil asetatla tüketmeye ve tuz etkisine tabii tutulmuş ve asetonda metil iyodürle türevlendirilmiş olan idrara eklenmiş farklı diüretiklerin GC-MS analizinden sonra benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Tüketme ile ekstraktif metilleme, flaş metilleme ve asetonda metil iyodürle metilleme yakın zamanda Carreras ve diğ. tarafından karşılaştırılmıştır (8). Bu yazarlar tarama amacı için çok sayıda bileşiğin türevlendirilmesine bağlı olarak asetonda metil iyodürle metillemenin en iyi seçim olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Diüretik bileşiklerin GC ile ayrımı, farklı fazlarla, en çok kullanımı olan metilsilikon ve fenilmetilsilikon ile yapılmıştır. Başlangıçta kullanılan sıkıştırılmış kolonlar, son yayınlanan yöntemlerde, çapraz bağlı eritilmiş-silika kapiler kolonlarla yer değiştirmiş durumdadırlar. Elektron yakalama tayini önceki çalışmalarda en çok bahsedilen yöntem iken; son yıllarda, banko üstü GC-MS cihazlarının geniş bir şekilde yaygınlaşmasına bağlı olarak, elektron bombardımanlı iyonizasyonu kullanarak kütle spektrometresi tayini çoğu yazar için tercih nedeni olmuştur (9).

Tablo 2.2. Diüretiklerin gaz kromatografisi ile analizi için kullanılan türevlendirme yöntemleri ve tanımlama sistemleri (3)

Bileşikler	Numune	Türevlendirme	Dedeksiyon
Klortalidon	Plazma, Serum, İdrar	Ekstraktif metilleme	ECD
Furosemit	Plazma	Ekstraktif metilleme	ECD
Hidroklorotiazit	Plazma, Eritrosit, idrar	Ekstraktif metilleme	ECD, FID
Bendroflumetiazit	Plazma	Ekstraktif metilleme	ECD
Klortalidon	Plazma, Eritrosit, idrar	Ekstraktif metilleme	NPD
Hidroklorotiazit	Plazma	Ekstraktif metilleme	ECD
11 sulfonamit diüretiği	Referans çözeltiler	Ekstraktif metilleme	FID, ECD, MS (EI)
Diklofenamit	Serum	Ekstraktif metilleme	MS (EI)
Bumetanit	İdrar	Ekstraktif metilleme	MS
15 diüretik	İdrar	Ekstraktif metilleme	MS (EI)
15 diüretik	İdrar	Ekstraktif metilleme	MS (EI)
16 diüretik	İdrar	Ekstraktif metilleme	MS (CI)
Klopamit, İndapamit	Referans çözeltiler	Ekstraktif metilleme	MS (EI, CI)
Bumetanit	İdrar	Flaş metilleme	FID

Bileşikler	Numune	Türevlendirme	Dedeksiyon
Hidroklorotiazit	Kan, plazma	Flaş metilleme	ECD
Asetazolamit	Kan, plazma, tükürük	Flaş metilleme	ECD
Klortalidon	İdrar	Flaş metilleme	FID
Asetazolamit	Kan, tükürük	Flaş metilleme	MS (EI)
Bumetanit, Furosemit, Etakrinik asit	İdrar	Flaş metilleme	MS (EI)
Furosemit, Klopamit, diğer diüretikler	İdrar	Asetonda, ICH3 ile metilleme	MS (EI)
9 diüretik	İdrar	Asetonda, ICH3 ile metilleme	MS (EI)
10 diüretik	Referans çözeltiler	Asetonda, ICH3 ile metilleme	MS (EI)
Furosemit	İdrar, serum	Asetonda, ICH3 ile metilleme	MS (EI, CI)
Hidroklorotiazit	İdrar	Asetonda, ICH3 ile metilleme	MS (EI)
Etakrinik asit	Plazma	Metilleme (HCl/Metanol)	ECD
Etakrinik asit	Plazma	Açılleme (pentaflorobenzil bromür)	MS (CI)
Etakrinik asit	Plazma, idrar	Sililleme (BSTFA)	MS (EI)
Amilorit	İdrar	Metanolleme ve Sililleme (MSTFA)	MS (EI)
Amilorit	İdrar	Sililleme (MSTFA)	MS (EI)

2.2.3. Kütle Spektrometrisi Analizleri

Çoğu diüretiğin, kütle spektrometresine doğrudan verilmesiyle elde edilen elektron bombardımanlı (EI) kütle spektrumları, farklı kütle spektrumu kütüphanelerinde yayınlanmıştır. EI şartlarındaki (70 eV) parçalanma profilleri Casy tarafından yüksek çözünürlüklü MS kullanılarak çalışılmıştır (10).

Bununla birlikte, gaz veya sıvı kromatografik ayırımlarından sonra normalde tayin için MS kullanılmıştır. EI şartlarında GC-MS, metil türevleri olarak diüretikleri analiz etmek için yaygın bir şekilde kullanılır ve genelde, kütle spektrumunun hassasiyeti ve seçiciliği açısından da doping amaçlarına uygun olduğu görülmüştür.

Birkaç metillenmiş diüretiğin kütle spektrometresine doğrudan verilmesiyle negatif iyon spektrumları çalışılmıştır (11,12). Genelde, EI şartlarından daha az iyon parçalı kütle spektrumları elde edilmiştir.

Ventura ve diğ. (13) tarafından diüretiklerin doğrulama analizleri için, termospray (TSP) arayüzlü LC-MS'in potansiyeli araştırılmıştır. Boşalım iyonizasyon modu kullanılarak, filament-kapalı TSP iyonizasyondan daha iyi iyonizasyon verimi alınmıştır. LC-MS, yazarların da bildiği kadarıyla, GC-MS ile analiz edilebilecek uygun türevler oluşturamayan bentiyazit de dahil olmak üzere idrar ekstraktındaki çoğu bileşiği doğrulamaya yetecek kadar hassas bulunmuştur.

Boşalım iyonizasyonu kullanarak diüretiklerin TSP pozitif iyon kütle spektrumları, küçük parçalanmayla protonlanmış bir moleküler iyonla karakterize edilmişlerdir. Bu tekniğin çift MS ile birleşmesi (couplingi), doping kontrolünde doğrulama amaçlarına uygun daha iyi yapılandırılmış bilgi sunar.

Ventura tarafından tanecik-demet (PB) arayüzü kullanılarak LC-MS uygulamasıyla, diüretiklerin analizine çalışılmıştır (14). Doğrudan cihaza verilme kullanıldığında rapor edilenlere benzer seçilmiş EI kütle spektrumları elde edildiği halde, EI şartlarındaki hassasiyet idrarda diüretiklerin analizine uygun değildir.

Brown ve diğ. Tarafından ince tabaka kromatografik ayırımdan sonra, diüretiklerin analizine hızlı atom bombardımanı (FAB) uygulanmıştır. Çoğu bileşik için negatif iyon modu kullanılmıştır (15).

2.2.4. Kapiler Elektroferez (CE) Analizleri

UV teşhisi takiben kapiler elektroforezi (CE) ile diüretiklerin taraması çalışılmıştır. Jumpannen ve diğ. (16, 17) katı faz tüketmesinden sonra, diüretikleri idrarda ve kan serumunda analiz etmek için bir yöntem geliştirmişlerdir. Diüretikler heterojenliklerinden dolayı, farklı pH değerlerinde iki ardışık çalışma gerektirmişlerdir. Sülfonamit ve/veya karboksilik grupları içeren bileşikler, pH 10.6'da 3-(sikloheksilamino)-1-propansulfonik asit tamponu kullanılarak anyonlar olarak ayrılmışlardır. Amino fonksiyon gruplu diüretikler, asidik pH'da, pH 4.5'da asetat-betain tamponu kullanılarak katyonlar olarak ayrılmışlardır. Bu şartlar altında diüretikler 30 dakikadan daha az kısa bir süre içerisinde CE ile taranabilmişlerdir. Yöntem, boş serum ve diüretik eklenmiş idrar örnekleriyle denenmiştir.

2.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) (18-21)

2.3.1. Gaz Kromatografisi Teorisi

Kromatografi; bir karışımda bulunan maddelerin, hareketli ve sabit faz arasında dağılma, adsorbsiyon veya iyon değişimine ve bunun gibi bazı mekanizmalara bağlı olarak ayrılması esasına dayanır. Gaz kromatografisi tekniği, uçucu olan veya uçucu hale getirilebilen maddelerin belirli bir sıcaklıkta, bir taşıyıcı gazın akışı yardımıyla, sabit bir faz içinde ayrılmaları esasına dayanır. Sabit faz sıvı ise maddeler çözünürlüklerine bağlı olarak fazlar arasında dağılırlar. Bu yöntem gaz-sıvı kromatografisi adını alır. Eğer sabit faz katı ise maddeler adsorpsiyon-desorpsiyon esasına dayanarak ayrılırlar ve yönteme gaz-katı kromatografisi adı verilir.

Çalışmalarımız gaz-sıvı kromatografisi ile yürütülmüştür.

Maddenin enjekte edildiği andan dedektörde sinyalinin görüldüğü ana kadar geçen zamana alıkonma zamanı (t_R) denir. Moleküller arası kuvvetler, molekül içi kuvvetler, sıcaklık, taşıyıcı gazın hızı, molekül büyüklüğü ve polarite alıkonma zamanına etki eden faktörlerdir.

$$t_R = \frac{\text{Kolon boyu (L)}}{\text{Hareketli faz hızı (V}_H\text{)}} \quad [1]$$

Kromatografik çalışmalar yapılırken kolon sabit sıcaklıkta tutulabildiği gibi belli bir sıcaklık programı uygulanarak da çalışılabilir. Maksimum sıcaklık kolonun dayanabileceği sıcaklık olmalıdır. Kolonun etkinliği pik genişliği ile ölçülür. Dar pikler elde edildikçe kolon etkinliği artar. Kolonu ayırıcılığı ise teorik tabaka sayısına bağlıdır.

$$N = 16 (t_R / w)^2 \quad [2]$$

Eşitlik 2’de N; teorik tabaka sayısı, w; pik genişliğidir. Buna bağlı olarak teorik tabakaya eşdeğer yükseklik (H); kolon boyu (L) ile eşdeğer teorik tabaka sayısının birbirine oranıdır.

$$H = \frac{L}{N} \quad [3]$$

Kolonun kromatografik performansını açıklayan temel eşitlik Van Deemter eşitliğidir. Bu eşitlik verimliliği ortalama hareketli faz doğrusal hızının (μ) bir fonksiyonu olarak açıklar (Şekil 2.9). Klasik Van Deemter eşitliği aşağıdaki gibidir:

$$H = A + B / m + C_m \quad [4]$$

H: Teorik tabaka yüksekliği

A: Eddy difüzyon katsayısı

B: Boyuna difüzyon katsayısı

C: Kütle transfer katsayısı

m: Taşıyıcı gazın ortalama hızı

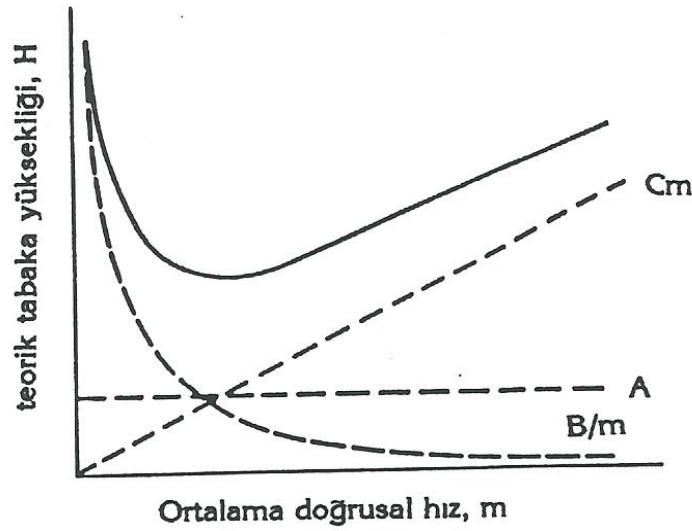
Destek dolgusu içermeyen açık tübüler kolonlar için, “A” terimi yoktur ve bu durumda eşitlik Golay eşitliği adını alır (eşitlik 5).

$$H = B / m + C_m \quad [5]$$

A (Eddy difüzyon katsayısı); kolonu doldurmak için kullanılan taneciklerin büyüklüğü ve tekdüzeliğinin bir fonksiyonudur. Dolgu kolonlarda bu terim geçerli olup, kılcal kolonlarda etkin değildir.

B (Boyuna difüzyon katsayısı); kolon uzunluğu boyunca difüzyon oluşması nedeniyle oluşan pik genişliğidir. Hareketli faz gaz ise bu etki daha fazladır. Taşıyıcı gaz akış hızı artırılarak bu etki en aza indirilebilir.

C (Kütle transfer katsayısı); Hareketli ve sabit fazdaki kütle transferlerinin toplamıdır. Çok küçük çaplı partiküllerle doldurulan bir kolon veya sabit sıvı faz için kütle transferi artan hızla birlikte doğrusal olarak artar.

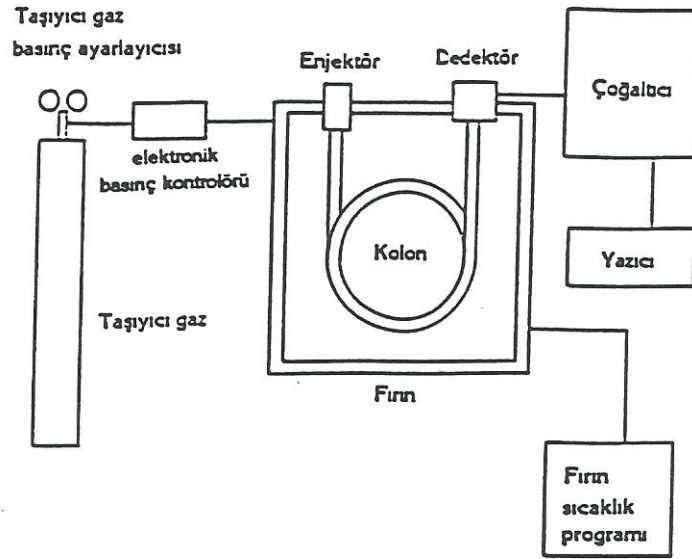


Şekil 2. 9. Van Deemter Eğrisi

2.3.2. Gaz Kromatografisi Cihazının Bölümleri

Gaz Kromatografisi Cihazı;

- 1) Taşıyıcı gaz
- 2) Elektronik basınç kontrolörü
- 3) Enjeksiyon bloğu
- 4) Fırın
- 5) Kolon
- 6) Dedektör
- 7) Çoğaltıcı ve yazıcıdan oluşmaktadır.



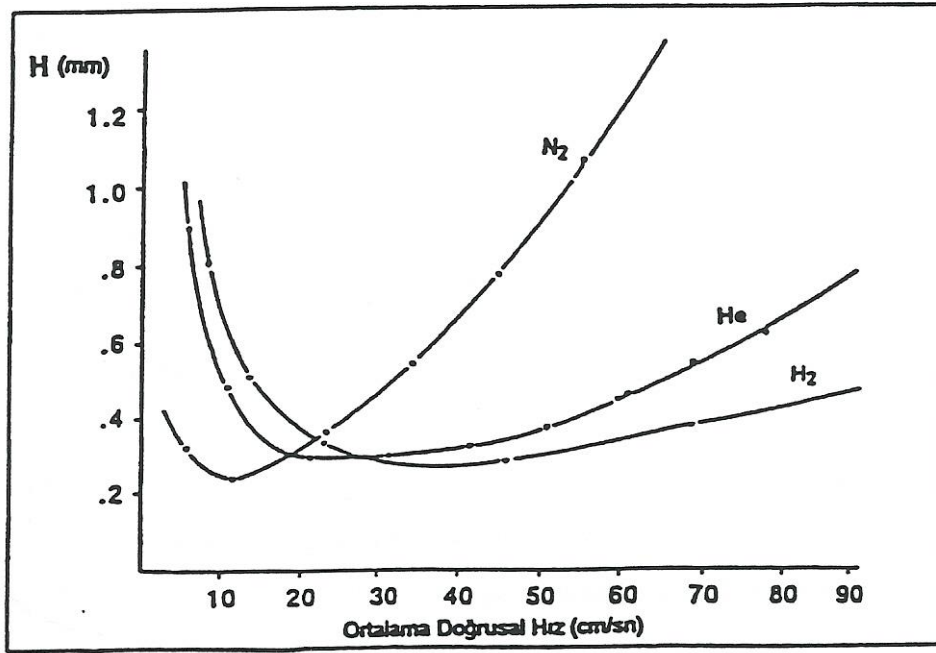
Şekil 2.10. Gaz Kromatografisi Cihazının Bölümleri

2.3.2.1. Taşıyıcı gaz

GC ile çalışan kişilere zarar verici bir risk oluşturmaması için taşıyıcı gaz, kimyasal olarak inert olmalı, toksik ve yanıcı olmamalıdır. Kullanıldıktan sonra atıldığı için ucuz olmalıdır. Molekül ağırlığı büyük olan gazlar difüzyonu daha az olacağı için ayırım etkinliğini arttırmazlar.

Gaz kromatografisinde taşıyıcı gaz olarak genellikle azot, helyum ve hidrojen kullanılır. Taşıyıcı gaz, enjekte edilen bileşenlerin kolonda taşınmasını ve madde yada maddelerin sabit fazla etkileşimini sağlar. Taşıyıcı gazın ayırım üzerindeki etkisi Golay eşitliğinin hareketli faz difüzyon terimlerini inceleyerek açıklanabilir. Kullanılan taşıyıcı gazın cinsinin kromatografik ayırım üzerine etkileri Şekil 2.11'de gösterilmektedir. En yüksek verimlilik N_2 gazı kullanılarak elde edilmektedir (minimum H). Bu minimum değer düşük taşıyıcı gaz doğrusal hızlarında görülmekte ve artan doğrusal hızla orantılı olarak, verimlilik de hızla düşmektedir. Bu nedenle, N_2 gazı kılcal kolonun kullanıldığı GC'de çok sık hareketli faz olarak seçilmez. Diğer taraftan, H_2 gazının daha düşük viskozitesine bağlı olarak, taşıyıcı gaz hızındaki değişiklikler kolon ayırıcılığını belirgin olarak etkilemeyecektir. Hidrojen verimlilik eğrisinin minimumu daha geniş bir aralıkta ve daha yüksek

doğrusal hızlarda ortaya çıkabilmektedir. Ancak H_2 gazının patlayıcı özelliği kısıtlayıcı bir etkidir. Bu nedenle çalışmalarda N_2 ve H_2 'nin dezavantajlarına sahip olmayan ve verimlilik eğrisinin minimumu N_2 'a göre daha geniş aralıkta ve daha yüksek doğrusal hızlarda ortaya çıkan He gazı kullanılmaktadır.



Şekil 2.11. Kullanılan Taşıyıcı Gaz Cinsinin Kromatografik Ayırım Üzerine Etkileri

2.3.2.2. Elektronik Basınç Kontrolü (EPC) (22,23)

GC'de gaz akışı, performansı pek çok yönden etkileyebileceği için, akışın kesin ve belirgin olarak kontrolü gerekmektedir. Diğer taraftan taşıyıcı gaz akışının kontrol altında olması alıkonma zamanlarındaki kararlılık için de gerekli olup miktar tayinlerini de hem pik şekilleri, hem de dedektör cevabı açısından etkileyebilir.

Sabit basınçta çalışma, düşük kolon akış hızlarında iyi bir performans sağlayabilir. Ancak, sıcaklık programlı analizlerde kolon akışları değişecektir. Basıncın tekrarlanabilir şekilde ayarlanması mekanik basınç ayarlayıcıları ile zor olmaktadır.

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

EPC sistemi, kolonların yanı sıra basınç düzenini sağlamak amacıyla dedektörlerde de kullanılmaya başlanmıştır.

Elektronik basınç kontrolü nitel ve nicel analizlerde alıkonma zamanını ve pik alanlarındaki tekrarlanabilirliği sağlar. GC sisteminde fırın sıcaklığının artışı ile birlikte taşıyıcı gazın viskozitesi de artar. Bu esnada eğer giriş basıncı sabit tutulursa sıcaklık programlı bir analizde kolon gaz akışı azalacaktır. Basıncı değiştirerek kolon gaz akışının sabit kalması veya akışı belli bir hızda değiştirerek basıncın sabit kalması sağlanabilir.

Apolar kolonlarda sıcaklık artışı ayırımı azaltmaktadır. Ayrıca sabit akış veya basınç programı kullanılarak analiz süresinde kısalma sağlanmaktadır.

2.3.2.3. Enjeksiyon Bloğu

Bu kısım numunenin sisteme verildiği bölümdür. Enjeksiyon bloğundan numune beş şekilde verilmektedir.

- 1) Bölmeli enjeksiyon
- 2) Bölmesiz enjeksiyon
- 3) Kolona enjeksiyon
- 4) Doğrudan enjeksiyon
- 5) Sıcaklık programlı buharlaşmalı enjeksiyon

Bölmeli enjektör, ani bir buharlaştırma aletidir. Sıvı örnek, enjektörle sıcak enjeksiyon bloğuna girer ve burada hızlıca buharlaşır. Buharlaşan örneğin küçük bir miktarı kolona girerken, büyük miktarı atık olarak uzaklaştırılır. Bölme oranı, kullanıcı tarafından kolon akışından kontrol edilir. Bölme oranları kolon özellikleri ve kapasitelerine göre ayarlanır.

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

Bu teknikte dar piklerin oluşma olasılığı yüksektir. Bölmeli enjeksiyon daha çok yüksek derişimlerde uygulanır. Böylece kolonun kirlenmesi nlenmiş olur. Çalışmamızda bölmeli enjeksiyon kullanılmıştır.

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

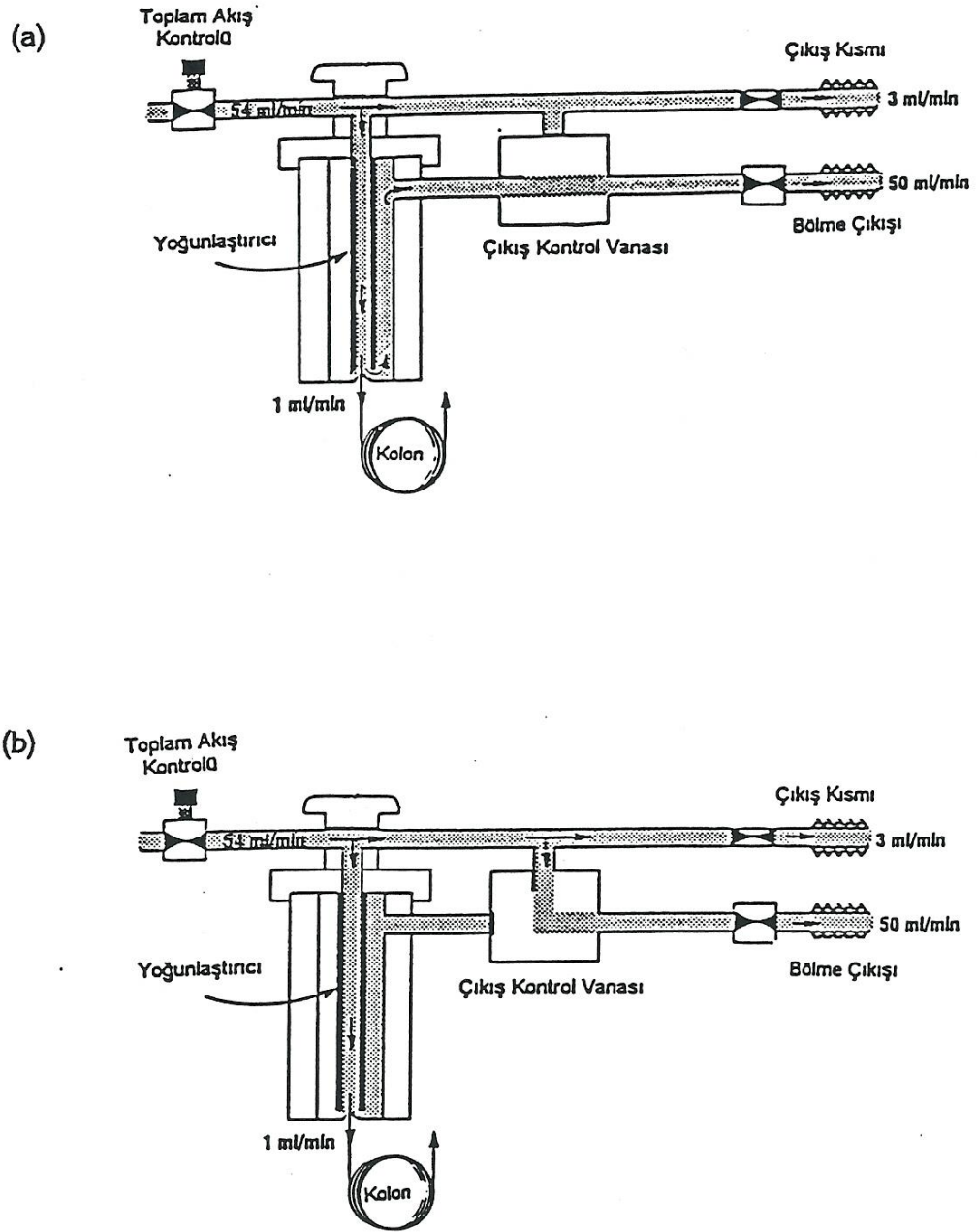
Bölmeli ve bölmesiz enjeksiyonlarda akış yolları şekil 2.12.a. ve b.' de gösterilmiştir.

Kolona enjeksiyon soğuk enjeksiyon tipidir. Numune kolon içine doğrudan sıvı halinde enjekte edilir. Enjeksiyon sırasında enjekte edilen kısım soğuktur. Fırın sıcaklığı arttıķa kolon girişinde bulunan madde yavaş yavaş buharlaşır. Bu tür enjeksiyon bütün kılcal kolonlara uygulanabilir.

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

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

Enjektörün numuneyi deriştiriciye sağlıklı bir şekilde bırakması için enjeksiyon bölmesinin üzerine yerleştirilen, enjektörün girmesini sağlayan ve özel bir maddeden yapılmış tıpayı “septum” denir. Septum, taşıyıcı gaz kaçağını, sisteme hava ve nem girişini önler. Septumdan sonra numune deriştiriciye gelir. Numune deriştirici, enjekte edilen numunenin, aerosol oluşturmasını engelleyerek homojen buharlaşmayı ve taşıyıcı gaz ile karışmasını sağlamaktadır. Yoğunlaştırıcı içine yerleştirilmiş olan silillenmiş cam veya kuartz pamuğu, kolonun kirlenmesine veya tıkanmaya neden olan küçük partiküllerin tutulmasını sağlamaktadır. Bu yolla pik şekillerinin düzgün eldesi, pik alanı hesaplamalarında ise tekrarlanabilirlik ve doğruluk artmaktadır (24). Enjeksiyon ve taşıyıcı gazın hızı, elektronik basınç kontrolü ile ayarlanmaktadır.



Şekil 2.12. a. Bölmeli b. Bölmesiz Enjeksiyonlarda Akış Yolları

2.3.2.4. Fırın

GC'de alıkonma zamanının ayarlanması için kullanılan yöntem, fırın sıcaklığının değiştirilmesidir. Sıcaklıktaki 20-30°C'lik bir artış alıkonma

zamanında 2-3 kat azalmaya neden olur. Piyasada bulunan GC fırınlarının en yüksek sıcaklık sınırı 450°C olduğundan, sıcaklık tek başına alıkonma zamanını 100 kat kadar değiştirebilecek güçtedir.

2.3.2.5. Kolon (20, 25)

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

Eritilmiş silika kolonların gelişimi ve bulunmalarının kolay olması nedeniyle kullanımları hızla artmaktadır. Bu kolonlar saf SiO₂'den yapılmış ve dıştan poliiimid polimeri ile kaplanarak güçlü hale getirilmişlerdir. Eritilmiş silika kolonların sabit fazlarının kaplanışına göre sınıflaması şöyledir:

1) Duvarı kaplı açık tübüler kolon (Wall-Coated Open Tubuler Columns=WCOT): Sabit faz katı, viskoz sıvı veya zatk formunda polimerlerdir. Kılcal kolon çeperine kaplanır. İç çapı 0,005-0,53 mm, film kalınlığı 0.1-3 µm'dir.

2) Destek kaplı açık tübüler kolonlar (Support-Coated Open Tubuler Columns=SCOT): Destek materyalle sıvı faz kaplanmış şekilde kılcal duvarına yapıştırılmıştır. En önemli avantajı sabit faz kalınlığının daha geniş aralıkta tutulabilmesidir.

3) Poröz yüzeyli açık tübüler kolonlar (Porous Layer Open Tubuler Columns=PLOT): İç tabakası adsorban materyal ile kaplıdır. Dezavantajı düşük etkinliğe sahip olması, tekrarlanabilir ve kararlı olmamasıdır.

4) Mikrokaplı kılcal kolonlar (Micro-Coated Capillary Columns=MCC): Kolon iç çapı destek madde ile tamamen doldurulmuştur.

GC kolonlarında 3 önemli özelliğin bulunması gerekmektedir.

1) Sabit faz olabildiğince inert, destek yüzeyini tamamen kaplayan tekdüze kalınlıktaki film tabakası ile oluşturulmalıdır.

2) Kolon film tabakasının yüksek sıcaklıklarda bozunma ve buharlaşmaya karşı ısısal kararlılığı olmalıdır. Bu sabit faz moleküllerini destek materyaline kimyasal veya fiziksel olarak bağlayarak polimere benzeyen bir film tabakası oluşturarak gerçekleştirilir.

3) Geri dönüşümsüz olarak numune bileşenlerinin adsorpsiyonuna neden olan ve metalik elementleri, özgün bileşenlerin bozunması için katalitik kısımlar olarak rol oynayan aktif bölgelerin olmaması gerekmektedir.

Eğer kolon, sıcaklık sınırlarının üzerinde uzun süre kalırsa ve WCOT kolonlarda kolon duvarlarında yumuşak, tekdüze bir sıvı kaplaması başarılamazsa aktif bölgeler ortaya çıkacaktır.

Polar ve nonpolar sabit faza sahip olan WCOT kolonlar yüksek verimliliğe sahiptir.

Diüretiklerin analizlerinde %100 dimetil polisiloksan dolgu materyali nonpolar sabit fazlı kolonlar kullanılmıştır. Polisiloksan fazlarının ısısal kararlılık ve düşük buhar basıncı özellikleri, Si-O bağ enerjisinin C-C bağ enerjisinden fazla olması sağlar.

Kolonlara yeni doldurulmuş sabit fazın, küçük molekül ağırlığına sahip sıvı faz bölümleri ile çözücülerin fazla kısımlarını tutmamaları için kullanmadan önce şartlanması gerekmektedir. Eğer şartlanma yapılmazsa bu ürünler kolondan geçip dedektöre ulaştıktan sonra temel çizgi yükselmesi ve fazla piklere neden olacaktır. Eski kolonların da numune veya saf olmayan taşıyıcı gazdan dolayı kolonda tutulabilecek uçucu olmayan maddelerin birikmesini engellemek için aralıklarla şartlanması gerekmektedir.

Şartlanma sıcaklığının yüksek olması daha kararlı temel çizgilerin elde edilmesini sağlamakla birlikte kolon ömrünü kısaltacağından sıcaklığın dikkatli seçilmesi gerekmektedir. Ayrıca bu seçimde çalışma sıcaklığı da göz önünde bulundurulmalıdır.

Kolonlar saklanırken sıvı faza difüze olabilecek oksijen veya diğer kirlilikleri engellemek için uçları uygun bir şekilde kapatılmalıdır (26).

2.3.2.6. Dedektör (27)

Taşıyıcı gaz ile sürüklenerek kolon çıkışına gelen numunelerin elektrik sinyaline çevrilip tanınmasına yardımcı olan elektronik sistemlerdir.

Her maddeyi analiz eden dedektörlere evrensel dedektörler denir. Seçici dedektörler element için seçici veya yapı/fonksiyonel grup seçici olabilirler. Özgün dedektörler ise, o kadar seçicidirler ki, özel yapıları veya elementleri yüksek kesinlikle ayırabilirler.

Dedektörlerin sinyalleri değerlendirmesine cevap karakteristiği denir ve hassasiyet, seçicilik ve dinamik aralığı ile değerlendirilir.

En fazla kullanılan GC dedektörleri; kütle spektrometresi, alev iyonizasyon dedektörü, azot-fosfor dedektörü, elektron yakalama dedektörüdür.

Çalıştığımız sistemde kütle spektrometresi dedektör olarak kullanıldığından, sadece bu dedektör incelenecektir.

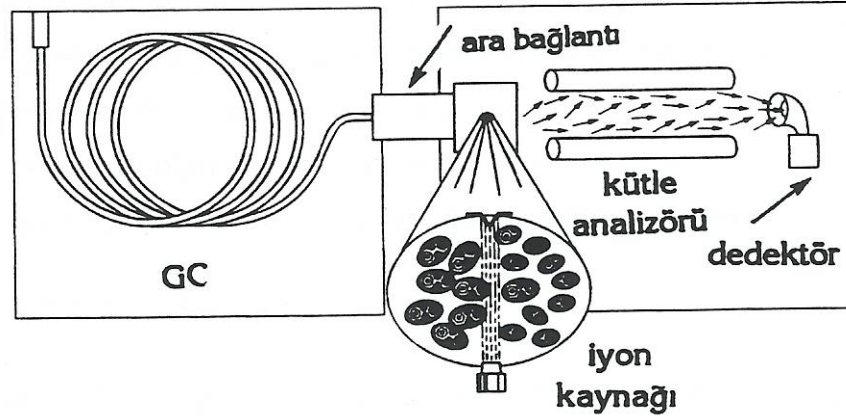
2.3.3. Kütle Spektrometrisi Teorisi (28-30)

Kütle Spektrometrisi ile ilgili ilk çalışmalar 1913 yılında J. J. Thomson'un kütle spektrometresinin yüklü parçacıkların elektriksel ve manyetik alanda hareketleri ile karalı izotoplarının varlığını göstermesi ile başlamıştır. Aston 1920'de ve Symthe ve Mattanch 1926'da kütle spektrometresi terimini kullanmışlardır. Kütle spektrumu gaz fazındaki iyonların belirli kütle/yük (m/z) oranlarına göre kaydedilmesi ile elde edilir. İyonlar pozitif ve negatif olarak seçilen yöneme göre kaydedilir. Yaygın olarak pozitif iyonlar ile çalışılmaktadır.

Kütle Spektrometresi (MS), evrensel, kütle bağımlı ve parçalayan bir dedektördür. MS, tek bir cihaz olarak kullanıldığı gibi, GC ve HPLC'ye bağlı olarak da kullanılmaktadır.

Kütle spektrometresi şu kısımlardan oluşur (Şekil 2.13)

- 1) Ara bağlantı
- 2) İyon kaynağı
- 3) Kütle analizörü
- 4) Dedektör
- 5) Vakum sistemleri



Şekil 2.13. Kuadropol GC-MS Sisteminin Şematik Gösterilişi

2.3.3.1. GC-MS Ara Bağlantıları

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

Kullanılan ara bağlantılar şunlardır:

- 1) Effusif ara bağlantı
- 2) Jet açıklıklı ara bağlantı
- 3) Geçirgen membranlı ara bağlantı
- 4) Doğrudan bölmeli ara bağlantı
- 5) Açık bölmeli ara bağlantı
- 6) Doğrudan kılcal kolon bağlantıları: Çalışmalarımızda bu sistem kullanılmıştır.

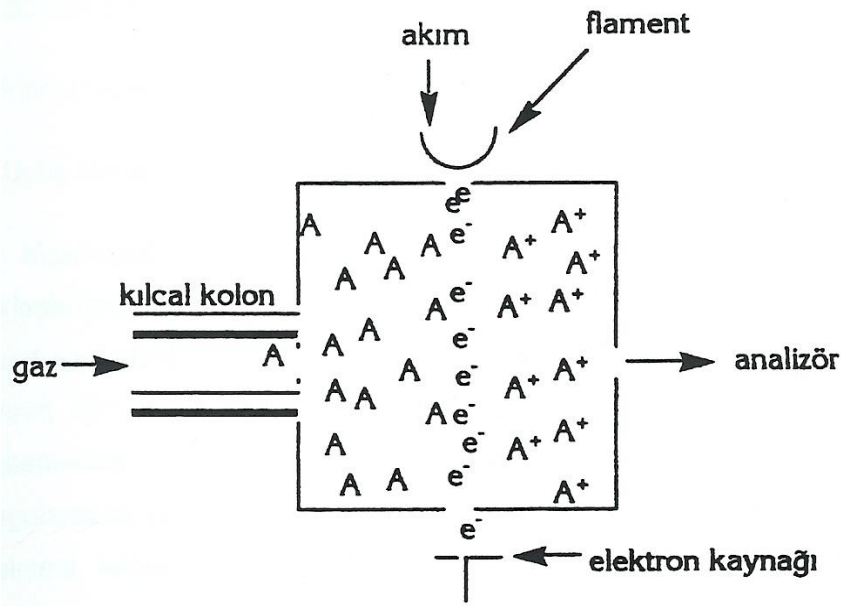
1-3 ml/dak gibi düşük taşıyıcı gaz akış hızları söz konusu olduğunda gerekli basınç düşmesi, kütle spektrometresinin vakum sistemi ile sağlanabilir. Bu nedenle de doğrudan bir ara bağlantı kullanılabilir. Bu durumda hem taşıyıcı gaz hem de numune, taşıyıcı gazın numune moleküllerinden daha büyük hızda pompalandığı kütle spektrometresinin iyon

kaynağına girerler. Yüksek taşıyıcı gaz akışlarından dolayı dolgu kolona uygulanmaz.

2.3.3.2. İyon Kaynağı

Moleküllerin iyonlaştığı bölümdür. Bir molekül, atom veya iyondan bir elektron uzaklaşması olayına iyonizasyon denir. İyonlaştırma teknikleri; gaz, sıvı ve katı gibi maddenin farklı fiziksel durumuna ve maddenin ısısal kararlılığına bağlı olarak seçilir. Gazlar ve sıvılar için elektron ve foton bombardımanlı iyonlaştırma; katılar için ise termal, lazer desorpsiyon, atom bombardımanı, elektrik boşalım ve alan desorpsiyon iyonlaşma uygundur. Günümüzde en çok kullanılan iyonlaştırma teknikleri elektron iyonizasyon ve kimyasal iyonizasyondur. Çalışmamızda elektron iyonizasyon tekniği kullanılmıştır.

Elektron iyonizasyon (EI): EI kısaca analit molekülünün enerjili elektronlarla bombardıman edildiği iyonizasyon yöntemi olarak tanımlanır (Şekil 2.14). Sıcak bir flamandan çıkan elektronlar bölme boyunca odaklanacaklar ve 70 eV'luk bir potansiyele sahip bir elektrot tarafından çekileceklerdir. Böylece her bir elektron 70 eV'luk bir enerji kazanır ve ortama giren numune ile çarpışarak bir seri parçalanma tepkimeleri oluşur. Moleküldeki bağların kırılmasından tüm pozitif ve negatif iyonların oluşmasını sağlayabilecektir. Çoğu organik molekül için pozitif iyon oluşumu enerji açısından daha çok tercih edilir. Elektronun sahip olduğu enerji bağları kırmak için yeterli enerjidir. 70 eV'luk enerjinin kullanılması kararlı, tekrarlanabilir ve moleküle özgü kütle spektrumlarının oluşmasını sağlar. Elektron bombardımanı ile oluşan iyonların bağlı büyüklükleri, iyonize edici elektronların enerjileri ve iyonizasyonun olduğu sıcaklığa bağlıdır.



Şekil 2.14. Elektron bombardımanı ile iyonizasyon (EI)

Kimyasal İyonizasyon (CI): Genellikle düz zincirli aklan, alken veya alkoller gibi homolog bileşikler EI ile kararlı moleküler iyonlara sahip pozitif tanımlama yapılamayacak kadar küçük bağıl çokluğa sahiptirler. CI'nun esası iyon-molekül tepkimelerine dayanır. Yüksek enerjili iyonlar çarpıştıkları moleküle ya proton aktarırlar ya da ondan hidrür ve elektron koparırlar. Kimyasal iyonlaşmalı kütle spektrometresinde (CI-MS), iyon kaynağına reaktif gaz verilerek yüksek basınç elde edilmektedir. Reaktif gaz numune molekülleri ile iç etkileşime girecek reaktif iyonlarını oluşturmak üzere elektron demeti tarafından iyonize edilmektedir. Ortamdaki yüksek basıncın etkisiyle reaktif iyon ile numune iç etkileşime girer. EI'ya göre enerji daha düşüktür.

2.3.3.3. Kütle Analizörü

İyon kaynağından çıkan analit iyonlarını ayırmak ve her birinin kütlesini ölçmek için kütle analizörleri kullanılır. Analizör, kütle/yük (m/z) oranlarına göre maddelerin ayırımının sağlandığı bölümdür.

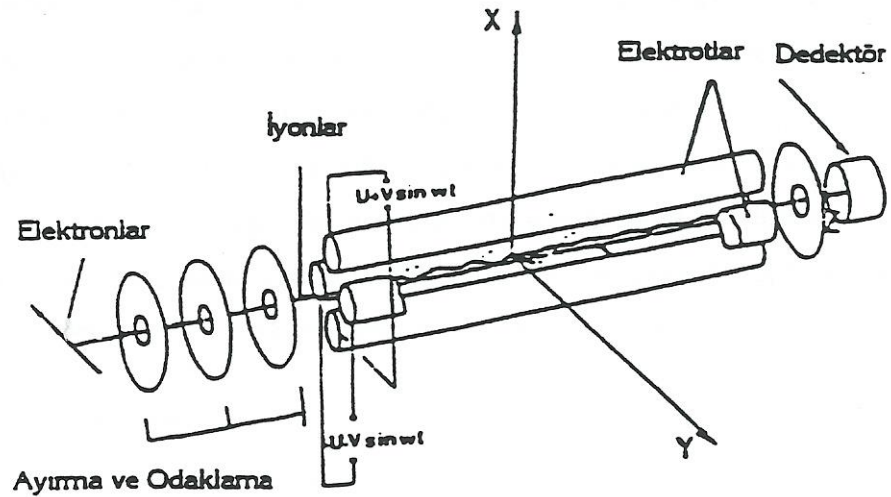
En çok kullanılan kütle analizörleri şunlardır;

1) Manyetik sektörlü kütle analizörü: Elektronlar hızlandırıcı kullanılarak plakalardan ayrılıp, kütle ayırıcıya gelirler. Hızlandırma

potansiyeli çok fazla olduğu için elektronlar aşağı yukarı eşit kinetik enerjiye sahip olurlar. İyonlar manyetik alana girince doğrusal yönden saparak dairesel bir yol izlerler. Bu dairesel yolun yarıçapı, iyonların m/z oranlarına bağlıdır. Manyetik ayırıcılar tek ve çift odaklamalı olabilirler.

2) Uçuş zamanlı kütle analizörü: İyonlar uçuş tüpü adı verilen tüpün içinden geçerler ve bu sırada hızlandırıcının etkisiyle eşit momentuma sahip olurlar. Böylece kütleleri birbirinden farklı olan iyonların hızları da farklı olarak belirlenir.

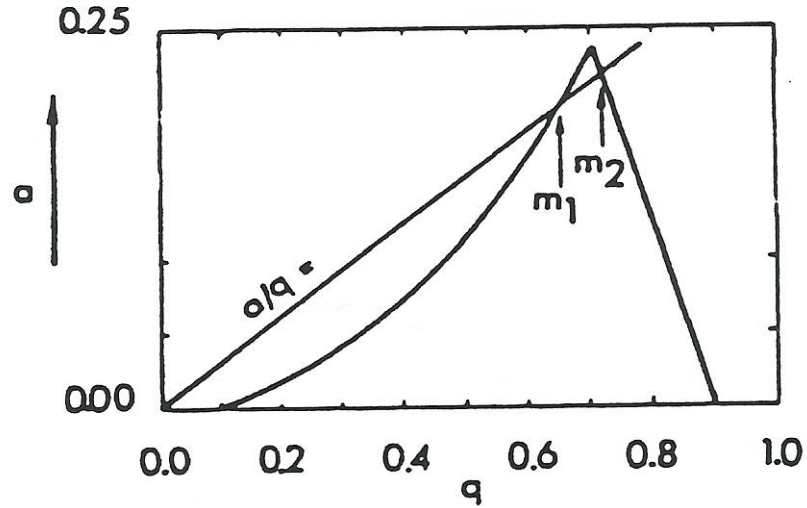
3) Kuadropol kütle analizörü: Kuadropol, eksenlere simetrik olarak yerleştirilmiş olan 4 adet zenginleştirilmiş altın çubuktan oluşmaktadır. Kuadropol kütle analizörünün belirli bir kütle aralığında tarama yapması ve ayırım için radyo frekansı (rf) ve doğru akım (dc) voltajı uygulanır. X eksenindeki çubuklara pozitif, y eksenindeki çubuklara negatif gerilim uygulanarak iyonlaşan örnek moleküllerinin çubuklar arasında rezonansa gelmesi sağlanır. rf voltajının büyüklüğü iyonların kütlesini belirtir. dc voltajının rf voltajına oranı, ayırımı belirtir.



Şekil 2.15. Kuadropol Kütle Analizörü

Kuadropol analizörün en önemli özelliği, tarama hızının büyük olması ve taranan kütle aralığının manyetik sektörlü kütle spektrometrelerine göre sınırlı olmasıdır. Kuadropol analizöründe, yüksek kütlelerde bağıl çokluk fazla

değildir. Filtre edilen kütlelerin farklı olabilmesi için r_f/dc oranı sabit tutularak dc potansiyeli değiştirilir. Bu da Mathieu kararlılık diyagramı ile açıklanır (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Mathieu Kararlılık Diyagramı

Şekil 2.16'daki m , kütle, a , dc voltajını, q , rf voltajını göstermektedir. a ve q değerleri, m/z (kütle/yük) değerlerine bağlıdır. Ancak a/q değerinin altında, m/z değerinden bağımsız olacaktır ki bu, çalışma eğrisini gösterir. Kararlılık sınırlarını iki noktada keser. m_1/z , m_2/z ve bu iki m/z değerleri arasında bulunan tüm iyonlar filtreden geçerek dedekte edilir. Aynı m/z değerine sahip iyonlar aynı a , q grafiğine sahip olacaklardır. Ayırıcılık çalışma eğrisinin eğimine bağlıdır. Doğru tepe noktasına yaklaştıkça ayırıcılık artacaktır. Kütle taraması ya dc ve rf voltajı değiştirilip oranlar sabit tutularak ya da rf ve dc voltajı sabit tutulup frekans değiştirilerek yapılmaktadır.

2.3.3.4. Dedektör

Kütle analizörlerinden geçen iyonlar elektron çoğaltıcı dedektöre ulaşır. Elektron çoğaltıcıda çarpışmadan dolayı oluşan akım önce analog voltaja, sonra da dijital sinyale dönüşür.

En çok kullanılan dedektörler dizi diyot elektron çoğaltıcı (Şekil 2.17.a.) ve devamlı diyot elektron çoğaltıcılardır (Şekil 2.17.b.). Bunlar sinyali

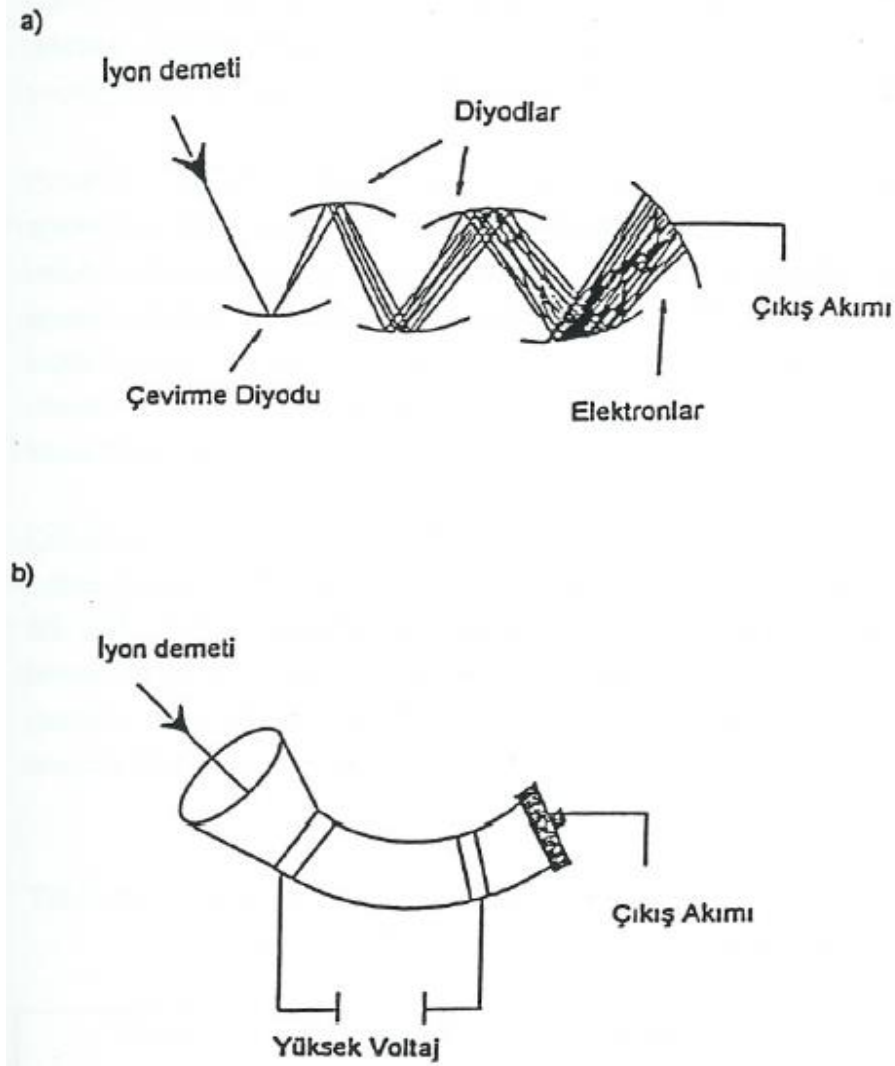
10^7 değerine kadar arttırabilirler. Bu da femtoamper gibi çok düşük iyon akımlarının kaydedilmesini sağlar.

MS'den milisaniye aralıklarla gelen verilerin hızla kaydedilmesi ve depolanması gereklidir ki bu da bir bilgisayarla kolayca sağlanabilmektedir. GC-MS sistemi, ara bağlantı ve veri toplama basamaklarındaki problemlerin çözülmesinden sonra, daha yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan başka aletin kalibrasyonunun otomatik yapılıp, sonuçlarının alınabilmesi, analiz koşullarının kolayca girilmesi, aletin kontrolünün yapılıp verilerin alınabilmesi, analiz sonrası veri değerlendirmelerinin yapılabilmesini bilgisayar sağlamaktadır.

Cihazı yönlendiren bu bilgisayarlar çeşitli işletim sistemleri altında çalışabilmektedir. Kullandığımız cihazda Windows NT işletim sistemi bulunmaktadır.

Analize başlamadan önce ve periyodik aralıklarla kütle spektrometresindeki iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektör kısımlarının, uçuculuğu yüksek ve kararlı organik bileşikler kullanılarak ayarlanması gerekmektedir. Sistemde bu işlem "AUTOTUNE" denilen donanım kullanılarak yapılır. Ayarlama için iyon kaynağının basıncı uygun olmalıdır (10^{-6} torr civarında). Standart olarak kullanılan bileşik çalışılan kütle aralığını kapsamalı ve pik şiddeti yüksek olmalıdır.

Ayarlama bileşiği olarak çalışmamızda kuadropol sistemlerinde standart olarak en çok tercih edilen perflorotribütilamin (PFTBA) kullanılmış ve bu maddeye özgü olan 69, 219, 502 m/z pikleri temel alınmıştır. Şekil 2.18'de cihazın autotune çıktısı verilmektedir. Çalışmada 10-800 atomik kütle birimlik (akb) aralıkta tarama yapılmıştır. Ayarlama sonucunda olması gereken sonuçlar Tablo 2.3'de verilmiştir. Bu sonuçlar elde edilmeden analize başlanmamıştır.



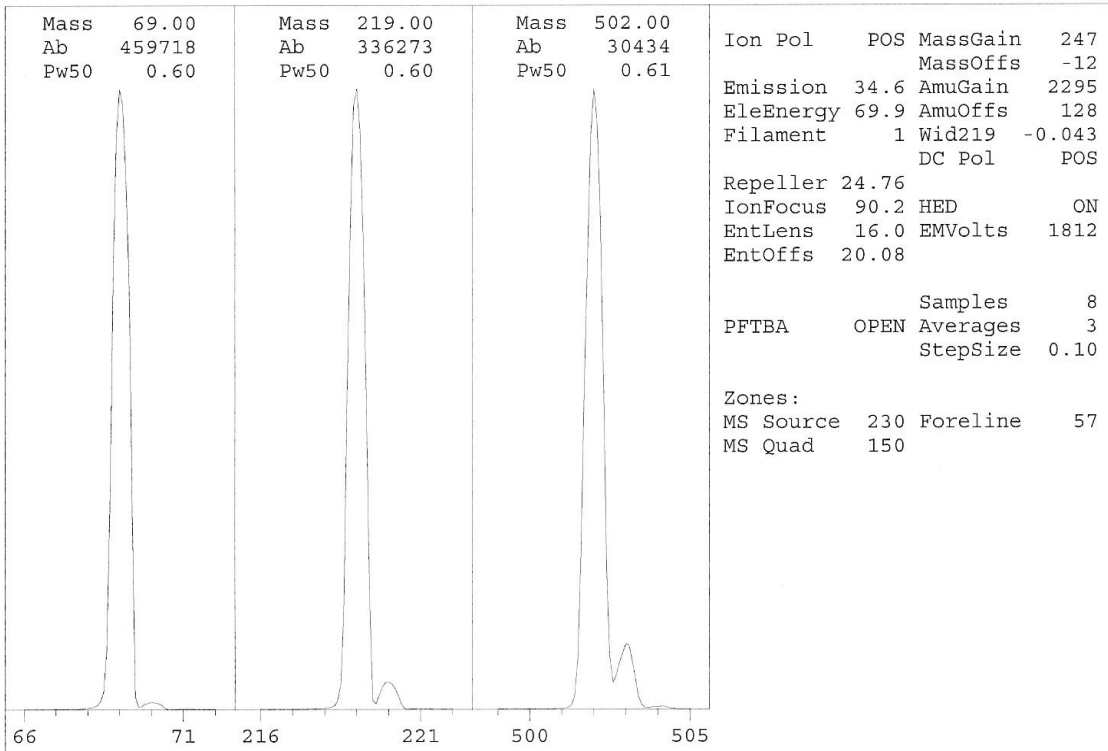
Şekil 2.17.a. Dizi Dinot, **b.** Devamlı Dinot Elektron Çoğaltıcı Dedektörlerin Şematik Gösterilişi

Ayrıca, $m/z=18$ ve 28 (su ve hava) pikleri, $m/z=69$ pikinin %10'undan az olmalıdır. Fazla olduğunda sistemde kaçak olması olasılığı vardır. $m/z=502$ pikinin bağıl çokluğu azaldığında ise iyon kaynağının kirlendiği söylenebilir.

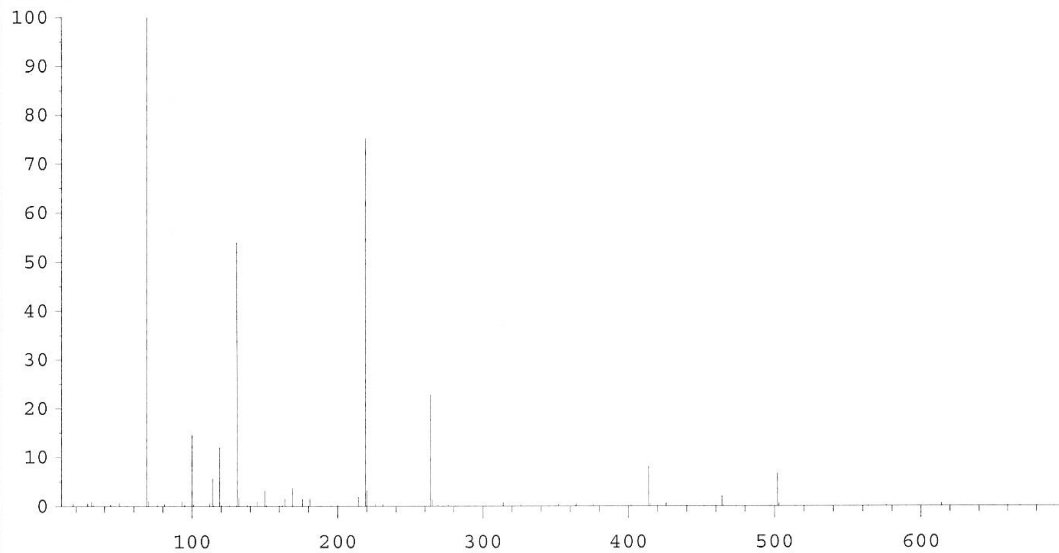
5973 Autotune

Instrument: Instrument #1
Sat Jan 29 13:41:58 2005

C:\MSDCHEM\1\5973N\ATUNE.U



Scan: 10.00 - 700.00 Samples: 8 Thresh: 100 Step: 0.10
154 peaks Base: 69.00 Abundance: 417984



Mass	Abund	Rel Abund	Iso Mass	Iso Abund	Iso Ratio
69.00	417984	100.00	70.00	4748	1.14
219.00	314432	75.23	220.00	13531	4.30
502.00	28296	6.77	503.00	2860	10.11

Şekil 2.18. GC-MSD Cihazının AUTOTUNE Çıktısı

Tablo 2.3. Kütle Spektrometresinin Ayarlanmasında Kullanılan Kütlelerin Bağıl Çoklukları ve İzotop Kütle Oranları

Kütle	Bağıl Çokluk (%)	İzotop Kütle	İzotop Oranı (%)
69.0	100	70.0	0.5 – 1.6
219.0	> 35	220.0	3.2 – 5.4
502.0	> 1	503.0	7.9 – 12.3

Kütle spektrometresi ile analizlerde 3 tip iyon tarama şekli vardır:

- 1) Toplam iyon taraması (TIC): Bir analiz sırasında ayırım yapmadan tüm iyonların 10-800 akb aralığında taratılması ile gerçekleştirilir.
- 2) Seçilen iyon taraması (SIM): Aranılan bileşik için en karakteristik olan, kararlı ve çokluğu fazla olan m/z değerleri seçilip, taratılır. Seçici iyon taramasında seçilen iyonların tarama süresi analizci tarafından seçilir.
- 3) Tek iyon taraması: Tek iyon taratılır. Çok hassastır, ancak kesin tanımlama yapılamaz.

Çalışmamızda TIC çalışma konumunda çokluğu en fazla olan m/z değerleri belirlenmiş ve bunlardan 3 tane iyon seçilerek SIM taraması ile analizler gerçekleştirilmiştir.

2.3.3.5. Vakum Sistemleri

MS cihazı 10^{-6} - 10^{-8} torr civarında çalışmaktadır. MS'de vakum sisteminin olmasını gerektiren nedenler şöyle sıralanabilir:

- 1) Flaman yüksek basınçtaki oksijen altında ısıtılırsa yükseltgenip yanabilir.
- 2) Basınç arttıkça kütledeki çoğaltıcı, kaynak ve analizörde yüksek voltaj kırılmaları olabilir.
- 3) Kütle spektrometresinin iyon kaynağında bulunan gaz, spektral geri zemine katılabilir (örn; su azot ve oksijenden gelebilecek m/z: 18, 28 ve 32).

4) Kütle spektrometresinde düşük basınç sağlamanın en önemli nedeni, analiz edilen iyonlar arasındaki çarpışmayı en aza indirmektir. Çünkü, iyon sürekli diğer moleküller ve yüzeyler ile çarpışıyorsa, iyonları belli bir yolda yönlendirmek için kullanılan güçler yetersiz olacaktır.

5) Yüksek basınç ile analizörün, iyon kaynağının ve odakların kirlenmesi artmaktadır.

6) Yüksek basınç ile spektrum almak ve yorumlamak zordur.

7) Basınç artarken iyon kaynağına doğru olan elektron akımı düzeltmeleri zorlaşır.

8) Vakum sistemi analizörün işlemini gerçekleştirmesi için gereken moleküler ortalama yolu sağlar.

Bu nedenlerden dolayı MS için vakum sistemleri çok önemlidir. MS'de cihaz içindeki basıncı 10^{-6} torr civarında tutmak için değişik pompalar kullanılır. Bunlardan en çok kullanılan pompalar, ön kaba pompalar, turbo moleküler ve difüzyon pompalarıdır. Çalışmamızda turbo difüzyon pompalı MSD kullanılmıştır.

2.4. Gaz Kromatografisinde Türevlendirme

Türevlendirme tepkimeleri kullanımının en önemli nedeni numune bileşiklerine GC için gerekli ısısal kararlılığı ve uçuculuğu sağlamak olup kimyasal türevlendirme aynı zamanda kütle spektrumu verilerinden daha fazla bilgi edinmek için de kullanılmaktadır.

Kimyasal türevlendirmenin MS ile ilişkili olarak kullanılma nedenleri şu şekilde özetlenebilir (31, 32);

- 1) Uçuculuğun artırılması: Kimyasal türevlendirme ile iyonize olabilir gruplarla, iyonize olmayan grupların yeri değiştirilerek uçuculuk artırılır. Bu olay hetero atomlara bağlı (N-H, O-H, S-H) hidrojenleri alkil, açıl, silil veya diğer gruplarla değiştirerek ve hidrojen bağı yapabilen grupların polaritesini azaltarak olmaktadır.
- 2) Maddelerin ısısal kararlılığının artırılması: Bazı fonksiyonel gruplar, GC şartlarında maddenin izomerizasyonu ve parçalanmasını teşvik etmektedir. Aktif grupların eliminasyonu etkileşmeyi azaltmaktadır.

- 3) En düşük miktarların tayin edilebilirliğinin iyileştirilmesi: Yüksek iyon çokluklu spektrometrik parçalanmaların türevlendirme ile sağlanmasıyla bazı bileşiklerin analizinde düşük tayin sınırına ulaşılmaktadır.
 - 4) Ayırıcılığın arttırılması: Türevlendirme ile benzer bileşiklerin izomerlerin ayrılması sağlanmaktadır.
 - 5) Düzgün pik şekillerinin elde edilmesi: Pik simetrisi sağlanarak alıkonma iyileştirilmekte ve pik kuyruklanmaları azaltılmaktadır.
 - 6) Fonksiyonel grupların belirlenmesi kolaylaşmaktadır.
 - 7) Değişik parçalanma modellerinin elde edilmesi mümkün olmaktadır.
- İyi bir türevlendirme işlemi yapmak için şu noktalara dikkat edilmelidir (33);

- 1) İyi bir türevlendirme ajanı zamana karşı kararlı türev oluşturabilmelidir. Yani türevlendirme basamağı hızlı ve basit olmalıdır.
 - 2) Madde tek bir türev oluşturmalıdır. Yan tepkimeler oluşturmamalıdır.
 - 3) Türevlendirme tepkimeleri % 100'lük bir verimle gerçekleşmelidir.
 - 4) Elde edilen türeve ait pik simetrik olmalıdır.
 - 5) Türev, tepkime karışımında en az 24 saat kararlı olmalıdır.
 - 6) GC'deki cevap faktörü yüksek olmalıdır.
 - 7) Kalibrasyon eğrisi en düşük tayin sınırına kadar doğrusal olmalıdır.
 - 8) Ortamda nem ve aktif hidrojen içeren başka maddeler bulunmamalıdır.
- Bunun için türevlendirme ortamı nemden ve diğer safsızlıklardan tamamen arındırılmış olmalıdır.

Türevlendirmede istenmeyen yan etkilere biri olan birkaç türevin birden oluşması duyarlılıkta azalmaya neden olur fakat bileşiğin derişimi yüksekse tanımlanması için yararlı olabilir. Örnek olarak şipamidin tamamlanmamış metillenmesi tri- ve tetrametil türevlerinin bir karışımına yol açar. Bu yan etki kontrollü ve tekrarlanabilir koşullarda, deneyimli bir uzmanın şipamidin varlığını doğrulaması için kullanılabilir.

Başlıca türevlendirme yöntemleri; sililleme, açilleme, alkilleme ve siklik türevlerin oluşturulmasıdır. Bunlardan diüretiklerin türevlendirilmesi için alkilleme tercih edilmektedir.

Alkilleme bir aktif hidrojenin, bir alkil veya bazen bir aril grubuyla yer değiştirmesiyle oluşur. Karboksilik asitler, alkoller, tiyoller, fenoller, birincil ve ikincil aminler, amitler ve sulfonamitler alkilleme reaksiyonlarına tabi tutulabilecek başlıca fonksiyonel gruplardır. GC-MS analizi için, alkilleme ve daha da çok, metilleme, moleküler ağırlıkta küçük bir azalmaya ve metil türevlerinin uçuculuğuna bağlı olan bazı uygulamalar için ilgi çekici olabilir. Bu özellikle çoklu fonksiyonel gruplu bileşiklerle çalışıldığında geçerlidir.

Alkil türevleri hazırlamak için birçok madde ve yöntem tanımlanmıştır. Alkil halojenürler, başlıca düşük moleküler ağırlıklı alifatik bromürler ve iyodürler (metil, etil, propil, isopropil, vb.) veya benzil ve sbstitt benzil bromürler, alkil türevleri elde etmek için kullanılan en genel maddelerden bazılarıdır.

Diüretik aktivitesine sahip maddelerin doğrudan analizi, bu bileşiklerin çoğunun yapısında bulunan fonksiyonel grupların polar yapılarına bağlı olarak GC ile mümkün değildir. Genelde diüretikleri analiz etmek için metilleme ile türevlendirme yöntemi kullanılır. Üç ana metilleme yöntemi önerilmiştir: Eksraktif metilleme, pirolitik metilleme ve asetonda metil iyodürle metilleme. Metil iyodür ve kuru potasyum karbonatla metilleme, triamterende olduğu gibi amino fonksiyonlarının, buna ek olarak karboksilik asitlerin, sulfonamitlerin ve alkollerin metillenmesine izin verir. Sadece karboksilik asit fonksiyonlu bileşikler için metilleme inkbasyonsuz görülebilir; bununla birlikte sulfonamit ve amino gruplu diüretikleri trevlendirmek için 60°C'deki reaksiyon karışımının uzun inkübasyon sürelerine ihtiyaı vardır (34).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler

Metanol (Merck)
Etilasetat (Lab-scan, HPLC kalitede)
 K_2CO_3 (Merck)
Aseton (Riedel de Haen, HPLC kalitede)
 NH_3 (%37.5, Merck)
 NH_4Cl (Merck, ekstra saf)
 CH_3I (Fluka)
7-propil teofilin (Sentez)
NaCl (Merck)
Asetazolamit (Sigma)
Furosemit (Sigma)
Klortalidon (European Pharmacopoeia)
Diklofenamit (Sigma)
Azot gazı (N_2) (%99.99 saflıkta BOS)
Taşıyıcı gaz (He) (%99.9 saflıkta BOS)

3.2. Cihazlar

Santrifüj (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0)
Terazi (Sartorius, Research)
Vorteks (Velp Scientifica)
Numune Yoğunlaştırıcı Blok (Techne DB-3)
Vakumlu Desikatör
Etüv (Dedeoğlu)
pH metre (Corning 255)
UV Spektrofotometre (Agilent 8453)
Mikrodalga fırın (Arçelik, MD 554 intellowave)
GC (Agilent 6890)
MSD (Agilent 5973N)
Oto Örnekleyici (Agilent 7683)
Yazıcı (HP LaserJet 4050-C4251A)

Bilgisayar (Agilent G1030AX)

Yazılım (Chemstation WinNT 4.0)

3.3. Diğer Malzemeler

Cam tüp (2 ml)

Deney tüpü

Vial ve insert

Pastör pipet

Cam pipet (1 ve 5 ml'lik)

Otomatik pipet (20-200 µl, 100 µl, 5-50 µl)

Hamilton enjektör (50 µl)

Dispenser (10 ml)

3.4. Cam Malzemelerin Temizlenmesi

Cam malzemeler önce çeşme suyu ile yıkanmıştır. 15 dakika 2 N potasyum hidroksit içinde bekletilmiştir. Daha sonra sırasıyla çeşme suyu ve distile su ile temizlenmiş, aseton/metanol azeotropik karışımında bir saat bekletildikten sonra 60°C'lik etüvde kurutulmuştur.

3.5. Çözeltilerin ve Kimyasal Maddelerin Hazırlanması

3.5.1. Stok Standart Çözeltilerin Hazırlanması

7-propil teofilin (iç standart) ve diğer diüretiklerin stok çözeltileri 1000 ppm olacak şekilde metanolde hazırlanmış ve – 20°C'de saklanmıştır. İç standardın 100 ppm'lik çözeltisi ve diüretiklerin 100 ve 10 ppm'lik çözeltileri 1000 ppm'den metanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.5.2. Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

NH₄Cl'ün suda doymuş çözeltisi hazırlanır. Süzülen çözeltiye, pH'sı 9.5 olana kadar %25'lik amonyak ilave edilir. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında saklanır.

3.6. Diüretiklerin Biyolojik Materyalden Analizi

3.6.1. Materyal

Doping numunesi olarak sporculardan alınan materyalin idrar olması nedeniyle çalışmamızda materyal olarak idrar seçilmiştir. Analiz aşamasında; boş idrar, farklı derişimlerde diklofenamit, asetazolamit, klortalidon ve furosemit eklenerek hazırlanmış idrar örnekleri kullanılmıştır. Bu idrar örnekleri her bir madde için ayrı ayrı hazırlanmıştır. İkinci aşama olarak kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla farklı derişimlerde furosemit eklenmiş boş idrarlar analiz için kullanılmıştır. Analizlerimiz boyunca, hiç ilaç kullanmayan bir erkek gönüllüden sabah ilk idrarı alınmış ve analiz edilene kadar -20°C' de saklanmıştır.

3.6.2. Diüretiklerin İdrardan Analizi

Diüretiklerin analizi 4 aşamada gerçekleştirilmektedir.

- Tüketme
- Kurutma
- Türevlendirme
- GC-MS sistemine uygulama

3.6.2.1. Tüketme

Çalışmamızda diüretiklerin idrardan analizi gerçekleştirilmiştir. İdrar birçok kompleks yapılu madde (aminoasit ve yüksek molekül ağırlığına sahip proteinler v.b) içermektedir. Bu maddeler, yapılan analiz çalışmalarında ilgilenilen maddelerin sonuçlarını karmaşık hale getirdiğinden tüketme işleminin yardımı ile ayrılır.

Diüretiklerin tüketilmesinde sıvı-sıvı tüketmesi kullanılmıştır. Diüretiklerin asidik ve bazik davranışları göz önüne alındığında bazik, nötral ve asidik olmak üzere üç gruba ayrıldıkları görülmektedir. Farklı sıvı-sıvı tüketme koşulları (pH, organik çözücü, tuz etkisi) çalışıldıktan sonra, etil asetatla alkaline tüketme (pH 9.5) ve sodyum klorür kullanılarak tuz etkisi etkisini arttırmak, idrarda diüretiklerin tarama prosedürünü en iyi karşılayan yöntemdir (3). Diüretiklerin idrardan tüketme işleminde tüketme çözücüsü

olarak etil asetat kullanılmıştır. Tüketme işlemi için idrar ortamı pH 9.5 amonyak tamponu ile bazikleştirilmiştir.

3.6.2.2. Kurutma

Tüketme sonrası idrar örnekleri etil asetat içine çekildikten sonra, 40-45°C'de azot gazı altında uçurulur ve 30 dakika vakum desikatöründe kurutularak türevlendirme işlemine hazır hale getirilir. Desikatörde potasyum hidroksit ve fosfor pentaoksit kullanılmıştır.

3.6.2.3. Türevlendirme

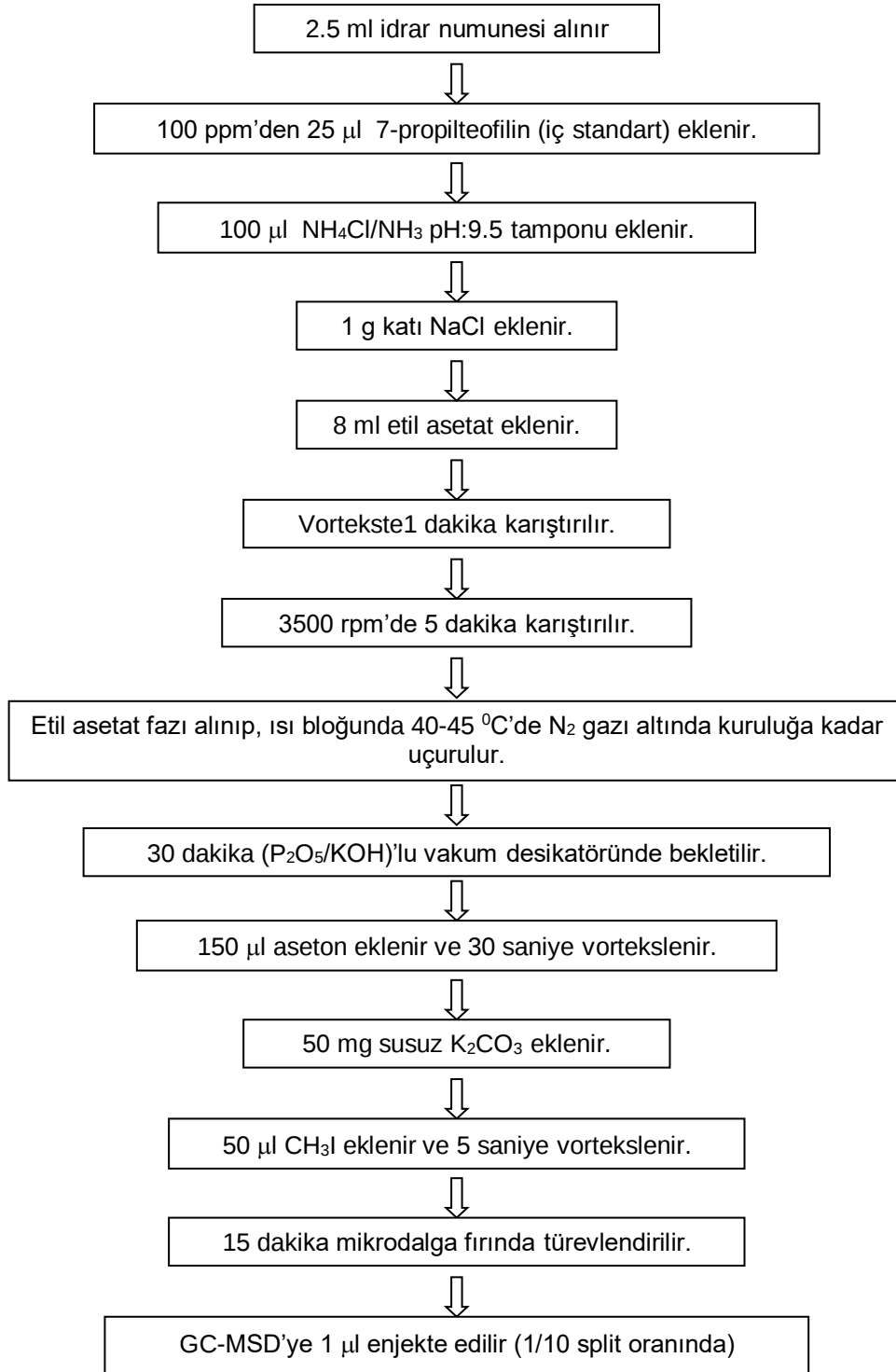
Çalışmamızda türevlendirme basamağı diğer metilleme yöntemleriyle de karşılaştırıldığında çok sayıda bileşiği türevlendirdiğinden asetonda metil iyodürle gerçekleştirilmiştir. Bunun için 150 µl aseton ve 50 µl metil iyodür kullanılmış ve inkübasyon farklı iki şekilde denenmiştir. Birincisinde tüpler 60°C'de üç saat fırında ikincisinde ise 15 dakika 800 W mikrodalga fırında ağzı kapalı deney tüplerinde bekletilmişlerdir.

3.6.2.4. GC-MS Sistemine Uygulama

İdrara eklenen furosemit, diklofenamit, asetazolamit ve klortalidon etil asetat ile tüketilmiştir. Elde edilen eluat metil iyodür ile türevlendirilip, metillenmiş türevleri haline getirildikten sonra viallere konulup otomatik numune toplatıcısına yerleştirilmiştir. GC-MS parametreleri hazırlanıp bilgisayar sistemine girdikten sonra kütle spektrometresi ayarlanıp, analiz için iyonlar belirlenmiştir. Sabit akış modunda, otomatik enjektör tarafından viallerden alınan 1 µl'lik hacimde numune GC'ye enjekte edilmiştir. Analiz akış şeması Şekil 3.1'de, GC-MS parametreleri de Tablo 3.1 de gösterilmiştir (3, 35).

Enjekte edilen numuneler ilk önce SCAN (Toplam İyon Taraması) modunda analiz edilmiştir. 70-750 atomik kütle birimi (akb) aralığında bütün iyonlar taratılmıştır. Çözücünün atıldığı zamanın (solvent delay), 1.6 dakika olarak alınması uygun görülmüştür. SCAN sonuçlarına göre analiz ettiğimiz diüretiklerin karakteristik m/z değerlerine göre seçilmiş iyon tarama (SIM) metodu oluşturulmuştur. Kütle spektrometresinde seçilen bu iyonların

dedektörde gözlenmesi için gerekli süreler (dwell time) ile seçilen iyonlar bilgisayar sistemine girilerek tarama gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Analiz Akış Şeması

Tablo 3.1. GC-MS Parametreleri**Sıcaklık:****Kolon** : 160⁰C,**Enjektör Bloğu** : 280⁰C,**Dedektör** : 280⁰C**Sıcaklık Programı** : 160 ⁰C / 20 ⁰C/ dak / 300 ⁰C / 5 dak**Kolon** : 17 m uzunluk , 0.2 mm iç çap , 0.11 µm film kalınlığı,
%100 dimetilpolisiloksan çapraz bağlı kolon**Taşıyıcı gaz** : Helyum (1 ml/dak),**Bölme oranı** : 1/10**Enjeksiyon miktarı:** 1 µl**EPC Modu** : Sabit Akış**İyonizasyon** : EI (70 EV)**Analiz süresi** : 12 dak.**Kayıt tipi** : SIM (dwell zamanı: 20 msn)**3.6.3. Yöntem Geçerli Kılma Çalışmaları**

Yöntem geçerli kılma çalışmaları için doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, özgünlük, tutarlılık, geri kazanım, tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik parametreleri incelenmiştir (36-39).

Geçerli kılma çalışmaları nitel analiz için asetazolamit, diklofenamit, furosemit, klortalidon, nicel analiz için ise furosemit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nitel yöntem validasyonu için özgünlük ve gözlenebilirlik sınırı parametreleri incelenmiştir. Yöntemin özgünlüğü için ayrı ayrı asetazolamit, klortalidon, diklofenamit ve furosemit içeren numunelerin iyonlarına ait kromatogramları, yine bu kromatogramların aynı alıkonma zaman aralığındaki boş idrar, türevlendirme kontrolü ve aseton örneklerinin kromatogramlarıyla karşılaştırılmıştır. Bu kromatogramların matriks ile girişim yapıp yapmadığı araştırılmıştır. Yöntemin gözlenebilirlik sınırı, sinyal/gürültü

(S/G) oranı 3 olduğunda saptanabilen en küçük madde derişimi olarak alınmıştır.

Çalışmamızın ikinci bölümünde furosemit ile yöntemin nicel analiz geçerli kılma parametreleri çalışılmıştır. Öncelikle duyarlılık başlığı altında gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı parametrelerine değinilmiş bunların sonuçları verilmiştir. Alt tayin sınırı herhangi bir analitin doğru ve kesin olarak ölçülebildiği en düşük derişimdir. Yani bağıl standart sapmanın (BSS) % 20'den küçük olduğu madde derişimidir ve kalibrasyon eğrisinin en alt noktası olarak kabul edilmiştir.

Çalışma aralığını bulmak için 15, 30, 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000 ng/ml furosemit içeren idrar numuneleri hazırlanmıştır. Aralık tespit edildikten sonra kalibrasyon eğrisini oluşturmak için 30, 50, 100, 250, 500 ng/ml'lik derişimlerdeki idrara eklenmiş furosemit numuneleri ile çalışılmıştır. Her bir derişim için 6 kez çalışılmıştır. Kalibrasyon eğrisi, furosemit derişimine karşı furosemit pik alanı / iç standart pik alanı oranının grafiğe geçirilmesiyle oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısı önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır (EK 1).

Elde edilen değerlerin birbirine yakınlığını gösteren kesinlik değerleri bağıl standart sapma (BSS) ile verilmiştir. Gün içi kesinlik çalışmaları, aynı gün içinde furosemitin üç farklı derişiminde (30, 50, 100 ng/ml) , 6 bağımsız paralel halinde hazırlanan idrar numunelerinden elde edilen cevapların bağıl standart sapma değerlerinin hesaplanması ile yapılmıştır. Günler arası kesinlik çalışmaları ise yine bu 3 farklı derişimdeki idrar numunelerinin ard arda 6 gün bağımsız olarak hazırlanarak yapılan analizleri ile elde edilen cevapların bağıl standart sapma değerleri ile ifade edilmiştir.

Çalışmalarda elde edilen değerlerin gerçek değere yakınlığını gösteren gün içi ve günler arası doğruluk çalışmaları ise 30, 50, 100 ng/ml olmak üzere idrar numunelerinde hazırlanan 3 farklı furosemit derişiminde yapılmıştır. Doğruluk değerleri % bağıl hata ile verilmiştir. Gün içi doğruluk çalışmaları, aynı gün içinde 3 farklı derişimin 6 kez hazırlanan idrar

örneklerinden elde edilen cevapların % bağıl hata değerlerinin hesaplanması ile yapılmıştır. Günler arası doğruluk değerleri ise 3 farklı derişimdeki idrar numunelerinin ard arda 6 gün hazırlanması ile elde edilen cevapların % bağıl hata değerleri ile ifade edilmiştir (EK 2).

Tutarlılık için; analizci A ve analizci B olmak üzere iki farklı analizci tarafından, 30, 50, 100, 250, 500 ng/ml derişiminde furosemit içerecek şekilde hazırlanan idrar numuneleri (n=6) GC-MS yöntemi ile analiz edilmişlerdir. Bu iki analizci sonucu elde edilen kromatogramlardaki furosemit pik alanı / iç standart pik alanları istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve furosemitin geliştirdiğimiz GC-MS yöntemi ile analizine farklı analizci etkisi incelenmiştir.

İdrarda ve metanolik çözeltide hazırlanan 9 µg/ml furosemit numunelerinin (n=6), tekrarlı analizleri ile geri kazanım değerleri bulunmuştur (EK 3).

Furosemitin GC-MS yöntemi ile analizinde enjeksiyon tekrarlanabilirliği, 50 ng/ml furosemit içeren çözeltinin 6 kez tekrarlanan enjeksiyonu (n=6) ile elde edilen furosemit ve iç standarda ait piklerin alanlarının ve alıkonma zamanlarının bağıl standart sapma değerleri ile gösterilmiştir.

Tekrar elde edilebilirlik değerleri ise furosemitin 30, 50, ve 100 ng/ml olacak şekilde idrarda hazırlanan numunelerini günler arası kesinlik değerlerinden elde edilen bağıl standart sapma değerleridir.

4. BULGULAR

4.1. Yöntem Optimizasyonu

Çalışmamızda bazı diüretiklerin GC-MS ile idrardan analizleri yapılmıştır. Bu diüretiklerin analizi için iç standart olarak 7-propilteofilin kullanılmıştır. Standart diüretik ve 7-propilteofilin çözeltileri azot atmosferi altında ısı bloğunda uçurulmuş ve metil iyodür ile türevlendirildikten sonra GC-MS sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan alıkonma zamanları ve kütle spektrumları belirlenmiştir. Furosemit için m/z değeri 81, 372, 374; diklofenamit için 44, 253, 360; asetazolamit için 108, 249, 264; klortalidon için 176, 287, 363'tür. Elde edilen t_R ve seçilen m/z değerleri ile bir SIM metodu oluşturulmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Asetazolamit, Diklofenamit, Furosemit ve Klortalidon'un Metil Türevleri, Seçilen İyonları ve Alıkonma Zamanları

Madde	Türev	m/z Değerleri	t_R (dak)
Asetazolamit	Trimetil	108, 249, 264	2.54
Diklofenamit	Tetrametil	44, 253, 360	4.18
Furosemit	Trimetil	81, 372, 374	5.47
Klortalidon	Tetrametil	176, 287, 363	5.70

İç standart 7-propilteofilin için m/z değeri 222 ve alıkonma zamanı (t_R) 2.1'dir. Diüretiklerin idrardan analizi için, türevlendirme basamağında iki yöntem karşılaştırılmıştır. Standart yöntemdeki fırında 60°C'de üç saat türevlendirme işlemine alternatif olarak 800 W'lık mikrodalga fırında türevlendirme denenmiştir. Bunun için örneklerin bulunduğu reaksiyon tüplerinin ağzları sıkıca kapatılarak $\leq 100^\circ\text{C}$ 'yi sağlamak amacıyla su banyosuna konularak mikrodalga fırında 800 W güçte türevlendirilmişlerdir. Türevlendirme basamağının optimizasyonunu yapmak için mikrodalga fırında tüplere 10, 15, 20 dakika termal ısıtma uygulanmıştır. Bu optimizasyonla ilgili veriler tablo 4.2 'de gösterilmiştir. Burada optimizasyon için 250 ng'lık

asetazolamit numunesinin 249 iyonuna ait alan; 30 ng'lık diklofenamit numunesinin 44 iyonuna ait alan; 30 ng'lık furosemit numunesinin 81 iyonuna ait alan ve 25 ng'lık klortalidon numunesinin 363 iyonuna ait alan sonuçları verilmiştir. Bu iyonların seçilmesinin nedeni maddelerin bağlı bollukları en fazla iyonlar olmalarıdır.

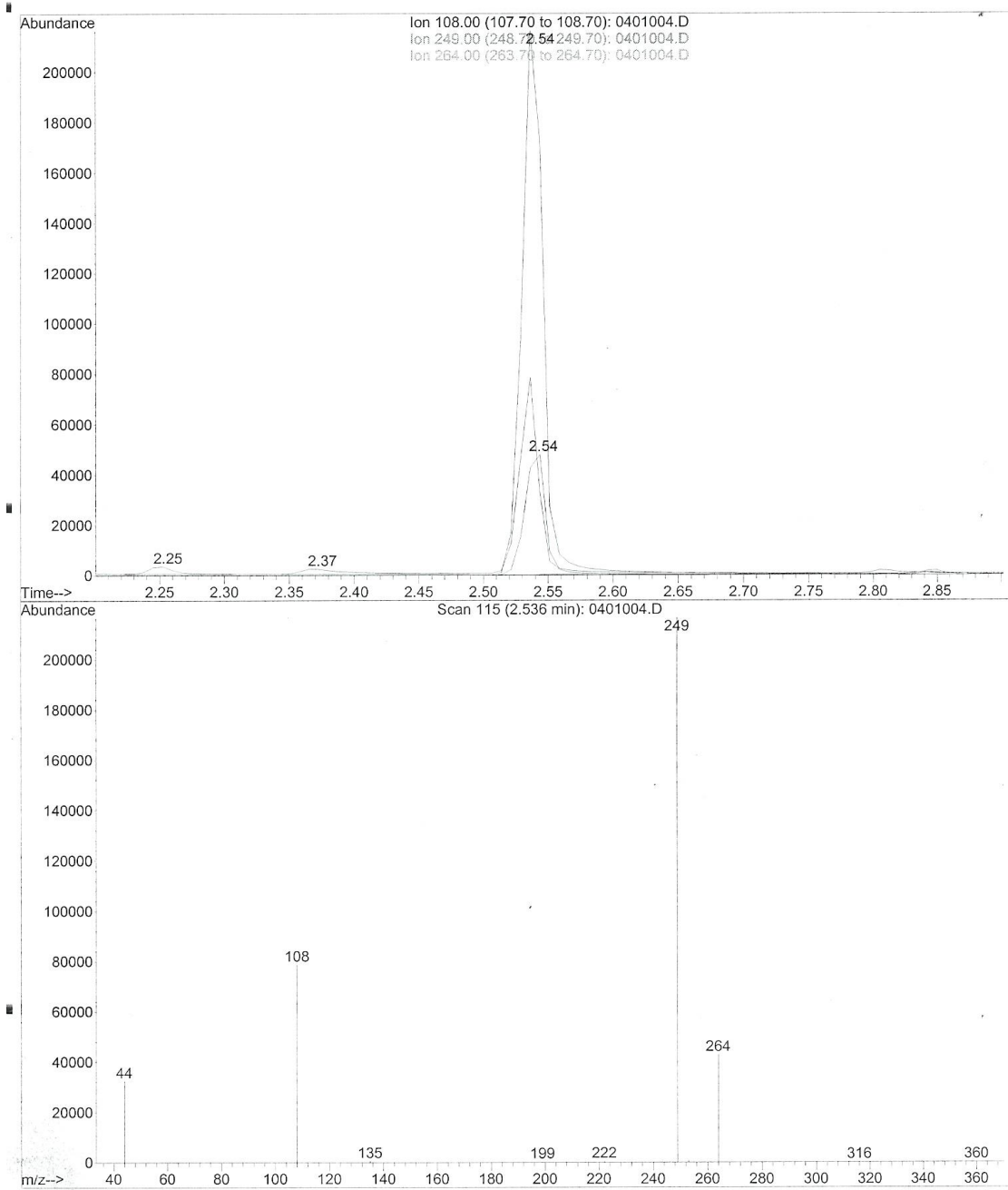
Tablo 4.2. Asetazolamit, Diklofenamit, Furosemit ve Klortalidon'un Mikrodalga Fırın Optimizasyonu için Üç Farklı Sıcaklık Sonuçları

Madde adı	10 dakika sonunda SIM alan	15 dakika sonunda SIM alan	20 dakika sonunda SIM alan
Asetazolamit	13472	8738	6603
Diklofenamit	31298	34356	37665
Furosemit	68400	80897	85164
Klortalidon	5298	16801	22818

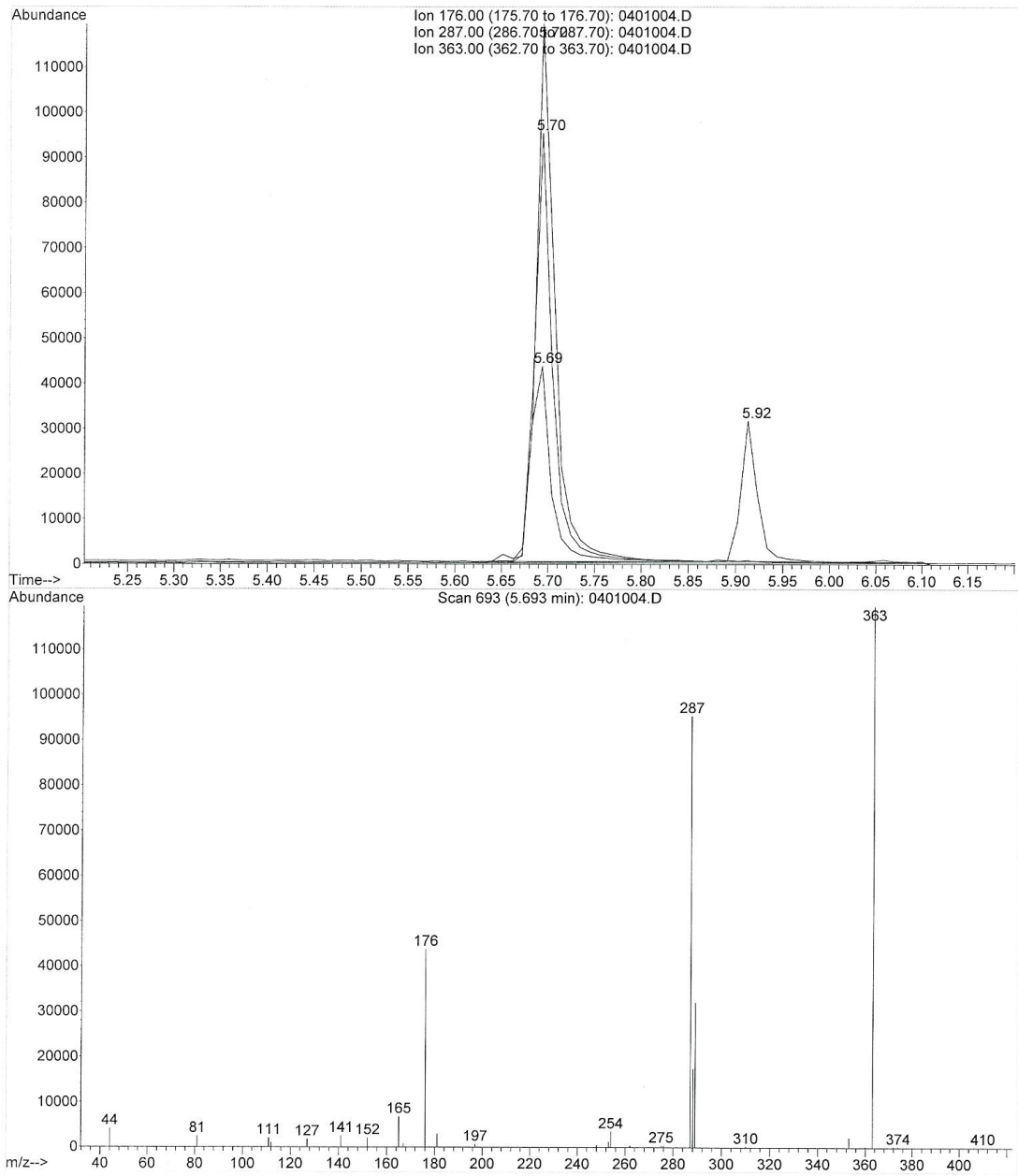
4.2. Yöntem Geçerli Kılma Çalışmaları

4.2.1. Nitel Analize Yönelik Yöntem Geçerli Kılma Çalışmaları

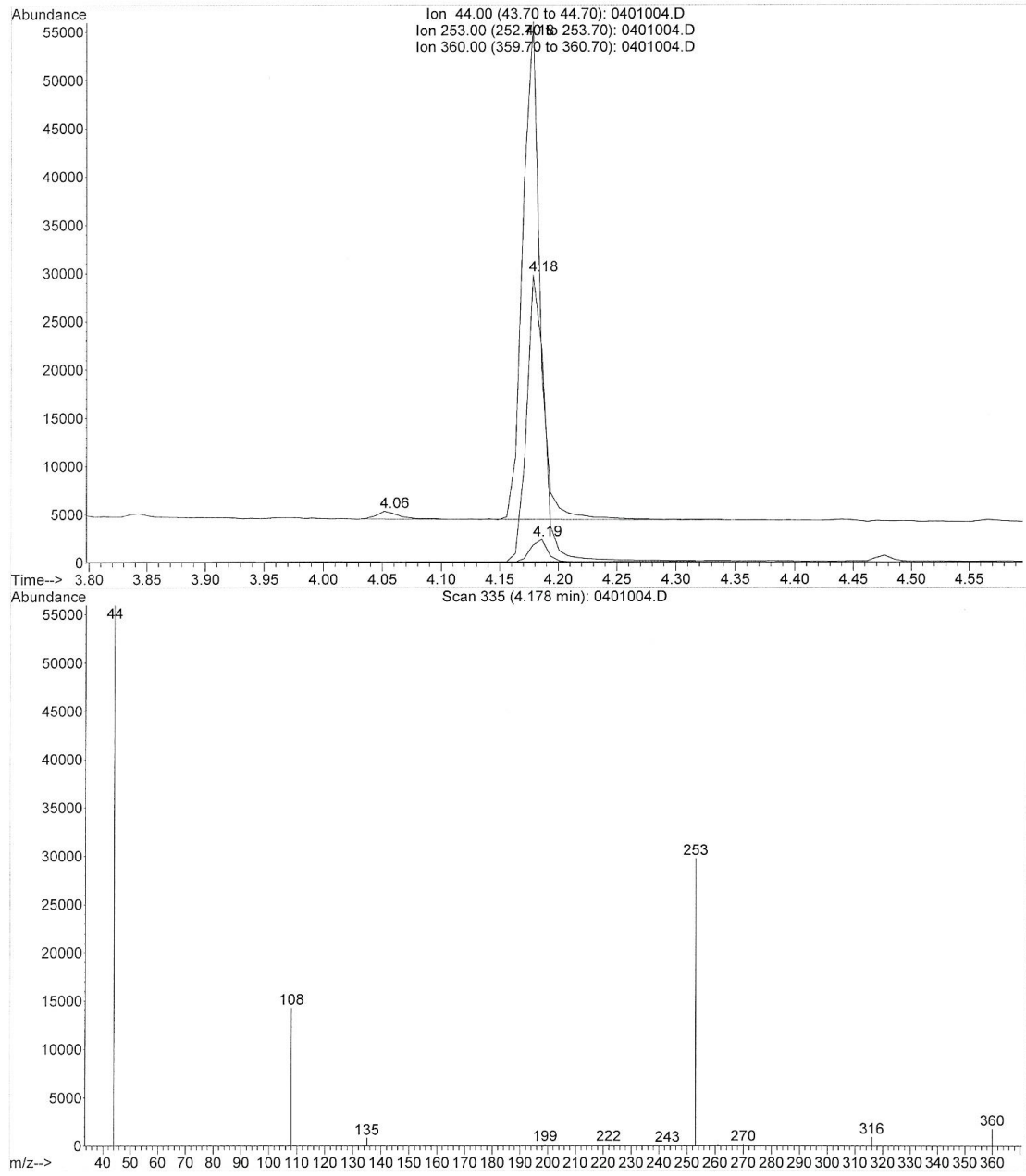
Bunun için asetazolamit, diklofenamit, klortalidon ve furosemit ile çalışılmıştır. Nitel analiz geçerli kılma çalışmaları için özgünlük ve gözlenebilme sınırı parametreleri çalışılmıştır. Bu maddelerin özgünlüğü için geliştirilen metodun maddelere uygulanması sonrasında elde edilen bu maddelere ait iyon kromatogramı ve kütle spekturumu verileri boş idrar, aseton ve türevlendirme kontrolü verileriyle karşılaştırılmıştır. İdrara eklenmiş Asetazolamit, Klortalidon, Diklofenamit ve Furosemit'e ait farklı derişimlerdeki iyon kromatogramları ve kütle spektrumları sıralarıyla verilmiştir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4). Kromatogramlar karşılaştırıldığında asetazolamit (t_R : 2.54), diklofenamit (t_R : 4.18), furosemit (t_R : 5.47) ve klortalidona (t_R : 5.70) ait alıkonma zamanlarında idrar matriksinden, asetondan ve türevlendirme kontrolünden herhangi bir pik gelmediği ve herhangi bir örtüşme olmadığı görülmektedir. Aseton, türevlendirme kontrolü ve boş idrar numunesine ait iyon kromatogramları ve kütle spektrumları sıralarıyla verilmiştir (Şekil 4.5, 4.6, 4.7). Ayrıca maddelere ait iyon kromatogramlarında piklerin saflığından emin olmak amacıyla, pikin çeşitli bölgelerinden kütle spektrumları alınmış ve kütle spektrumunda herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Bu da bize pikin saflığı hakkında sağlam bir kanıt oluşturmaktadır.



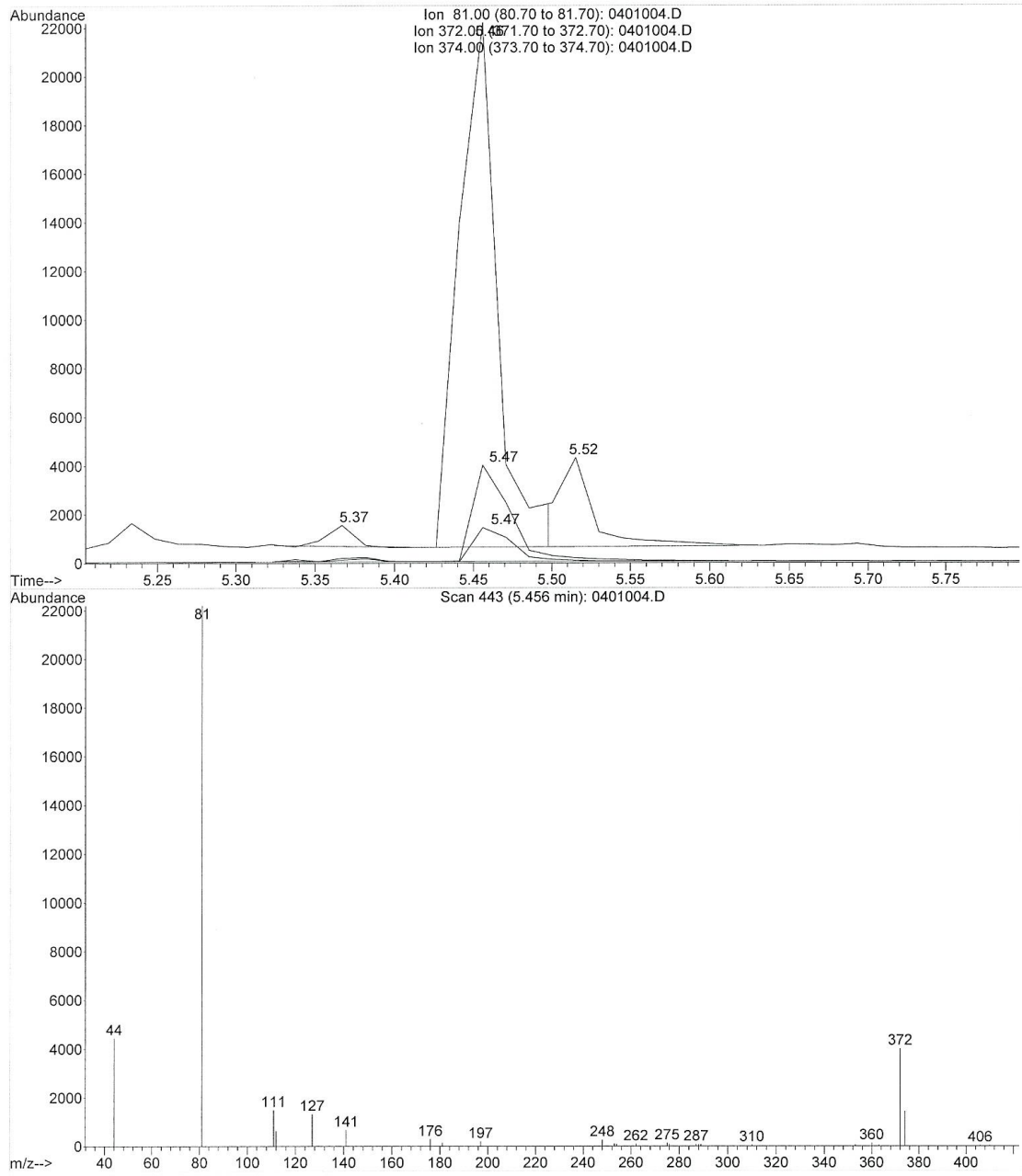
Şekil 4.1. Asetazolamite Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu (5µg/ml)



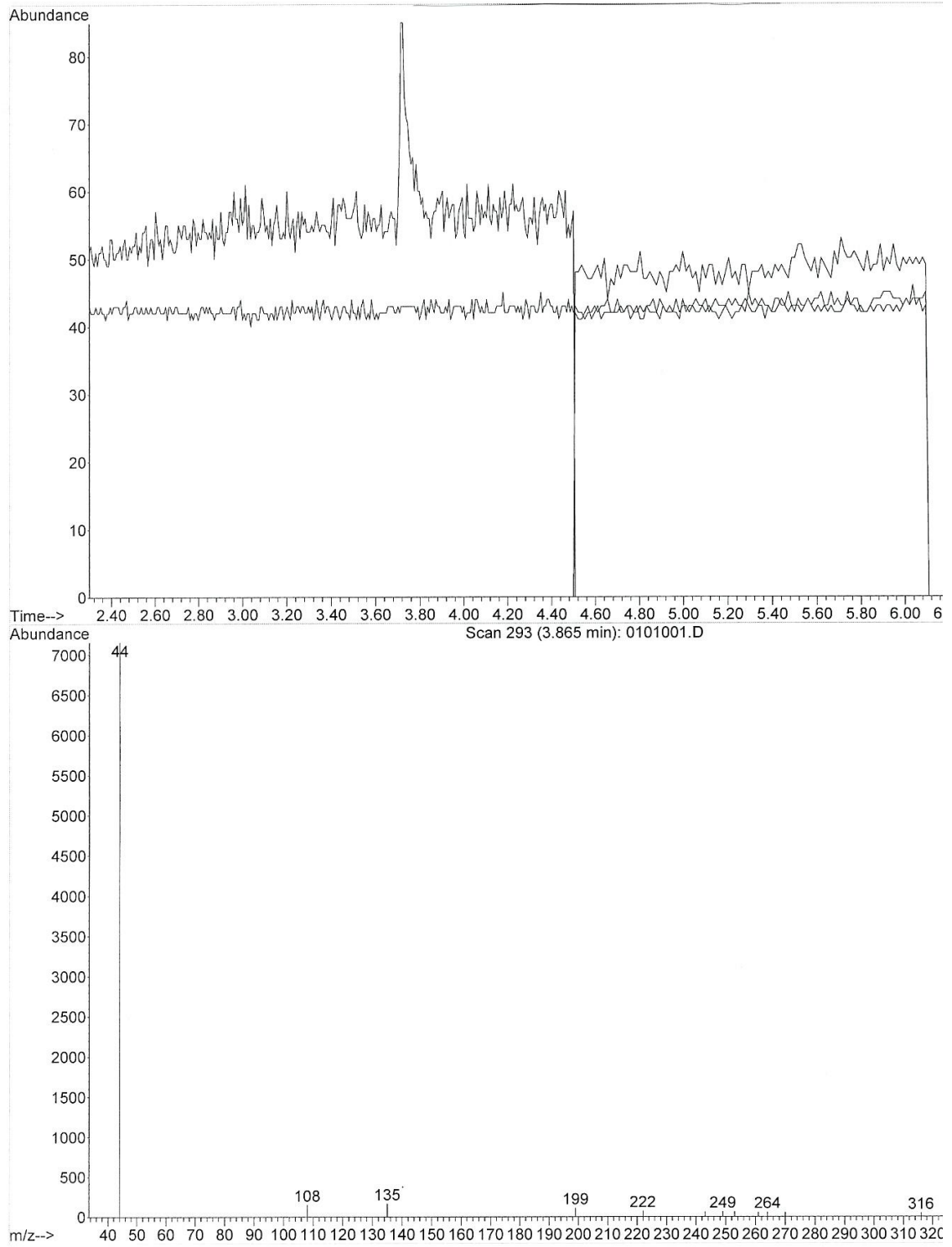
Şekil 4.2. Klortalidona Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu (1µg/ml)



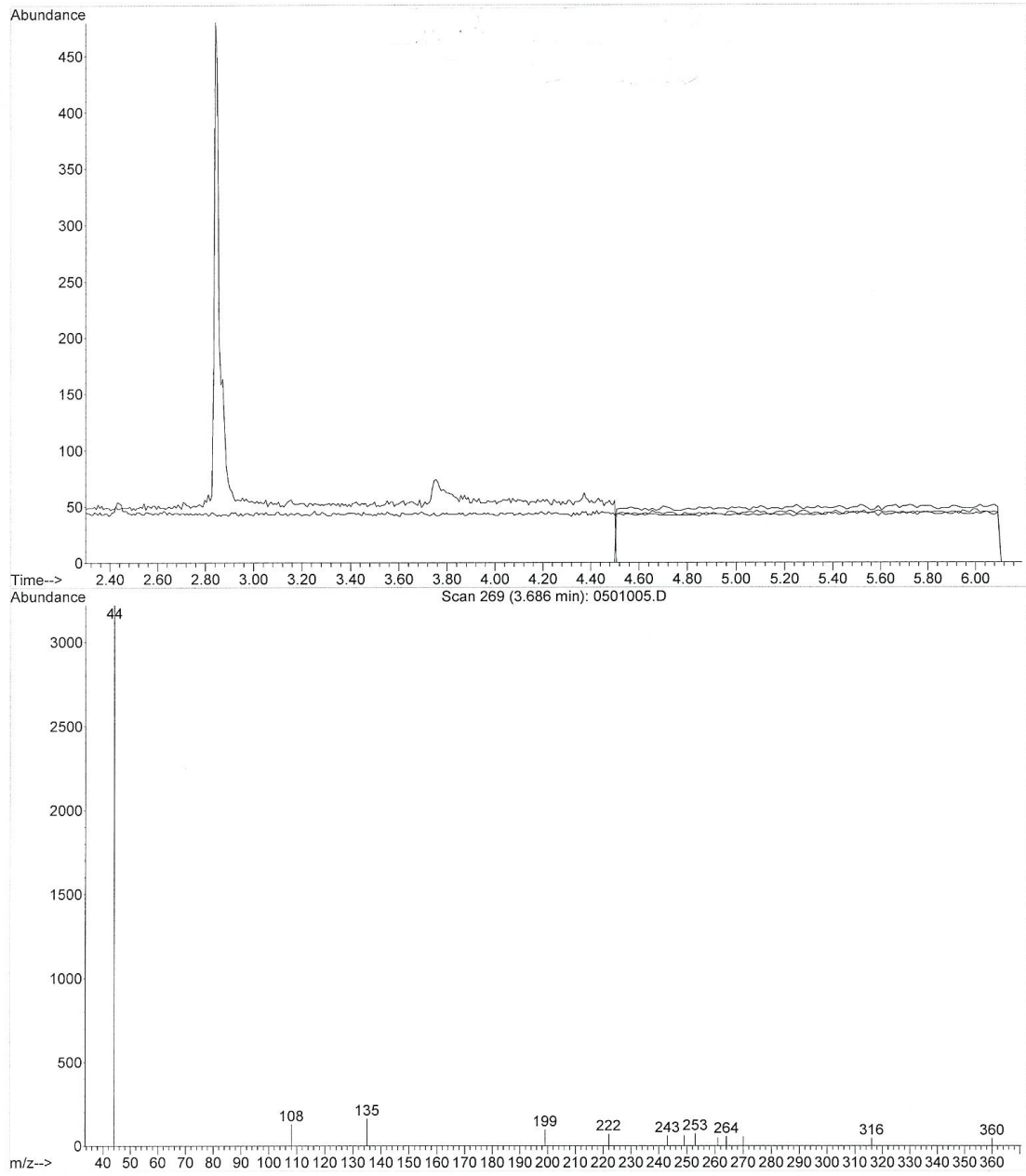
Şekil 4.3. Diklofenamite Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu (500ng/ml)



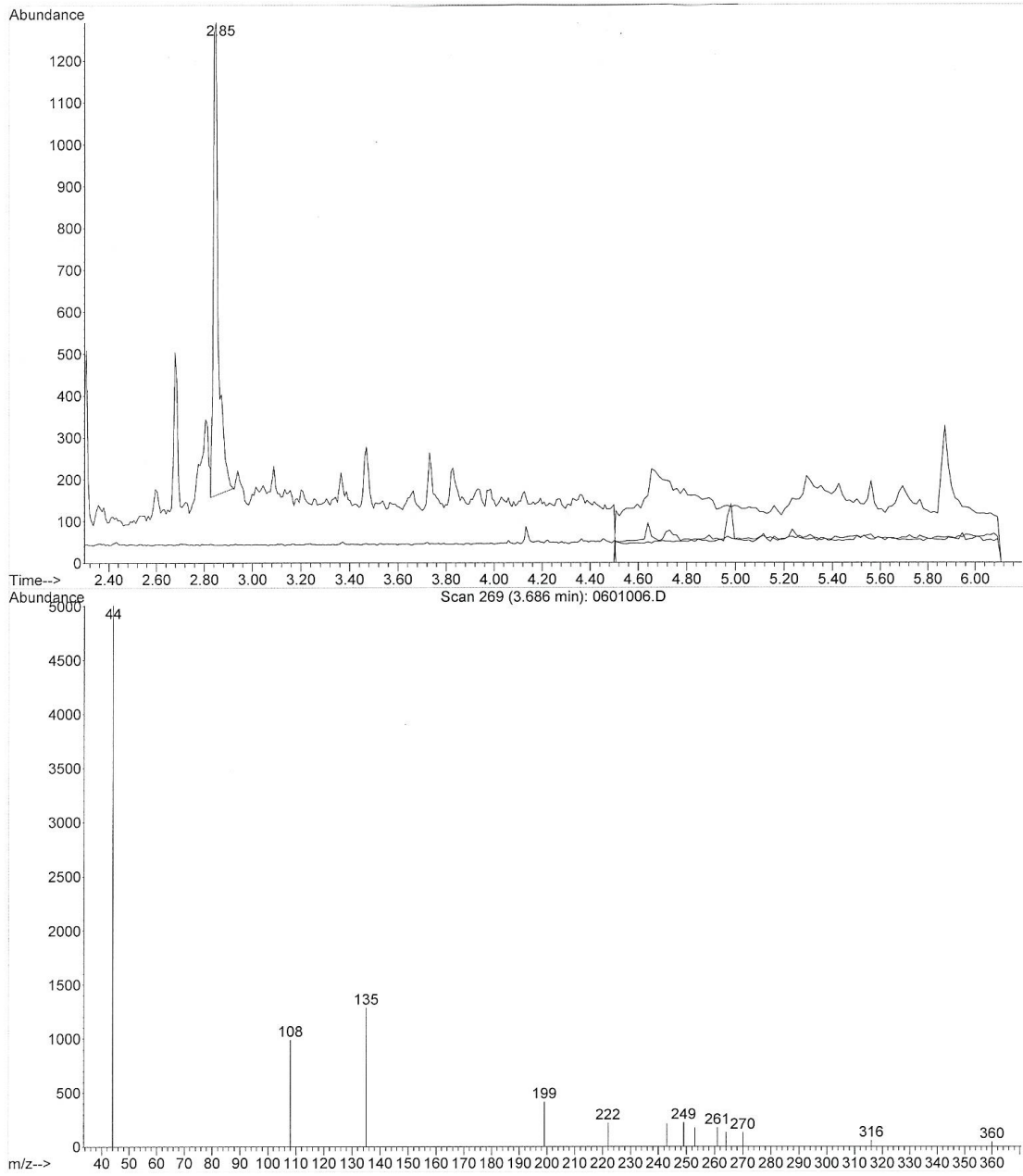
Şekil 4.4. Furosemit Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu (200 ng/ml)



Şekil 4.5. Asetona Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu



Şekil 4.6. Türevlendirme Kontrolüne Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu



Şekil 4.7. Boş İdrara Ait İyon Kromatogramı ve Kütle Spektrumu

Asetazolamit, diklofenamit, klortalidon ve furosemit ait gözlenebilme sınırları Tablo 4.3'de ng cinsinden verilmiştir.

Tablo 4.3. Asetazolamit, Diklofenamit, Furosemit ve Klortalidon'un 3 saat fırında türevlendirme ve mikrodalga fırında türevlendirme sonrası gözlenebilme sınırları

Madde adı	3 saat fırında türevlendirme sonunda gözlenebilme sınırı (ng)	Mikrodalga fırında 15 dakika sonunda gözlenebilme sınırı (ng)
Asetazolamit	250	90
Diklofenamit	28	15
Furosemit	28	15
Klortalidon	20	15

4.2.2. Nicel Analize Yönelik Yöntem Geçerli Kılma Çalışmaları

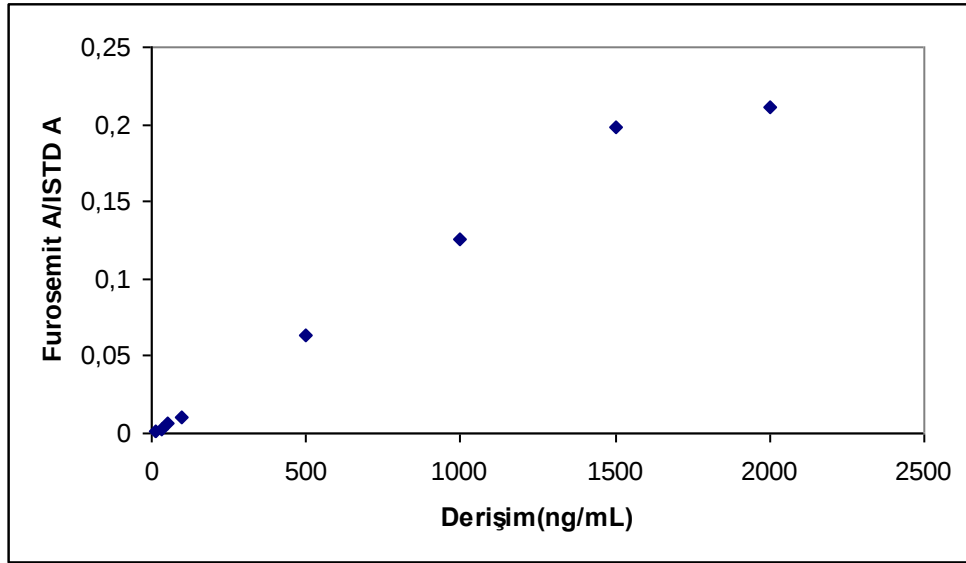
Bunun için Furosemit ile çalışılmıştır.

4.2.2.1. Duyarlılık

Duyarlılık furosemitin gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) verilerini içerir. Yöntemin LOD, sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğunda saptanabilen en küçük furosemit derişimi 15 ng/ml olarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisinin en alt noktasını oluşturan LOQ değerinde ise furosemit derişimi 30 ng/ml'dir. Bu derişimde hesaplanan BSS (bağıl standart sapma) değeri % 20'den küçük (BSS = % 5,67; n=6) bulunduğu için alt tayin sınırı olarak belirlenmiştir.

4.2.2.2. Aralık ve Doğrusallık

Doğrusal bölge çalışma aralığıdır. Bu çalışma aralığının bulunması için 8 farklı derişimde (15, 30, 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000 ng/ml) idrara eklenmiş furosemit tüketme ve türevlendirme işlemlerinden sonra GC-MS sistemine verilmiştir. Bununla ilgili grafik Şekil 4.8'de verilmiştir.

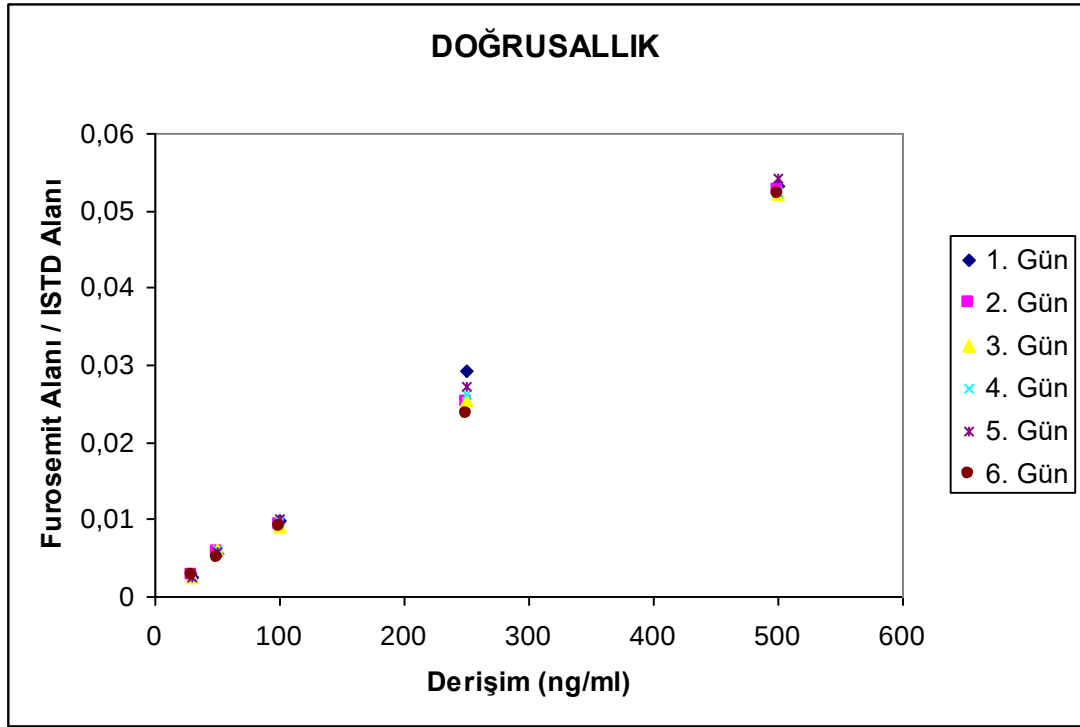


Şekil 4.8. İdrara eklenmiş furosemita ait çalışma aralığının saptanması

Çalışılan 8 derişim değerin regresyon eğrisi çizdirilip, tanımlayıcılık katsayısı değeri (r^2) değeri 0,960 bulunmuştur. Daha sonra aynı işlemler 15-1500 ng/ml derişim aralığı için yapılmış ve burdaki r^2 değeri 0,981 bulunmuştur. Son olarak 30-1500 ng/ml grafiğe geçirildiğinde r^2 değeri 0,999 olarak elde edilmiştir. Bu bize çalışma aralığının değerin 30-1500 ng/ml olduğunu göstermektedir. Bundan sonraki validasyon çalışmaları bu doğrusal bölgeden seçilecek derişim değeri üzerinden yapılacaktır.

Doğrusallık, analit derişimine karşı cevabın işaretlenmesi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin, r^2 en az 0.990 olarak veren derişim aralığı olarak kabul edilmiştir. Doğrusallığın saptanması için idrara 5 farklı derişimde furosemit eklenerek hazırlanmış numuneler 6 farklı günde çalışılarak GC-MS cihazına enjekte edilmiştir. Bununla ilgili grafik Şekil 4.9'de gösterilmiştir.

Kalibrasyon eğrisinin özellikleri, Tablo 4.5'de verilmiştir. Bu eğrinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları ise Tablo 4.6'da yer almaktadır.



Tablo 4.5. GC-MS yöntemi ile analiz ettiğimiz furosemit'e ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri (n=6)

Regresyon denklemini	Eğimin standart hatası	Kesişimin standart hatası	Korelasyon katsayısı (r)	Tanımlayıcılık katsayısı (r ²)
$y=0,0001x-0,0004$	0.0002	0.00004	0.9991	0.9983

y; Furosemit pik alanı / İSTD pik alanı, x; Furosemit derişimi

*Hesaplamalar ve terimler Ek 1'de açıklanmaktadır.

Tablo 4.6. Furosemitin GC-MS yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar*.

Korelasyon katsayısı önem kontrolü						
n	r	S _r	t _H	t _T		
6	0.9991	0,021	47.58	2.78		
Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F _H	F _T
0.001979	0.001982	2.53x10 ⁻⁶	6.33x10 ⁻⁷	0.001979	3127.32	224.60

*Hesaplamalar ve terimler Ek 1’de açıklanmaktadır.

4.2.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Furosemitin GC-MS yöntemi ile analizinde kalibrasyon aralığından seçilen üç farklı derişimde (30, 50, 100 ng/ml) idrara eklenerek hazırlanmış numuneleri çalışılmıştır. Yapılan doğruluk ve kesinlik çalışmaları gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.7. Furosemit İçin Gün İçi ve Günler Arası Kesinlik ve Doğruluk Değerleri

GÜN İÇİ ^a			GÜNLER ARASI ^b	
Derişim (ng/ml)	KESİNLİK	DOĞRULUK (% bağıl hata)	KESİNLİK	DOĞRULUK (% bağıl hata)
30	$\bar{x}$:31,01±0,32 SS: 0,78 BSS: 2,53	-3,37	$\bar{x}$:31,69±0,39 SS: 0,97 BSS:3,05	-5,63
50	$\bar{x}$:50,49±0,43 SS: 1,05 BSS:2,08	-0,98	$\bar{x}$:50,51±0,79 SS: 1,95 BSS: 3,86	-1,02
100	$\bar{x}$: 101,97±0,58 SS: 1,42 BSS:1,39	-1,97	$\bar{x}$:102,71±0,62 SS: 1,53 BSS: 1,49	-2,71

Hesaplamalar Ek 2'de verilmiştir.

^a : Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

^b : Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak altı ayrı günde yapılmıştır.

4.2.2.4. Geri Kazanım

9 µg/ml furosemit içeren idrar numunesine ait (n=6) geri kazanım değeri % 89,72 ± 0,47 olarak hesaplanmıştır (EK 3).

4.2.2.5. Tutarlılık

İki farklı analizci tarafından beş farklı derişimde (30, 50, 100, 250, 500 ng/ml) idrarda hazırlanan furosemit numunelerinin (n=6) GC-MS yöntemi ile analizinden elde edilen furosemit pik alanları istatistiksel olarak karşılaştırılarak, Wilcoxon testi ile değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.7'de gösterilmiş, bu yöntemde farklı analizci etkisi incelenmiştir.

Tablo 4.8. Yöntemin Tutarlılığı İçin İstatistiksel Değerlendirmeler

Derişim ng/ml	Birinci kişi (ort $\pm$ ss)	İkinci kişi (ort $\pm$ ss)	p*
30	29,947 $\pm$ 3,553	26,386 $\pm$ 3,541	0,075
50	61,660 $\pm$ 1,367	61,435 $\pm$ 1,243	0,345
100	99,795 $\pm$ 3,326	95,320 $\pm$ 4,517	0,116
250	265,616 $\pm$ 16,861	260,760 $\pm$ 16,125	0,463
500	531,807 $\pm$ 7,618	534,937 $\pm$ 4,210	0,345

*: Wilcoxon testine göre eğer p değerleri 0.05'den büyükse % 95 güvenlik sınırına göre ölçümler arasındaki fark önemli değildir denir.

4.2.2.6. Cihazın Tekrarlanabilirliği

Furosemitin GC-MS yöntemi ile analizinde enjeksiyon tekrarlanabilirliği, idrara 50 ng/ml olacak şekilde furosemit eklenmesiyle elde edilen numunenin tekrarlı enjeksiyonu (n=6) yapılarak saptanmıştır. Furosemit ve iç standart numunelerine ait piklerin alanlarının ve alıkonma zamanlarının bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Furosemit ve iç standart için pik alanlarının bağıl standart sapma değerleri sırasıyla 1,087 ve 0,47, alıkonma zamanlarının bağıl standart sapma değerleri ise 0,007 ve 0,004 olarak hesaplanmıştır.

4.2.2.7. Tekrar Elde Edilebilirlik

Furosemitin üç farklı derişim düzeyinde hesaplanan günler arası kesinlik değerlerinden ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerlerinin hesaplanması ile tekrar elde edilebilirlik sonuçları elde edilmiştir. Bunun için bkz. Tablo 4.7.

5. TARTIŞMA

Diüretikler idrar oluşumunu ve atılımını arttıran maddelerdir ve sporda iki amaçla kullanılırlar. İdrar miktarını arttırıp, idrardaki doping maddelerinin yoğunluğunu azaltmak, böylece analiz sırasında saptanmasını zorlaştırmak veya ağırlık kategorilerinin yer aldığı spor disiplinlerinde kısa zamanda ağırlık düşmek için kullanılırlar (2).

Diüretikler moleküler yapılarında ve bunun sonucunda da fiziko-kimyasal özelliklerinde büyük farklılıklara sahip bileşikler içerirler. Bu nedenle bu bileşiklerin tümünün analizine olanak sağlayan en geçerli ve en yüksek performansı veren gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemi üzerinde çalışmalarımız gerçekleştirilmiştir. Diüretiklerin GC-MS yöntemi ile analiz edilebilmeleri için uçuculuklarının arttırılmaları gerekmektedir. Bu da türevlendirme yolu ile sağlanmaktadır.

Türevlendirilmiş numunelerin GC-MS sisteminde analizi için kolon dolgu materyalinin doğru seçilmesi sonucunda, pik şekillerinin düzgün ve alıkonma zamanlarının uygun olması gerekir. Karmaşık bileşenler ve bilinmeyen numunelerin analizinde çapraz bağlı eritilmiş silika metilsilikon kılcal kolonlar, geniş aralıkta analiz için en uygun kolon materyalidir ve çalışmalarımızda da bu kolon tipi tercih edilmiştir. Bu tür bir kolon, kararlılığı ve ısıya dayanıklılığı yüksek olduğu için tercih edilmiştir (29).

Çalışmamızda değişime uğramamış diüretikleri idrardan izole etmek için en çok kullanılan tüketme yöntemi olan sıvı-sıvı tüketme kullanılmıştır (bkz. Şekil 3.1.). Etil asetat ile bazik tüketme (pH: 9.5) ve tuz etkisini arttırmak için tuz kullanılması diüretiklerin idrarda analizlerini en iyi şekilde karşılayan bir tarama yöntemidir ve çalışmamızda da tuz kullanılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız diüretikler asetazolamit, klortalidon diklofenamit ve furosemit'tir. Bu maddeler seçilirken olabildiğince farmakolojik özelliklerine göre farklı gruplardan seçilmeye çalışılmıştır. İç standart olarak 7-propilteofilin, türevlendirici madde olarak da iyodometan kullanılmıştır. Fakat prosedürde geçen 60°C'de üç saat türevlendirme çok zaman harcatan bir basamaktır. Çalışmamızda türevlendirme basamağını kısaltmak için mikrodalga fırın kullanılmış, bunun için gerekli olan enerji aktarımı mikrodalga

ışınıma maruz bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Böylece türevlendirme zamanı mikrodalga fırında 800 W gücünde 15 dakikaya indirilmiştir. Tablo 4.2'deki "Asetazolamit, Diklofenamit, Furosemit ve Klortalidon'un Mikrodalga Fırın Optimizasyonu için Üç Farklı Sıcaklık Sonuçları" 'na baktığımızda 15 dakikanın en uygun süre olduğu görülmüştür. Tabloda 20. dakikada diklofenamit, furosemit ve klortalidon'da hafif bir artma olurken, asetazolamit'in türevlenmesi için en uygun olan 10 dakikalık süreden 20 dakikalık süreye geçildiğinde iyon alanındaki düşüşün arttığı gözlenmiştir. Çünkü asetazolamitin iyon piklerinin bağıl bolluklarında ve iyon alanlarında 15. dakikadan sonra bir azalma olurken diğer yanındaki piklerde bir artış olup asetazolamit'in ayırt edilmesini güçleştirmektedirler. Yöntem analiz edilen diüretiklerin tümünü kapsamayı gerektirdiğinden en uygun zamanın 15 dakika olduğu gözlemlenmiştir.

Diüretiklerin GC-MS ile analizlerinde, türevlendirme için mikrodalga fırın kullanarak geliştirdiğimiz yöntemin, önceden diüretiklerin GC-MS ile analizlerinde türevlendirme aşamasında üç saat fırın kullanılan yöntemle göre performansını araştırmak üzere ve Uluslararası Olimpiyat Komitesini ve WADA kuralları gereği yöntemin geçerli kılınmasına ilişkin çalışmalar yapılmıştır. Diüretiklerin analiz edildiği yöntemin geçerli kılınmasını gerektiren kurallar gereği bu yöntemle belirlenen sonuçlar maddelerin niteliğini belirtir şekilde olmasını gerektirdiğinden, başka bir deyişle sonuçlar nicel olmadığından, geçerli kılma parametreleri gerektiğinden buna ait parametreler olan özgünlük ve gözlenebilme sınırı incelenmiştir. Özgünlük için Tablo 4.1'deki asetazolamit, diklofenamit, furosemit ve klortalidon için alıkonma zamanları (t_R) verilebilir. Bunlar da asetazolamit için 2.54, diklofenamit 4.18, furosemit 5.47 ve klortalidon için ise 5.70'dir. Bu maddelere ait iyon kromatogramları ve kütle spektrumları Şekil 4.1-4.4'de verilmiştir. Zemin etkisi ve matriks etkisini incelemek için analizimizde kullanılan türevlendirici madde, aseton ve boş idrarın maddelerimizin analiz edildiği alıkonma zamanlarındaki iyon kromatogramları ve kütle spektrumları incelenmiştir (bkz. Şekil 4.5, 4.6, 4.7). Buradan aseton, türevlendirici madde

ve boş idrarla, maddelerimizin herhangi bir girişim yapmadıkları açıkça görülmektedir.

Diğer bir parametre olan gözlenebilirlik sınırını (LOD) belirlemek için sinyal / gürültü oranının 3 olduğu değer seçilmiştir (37, 38). Bu değer her iki GC-MS yöntemi ile saptanmış ve sonuçları Tablo 4.3'te verilmiştir. Buradan bu değerlerin sırasıyla asetazolamit için fırında türevlendirme sonucunda 250 ng iken 15 dakika mikrodalgada türevlendirme sonucunda 90 ng'a, diklofenamit'in 28 ng'dan 15 ng'a, furosemit'in 28 ng'dan 15 ng'a ve klortalidon'un ise 20 ng'dan 15 ng'a düştüğü görülmektedir. Bu da bize mikrodalga fırın kullanılarak yapılan türevlendirmenin 60 °C'de üç saat fırında yapılan türevlendirmeden daha etkin sonuç verdiğini, yöntemin duyarlılığını arttırdığımızı göstermektedir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında ise yeni geliştirilen bu yöntemin en etkin ve dopingde de en çok kullanılan diüretiklerden biri olan furosemit kullanılarak nicel geçerli kılma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada duyarlılık, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, tutarlılık, cihazın tekrarlanabilirliği ve tekrar elde edilebilirlik parametreleri incelenmiştir.

Duyarlılık için LOD ve LOQ incelenmiştir. Bir yöntemin duyarlılığı birim derişim artışına karşılık gözlenen sinyalin büyüklüğüne bağlıdır. Bu değer kalibrasyon eğrisinin eğimi ile verilmektedir. Eğim ne kadar büyükse duyarlılığı da o kadar yüksektir. Alt tayin sınırının küçük olması da yöntemin duyarlılığının büyük olduğunun göstergesidir (40). Furosemitin gözlenebilme değeri 15 ng/ml'dir. LOQ'nun; bağıl standart sapma değerinin % 20 sınırını geçmemek şartıyla kalibrasyon eğrisindeki en düşük derişim değeridir (37-39). Bu değer GC-MS yöntemi ile furosemitin analizinde 30 ng/ml (BSS % 5,67) olarak bulunmuştur (n=6).

Furosemit derişimi, furosemit pik alanının iç standart pik alanına oranının grafiğe geçirilmesi sonucu elde edilen kalibrasyon eğrisinin 15-1500 ng/ml aralığında istatistiksel olarak ($t_H = 47,58$ ve $F_H = 3127,32$, $p < 0,05$, Tablo 4.6) doğrusal olduğu bulunmuştur.

Tanımlayıcılık katsayıları (r^2) GC-MS yöntemi için 0,9983 olarak bulunmuştur. Bu değer, çizilen kalibrasyon eğrilerinin bir doğru olduğunu

göstermektedir. Ayrıca doğrusallıktan ayrılışın ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolü yapılarak doğrusallıktan ayrılışlarının önemsiz olduğu ve korrelasyon katsayılarının önemli bir değer olduğu (tablo 4.6) istatistiksel olarak hesaplanmıştır (41).

Bir yöntemin doğruluğu, analiz sonuçları ile kabul edilen referans değer arasındaki uyumlu yakınlıktır. Ölçülen ortalama derişimler ve karşılık gelen olması gereken derişimler arasındaki % bağıl hata ile belirlenir. Bir yöntemin kesinliği ise, sonuçların tekrarlanabilirliğinin göstergesidir. Hazırlanan standart numunelerin yapılan tekrarlı analizleri sonucunda saptanan bağıl standart sapma terimi ile tanımlanır (36, 38).

Doğrusallık aralığına giren 3 farklı derişimde (30, 50 ve 100 ng/ml) gün içi ve günler arası tekrarlı analizler yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda elde edilen bulguların bağıl standart sapma değerleri % 1,39 – 2,53 arasında, günler arası çalışmalarda elde edilen bulguların bağıl standart sapma değerleri % 1,49 – 3,86 arasında bulunmuştur (Tablo 4.7).

Standart sapma, dağılımdaki her bir değer ortalama uzaklığını, diğer bir deyişle dağılımın ne yaygınlıkta olduğunu gösteren bir ölçüdür. Standart sapma büyüdükçe dağılım yaygınlaşır (41). Bu tanım dikkate alınırsa her iki yöntem için de elde edilen gün içi ve günler arası çalışma sonuçları, tekrarlanabilirliğin yüksek olduğunu göstermektedir (Tablo 4.7).

Yöntemin uygunluğunu göstermek için yapılan bir çalışma da furosemitin idrardan geri kazanılması çalışmasıdır. Furosemitin (9 µg/ml) geliştirilen GC-MS yöntemi ile idrardan geri kazanım değeri (n=6) % 89,72 ± 0,47 olarak bulunmuştur. Bu da bize yöntemin uygunluğunu göstermektedir.

GC-MS yönteminde elde edilen furosemitin ait pik alanları istatistiksel olarak karşılaştırılarak furosemitin GC-MS yöntemi ile analizine farklı analizci etkisi incelenmiş ve farklı analizci etkisinin olmadığı saptanmıştır. Çalışılan 5 farklı derişim (30, 50, 100, 250, 500 ng/ml) için p değerleri Wilcoxon testine göre hesaplanmış ve % 95 güvenlik sınırına göre bu değerlerin 0,05'den büyük olduğu bulunmuştur. Bu da bize ölçümler arasındaki farkın önemli olmadığını göstermektedir (Tablo 4.8).

Diüretiklerin mikrodalga fırında türevlendirilerek gaz kromatografisi-kütle spektrometresiyle analizleri için geliştirilen yöntemin çalıştığımız diüretikler için, doğru, kesin, duyarlı, seçici ve tekrarlanabilir olduğu gözlenmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda bazı diüretiklerin (asetazolamit, klortalidon, diklofenamit ve furosemit) idrardan analizleri yapılmıştır. Bunun için gaz kromatografisi kütle spektrometresi cihazı kullanılmıştır. Bileşiklerin bu cihazda analiz edilebilmeleri için gerekli olan standart tüketme ve türevlendirme yönteminin 3 saat türevlendirme aşaması olduğundan dolayı bu süreyi kısaltmak için yöntem optimizasyonuna gidilmiştir. Bunun için üç saat 60°C'de fırında türevlendirme yerine 15 dakika mikrodalga fırında türevlendirmenin uygun olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızın ikinci kısmında ise nitel ve nicel analiz geçerli kılma parametreleri incelenmiştir. Geçerli kılma çalışmalarının ilk aşamasında dört diüretik madde için özgünlük ve duyarlılık (gözlenebilme ve alt tayin sınırları) çalışılmıştır. Yöntemin özgünlüğünü göstermek için madde kromatogramları matriks ile karşılaştırılmıştır. Asetazolamit için gözlenebilme sınırı üç saat fırında türevlendirme de 250 ng iken mikrodalga fırınla 90 ng, diklofenamit ve furosemit için önceki yöntemle 28 ng iken mikrodalga fırında 15 ng ve klortalidon için ise önceki yöntemle 20 ng iken, mikrodalga fırında türevlendirme sonrası 15 ng olarak bulunmuştur. Furosemit için nicel yöntem geçerli kılma çalışmaları yapılmıştır. Furosemit'in alt tayin sınırı (BSS = % 5,67 n=6) 30 ng/ml olarak bulunmuştur. Furosemit'in doğrusallığı ise 30-1500 ng/ml olarak saptanmıştır. Bunun için kalibrasyon denklemi $y_{ort} = 0,0001x - 0,0004$ ve $r^2_{ort} = 0,9983$ olarak elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi ile yapılan korrelasyon katsayısı ve doğrusallıktan ayrılış önem kontrollerinin ardından eğrinin doğrusal ve korrelasyon katsayılarının önemli bir değer olduğu saptanmıştır. Kesinlik çalışmaları sonucunda üç farklı derişimle yapılan gün içi değerleri için bağıl standart sapma 1,39-2,53 arasında, günler arası çalışmalar için bu değer 1,49-3,86 arasında bulunmuştur. Gün içi doğruluk için % bağıl hata değerleri -0,98 ile -3,37 arasında, günler arası % bağıl hata değerleri -1,02 ile -5,63 arasında bulunmuştur. Tutarlılık çalışmasında ise, beş farklı derişimde çalışılan Furosemit örnekleri, Wilcoxon testine göre değerlendirilerek değerlerin % 95 güvenlik sınırına göre 0.05 den büyük

olduğu ve ölçümler arasındaki farkın önemli olmadığı görülmüştür. Geri kazanım 9 µg/ml furosemit için % 89,72 ± 0,47 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak geçerli kılma parametreleri incelendiğinde yöntemimizin doğru, kesin ,duyarlı, seçici ve tekrarlanabilir olması nedeniyle mikrodalga fırın kullanarak diüretiklerin gaz kromatografisi-kütle spektrometrisiyle analizleri diğer diüretiklere de uygulanabilir ve doping kontrol laboratuvarlarına rutin analiz amacıyla kullanılan bir yöntem olarak önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. Dirks, J.H., ve. Sutton, R.A.L, Diuretics: Physiology, Pharmacology and Clinical Use, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, S 48, 1986.
2. Doping ve Futbolda Performans Arttırma Yöntemleri, Prof. Dr. Turgay Atasü, Uzm. Dr. İlker Yücesir, Form Reklam Hizmetleri, İstanbul, s. 71-72, 2004.
3. Ventura, R., Segura, J., Detection of Diuretic Agents in Doping Control, J. of Chromatography B, 687, 127-144, 1996.
4. Hülya Akgün ve arkadaşları, Farmasötik Kimya, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Cilt 2, 2. Baskı, Ankara, S 907-928, 2004.
5. Prof. Dr. Oğuz Kayaalp, Tıbbi Farmakoloji Cilt:2, 6. baskı Feryal Matbaacılık, S 1483-1492, 1992.
6. Doç Dr. Rüştü Güner, Doping, Türkiye Futbol Federasyonu Doping Mücadele Kurulu, Ankara, S 23-24, Şubat 2000.
7. Herrarez, R., Campins P., ve Sevillano A., Detection of diuretics by liquid chromatography, Chromatographia, 33, 177-203, 1992.
8. Carreras, D., Imaz, C., Navajas, R., Garcia, M.A., Rodriguez, C., Rodriguez, A.F. ve Cortes, R., Comparison of derivatization procedures for the determination diuretics in urine by gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. A, 683, 195-202, 1994.
9. Lisi, A.M., Kazlauskas R, Trout, G.J., Diuretic screening in human urine by gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr., 581, 57-63, 1992.
10. Casy, A.F., Electron-impact mass-spectrometry of diuretic agents, J. Pharm. Biomed. Anal., 5, 247-257, 1987.

11. Ehrhardt, J.D., Negative-ion mass spectra of methylated diuretics, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 6, 349-351, 1992.
12. Ehrhardt, J.D., Extractive methylation of clopamide and indapamide: structures of the derivatives, *Biol. Mass Spectrom.*, 22, 295-301, 1993.
13. Ventura, R., Fraisse, D., Becchi, M., Paise, O., ve Segura, J., Approach to the analysis of diuretics and masking agents by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry in doping control, *J. Chromatogr.*, 562, 723-736, 1991.
14. Ventura, R., Doctoral thesis, Universitat de Barcelona, Barcelona, 1994
15. Brown, S.M., ve Busch, K.L., Application of liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Planar Chromatogr.*, 4, 189, 1991.
16. Jumppanen, J., Siren, H., ve Riekkola, M.L., Screening for diuretics in urine and blood serum by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 652, 441-450, 1993.
17. Gonzalez, E., ve Laserna, J.J., Capillary zone electrophoresis for the rapid screening of banned drugs in sport, *Electrophoresis*, 15, 240-243, 1994.
18. Smith, R. M. *Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry*, John Wiley ve Sons Ltd., New York, S 37-51, 1988.
19. *Gas Chromatography*, HP Instruction Sheet, January, 1989.
20. Hyver, K. J., Sandra, P. *High Resolution Gas Chromatography*, 3rd Edition, HP Company, 21-30, 1989.
21. Stafford, S.S., *Electronic Pressure Control in Gas Chromatography*, Hewlett Packard Company, U.S.A., S 43-51, 1993.
22. *Electronic Pressure Control in Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, Elsevier Science Publishers, B. V., S 11- 35, 1988.

23. Stofford, S.S., Klein, K.J., Larson, P.A., Firror, R.L., Wylie, P.L., Application of Electronic Pressure Control in Capillary Gas Chromatography (Application Note), S 128-141, Oct. 1991.
24. Schomburg, G., Behlau, H., Dielman, R., Weeke, F., Husmann, H., Sampling Techniques in Capillary GC, J. Chromatogr., 142, 87-102, 1997.
25. Willett, J. Gas Chromatography Analytical Chemistry by Open Learning, 5thEd., Kealey, D. (Ed), London, S 65-73, 1991.
26. Karasek, F.W., ve Clement, R.E., Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Elsevier Science Publishers, B.V., S 82, 1988.
27. Buffigton, C.H., Watson, Dedector for Gas Chromatography-A Practical Primer, J.T. (Edts), Copyright Hewlett Packard Co., s. 43-45, 1982.
28. Suelter, C.H., Watson, Practical Aspects of GC/MS, J.T. (Edts). Copyright, John Willey and Sons Ltd., New York, S 2-42, 1990.
29. Constantin, E., Schnell, A., Mass Spectrometry. Ellis Horwood Ltd., London, S 11- 45, 1990.
30. Chapman, J.R., Practical Organic Mass Spectrometry, John Wiley and Sons Ltd., London, S 27-37, 1985.
31. Knapp, D.N., Chemical Derivatization for Mass Spectrometry, Methods in Enzymology, Vol. 193, 315-329, 1990.
32. GC Derivatization Guide, Altech Associates, Inc., Bulletin No. 126.
33. Knapp, D.R., Handbook of Analytical Derivatization Reactions, New York, S:38-51 1979.
34. Segura, J., Ventura, R., Jurado, C., Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents, J. Of Chromatography B, 713, 61-90, 1998.

35. Schanzer, W., in Bellotti, P., Benzi, G., ve Ljunquist, A., Proceedings of the International Athletic Foundation World Symposium on Doping in Sport, International Athletic Foundation, S 89-106, 1988.
36. Shabir, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the international Conference on Harmonization, J. Of Chromatography A, 987, 57-66, 2003.
37. Rewiever Guidance, Validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research, 1994.
38. Hibbert, B., Method validation of modern analytical techniques. Accred Qual Assur, 4, 352-356, 1999.
39. Green, J.M., a practical guide to analytical method validation. Analytical Chemistry, 68, 305A-309A, 1996.
40. Huber, L., Validation and qualification in analytical laboratories. Agilent technologies, Germany, 1998.
41. Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V., Biyoistatistik, Hatipoğlu Yayınevi, 7. Baskı, Ankara, 1997.

EKLER

EK 1. Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü

Bulunan korelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu test edilmiştir.

Testin yapımında işlemler:

1. H_0 : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ($r=0$).
2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{S_r}$$

$$S_r = \left[\frac{1 - r^2}{n - 2} \right]^{1/2} \quad (\text{Korelasyon katsayısının standart hatası})$$

3. Yanılma olasılığı olarak $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi = $n - 2$
5. $\alpha = 0.05$ düzeyinde ve 4. Maddede bulunan serbestlik derecesinde tablo t değerine bakılır.
6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t (t_H) değeri tablo t (t_T) değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
7. Karar: Korelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir ($p < 0.05$) veya korelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir ($p > 0.05$).

Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamları bulunur:
 - a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

$$RKT = \frac{\left[\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n} \right]^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

$$YOAKT = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

c) Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı (RAKT):

$$RAKT = YOAKT - RKT$$

2. Serbestlik dereceleri bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD):

$$RSD = 1$$

b) Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi (YOASD):

$$YOASD = n - 1$$

c) Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi (RASD):

$$RASD = YOASD - RSD$$

3. Kareler ortalamaları bulunur:

a) Regresyon Kareler Ortalaması (RKO):

$$RKO = RKT / RSD$$

b) Regresyondan Ayrılış Kareler Ortalaması (RAKO):

$$RAKO = RAKT / RASD$$

4. H_0 = Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

5. Yanılma olasılığı $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.

$$F = RKO / RAKO$$

7. $p = 0.05$ düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecelerindeki tablo (F_T) değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F (F_H) değeri tablo F (F_T) değerinden büyükse H_0 hipotezi reddeilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır ($p < 0.05$) veya doğrusal değildir ($p > 0.05$).

EK 2. Bağlı Standart Sapma ve % Bağlı Hata Hesaplama Yöntemi

$$\text{Bağıl Standart Sapma (BSS)} = \frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Aritmetik ortalama}} \times 100$$

$$\% \text{ Bağlı Hata} = \frac{(\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan Miktar})}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

EK 3. % Geri Kazanım Hesaplama Yöntemi

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olması Gereken Miktar}} \times 100$$