



**ALBENDAZOL'ÜN BİYOLOJİK ORTAMLARDA
MİKTAR TAYİNİ İÇİN FARKLI ANALİTİK
YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE GEÇERLİLİK
TESTLERİNİN YAPILMASI: TAVŞANLARA
UYGULANMASI VE FARMOKOKİNETİK
PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ**

Elif KESMEN ÖZ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Doktora Tezi - 2017

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

**ALBENDAZOL'ÜN BİYOLOJİK ORTAMLARDA
MİKTAR TAYİNİ İÇİN FARKLI ANALİTİK
YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE GEÇERLİLİK
TESTLERİNİN YAPILMASI: TAVŞANLARA
UYGULANMASI VE FARMOKOKİNETİK
PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ**

Elif KESMEN ÖZ

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**ERZURUM
2017**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**ALBENDAZOL'ÜN BİYOLOJİK ORTAMLARDA MİKTAR TAYİNİ
İÇİN FARKLI ANALİTİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
GEÇERLİLİK TESTLERİNİN YAPILMASI: TAVŞANLARA
UYGULANMASI VE FARMOKOKİNETİK PARAMETRELERİN
BELİRLENMESİ**

Elif KESMEN ÖZ

Tez Savunma Tarihi : 14/02/2017
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Nazan BERGİŞADİ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Erdal DİNÇ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Bilal YILMAZ

Y. Kadioğlu
N. Bergişadi
E. Dinç
Z. Güvenalp
B. Yılmaz

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir


Prof. Dr. Mehtap TAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XVI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kist Hidatiği.....	3
2.2. Yaşam Siklusu	4
2.3. Kesin Tanı.....	5
2.4. Kist Hidatikte Tedavi.....	6
2.4.1. Cerrahi Tedavi	7
2.4.2. Medikal Tedavi	7
2.5. Albendazole	9
2.5.1. Albendazolün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	9
2.5.2. Farmakolojik Özellikler	10
2.5.3. Farmakokinetik Özellikler	11
2.5.3.1. Absorpsiyon ve Metabolizma	11
2.5.3.2. Dağılım	11
2.5.3.3. Biyotransformasyon.....	12
2.5.3.4. Eliminasyon	12
2.5.3.5. Doğrusallık/Doğrusal Olmayan Durum.....	12
2.5.4. Albendazol’ün Güvenlik ve Tolerebilitesi.....	12

2.5.5. Albendazolün Kullanım Şekli ve Dozu	13
2.5.6. Albendazol İçeren Ticari Preparatlar ve İçerikleri.....	14
2.6. Albendazol Sülfoksit ve Albendazol Sülfon.....	14
2.7. Albendazol Analizi İçin Analitik Yöntemleri.....	15
2.8. Spektroskopik Yöntemler	25
2.8.1. Spektroskopi	25
2.8.1.1. Elektromanyetik Işıma (Radyasyon) ve Genel Özellikleri	26
2.8.1.2. Elektromanyetik Spektrum	26
2.8.1.3. Işının Absorpsiyonu ve Absorpsiyon Spektrumu	27
2.8.1.4. Lambert- Beer Kuralı.....	28
2.8.1.5. Lambert-Beer Yasasından Sapmalar	29
2.8.1.6. UV-Görünür Bölge Spektroskopisi	30
2.8.1.7. Analitik Uygulamalarda Spektrofotometre.....	31
2.8.2. LC-MS/MS Yöntemi	32
2.8.2.1. LC-MS/MS'in Avantajları	37
2.8.2.2. LC-MS/MS'in Uygulama Alanları	37
2.9. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	37
2.9.1. Yöntem Geliştirme.....	38
2.9.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon).....	38
2.9.2.1. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon) Nasıl Yapılır?	39
2.9.3. Analitik Yöntem Geçerlilik Test (Validasyon) Parametreleri	39
2.9.3.1. Belirleyicilik/Seçicilik (Specificity/ Selectivity)	40
2.9.3.2. Doğruluk (Accuracuy)	41
2.9.3.3. Kesinlik (Precision)	41
2.9.3.4. Doğrusallık (<i>Linearity</i>) ve Çalışma Aralığı (<i>Range</i>)	42

2.9.3.5. Duyarlılık Limiti (<i>Sensitivity</i>)	42
2.9.3.6. Geri Kazanım (<i>Recovery</i>)	43
2.9.3.7. Sağlamlık /Tutarlılık (<i>Robustness/Ruggedness</i>)	43
2.9.3.8. Özgünlük (Matriks Etkisi)	44
2.9.3.9. Stabilité (<i>Stability</i>)	45
3. MATERYAL VE METOT	46
3.1. Kullanılan Materyaller	46
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	46
3.1.2. Cihazlar	46
3.2. Yöntemler	47
3.2.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Yöntem Şartları	47
3.2.2. LC-MS/MS Yöntem Optimizasyonu	48
3.2.2.1. LC-MS/MS Yöntem Şartları	49
3.2.3. ABZ'nin Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi	49
3.2.4. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması	50
3.2.5. Tavşan Çalışması (Numune Alımı Protokolü ve Deney Hayvanlarına Ait Özellikler)	50
4. BULGULAR	52
4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi	52
4.1.1. Stok, Standart ve Kalite Kontrol Çözeltilerin Hazırlanması	52
4.1.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	53
4.1.2.1. Doğrusallık/Çalışma Aralığı ve Kalibrasyon Eğrisi	53
4.1.2.2. Doğruluk/ Kesinlik	54
4.1.2.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)	55
4.1.2.4. Analitik Geri Kazanım	55

4.2. LC-MS/MS Yöntemi	58
4.2.1. Farmasötik Preparatlarda ABZ ve Metabolitlerinin (ABZSO, ABZSO ₂) Miktar Tayini ve Geçerlilik Testleri (Validasyon)	58
4.2.1.1. Özgünlük (Belirleyicilik).....	58
4.2.1.2. Doğrusalık/Çalışma Aralığı	59
4.2.1.3. Doğruluk/ Kesinlik.....	62
4.2.1.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)	66
4.2.1.5. Geri Kazanım	68
4.2.1.6. ABZ, ABZSO ₂ ve ABZSO'nun Standart Çözeltilerinin Stabilitesi.....	68
4.2.1.7. LC-MS/MS Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	69
4.2.2. ABZ ve Metabolitlerinin (ABZSO, ABZSO ₂) İnsan Plazmasında Miktar Tayini ve Geçerlilik Testleri (Validasyon)	70
4.2.2.1. Plazma Çözeltileri için Özgünlük (Belirleyicilik)	70
4.2.2.2. Doğrusalık/ Çalışma Aralığı	71
4.2.2.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	75
4.2.2.5. Geri Kazanım	75
4.2.2.6. ABZ, ABZSO ve ABZSO ₂ 'nin İnsan Plazma Çözeltilerinin Stabilitesi.....	77
4.2.3. Tavşan Plazmasında ABZ ve Metabolitlerinin (ABZSO, ABZSO ₂) Miktar Tayini ve Geçerlilik Testleri (Validasyon)	79
4.2.3.1. Özgünlük (Belirleyicilik).....	79
4.2.3.2. Doğrusalık/ Çalışma Aralığı	80
4.2.3.3. Doğruluk/ Kesinlik.....	83
4.2.3.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	87
4.2.3.5. Geri Kazanım	89
4.2.3.6. ABZ, ABZSO ve ABZSO ₂ 'nin Plazma Çözeltilerinin Stabilitesi	90

4.2.4. İnsan ve Tavşan Plazması İçin Matriks Etkisi	93
4.3. Tavşanlarda ABZ'nin Farmakokinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	94
5. TARTIŞMA.....	101
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	110
KAYNAKLAR	111
EKLER	119
EK 1. ÖZGEÇMİŞ.....	119
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	120



TEŞEKKÜR

Bu doktora tezi, Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU yöneticiliğinde Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Doktora öğrenimim boyunca, değerli bilgi, deneyim ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU başta olmak üzere,

Çalışmalarımda LC-MS/MS cihazını kullanmama olanak sağlayan Adli Tıp Kurumu Başkanlığı'na ve Adli Tıp Kurumu Erzurum Grup Başkanlığı'na, LC-MS/MS cihazında metot oluşturulmasında yardımcı olan değerleri arkadaşlarım SEM Laboratuvar Cihazları Paz. San ve Tic. A.Ş. Bölge Müdürü Sayın Ceyhun DOLMA'ya ve Sayın Uzman Kimyager Saffet ÇELİK'e, tavşan kanlarının alınmasında yardımcı olan değerli arkadaşım Sayın Doç. Dr. Mesut HALICI'ya ayrıca Sayın Yrd. Dr. Hüseyin Serkan EROL'a, Çalışmalarımda yardımcı olan Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Bilal YILMAZ'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Onur ŞENOL ve Sayın Arş. Gör. Emrah YAMAN'a, çalışmalarımın her aşamasında büyük emeği olan ve bana her konuda destek veren değerli arkadaşlarım Sayın Esra KÖSE'ye , Sayın Hülya ERDOĞAN'a, Sayın İclal ODABAŞI'na ve Sayın Nihal İÇYAR'a ayrıca her zaman beni destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elif KESMEN ÖZ

ÖZET

Albendazol'ün Biyolojik Ortamlarda Miktar Tayini için Farklı Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Geçerlilik Testlerinin Yapılması: Tavşanlara Uygulanması ve Farmokokinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Amaç. Bu çalışmada, farmasötik preparatlarda albendazol miktarının tayini için UV-Görünür Bölge Spektrofometri ve LC-MS/MS yöntemlerinin geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması ayrıca albendazol (ABZ) ve metabolitlerinin [albendazol sülfoksit (ABZSO) ve albendazol sülfon (ABZSO₂)] insan ve tavşan plazmasında belirlenmesi için bir LC-MS/MS yönteminin geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmaktadır. Geliştirilen yöntemlerin, uygulanabilir olduğunu göstermek için hem farmasötik prepatlarda hem de oral olarak albendazol verilen tavşan plazmalarında ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin miktar tayinleri gerçekleştirildi. Ayrıca tavşan çalışmasında farmakokinetik parametreler belirlendi.

Materyal ve Metot. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yönteminde 295.0 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. LC-MS/MS yönteminde ise C₁₈ kolon, izokratik elüsyon ve metanol:su'dan oluşan hareketli faz sistemi kullanıldı.

Bulgular. UV-Görünür Bölge Spektrofometri yönteminin 2-20 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu, bağıl hatanın %7'den bağıl standart sapmanın %0.9'dan küçük ve analitik geri kazanım değerinin ortalama %100.5 olduğu belirlendi.

Standart çözeltiler, insan plazması ve tavşan plazması çalışmalarında LC-MS/MS yönteminin 5-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu ve yöntemin bağıl hatasının ortalama %6.0'dan ve bağıl standart sapmasının ortalama %0.9'dan küçük olduğu tespit edildi. Farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerinin ortalama %100 ve plazmadan (insan ve tavşan) geri kazanım değerinin ortalama %99.5 olduğu belirlendi.

Tavşana oral yoldan verilen Andazol Tablet ve Andazol Süspansiyonun konsantrasyon-zaman grafikleri türetildi ve farmakokinetik parametreler belirlendi.

Sonuç. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan UV-VİS Spektrofometri ve LC-MS/MS yöntemlerinin hem farmasötik preparatlarda hem de plazma çalışmalarında başarıyla uygulanabilir olduğu yapılan çalışmayla gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Albendazol, Farmakokinetik, LC-MS/MS, Metabolit, UV-Görünür Bölge Spektrofotometri

ABSTRACT

Development of Different Analytic Methods and Performance of Validity Tests for The Determination of The Quantity of Albendazole in Biological Media : Application on Rabbits and Determination of The Pharmacokinetic Parameters

Aim. Objective of the present study is to develop UV-VIS Spectrophotometry and LC-MS/MS methods and perform their validity tests for the determination of Albendazole (ABZ) and its metabolites [albendazole sulfoxide (ABZSO) and albendazole sulphon (ABZSO₂)]. Develop LC-MS/MS method in human and rabbit plasma by performing its validity tests. In order to show the applicability of the methods developed, quantity of ABZ, ABZSO and ABZSO₂ was in both pharmaceuticals preparations and in the plasma of rabbit given albendazole orally determined. In addition, pharmacokinetic parameters were determined.

Material and Method. UV-VIS Spectrophotometry was performed at 295.0 nm wavelength. In LC-MS/MS method, study parameters, C18 column, isocratic elution and methanol:water were used.

Results. UV-VIS spectroscopy method was linear in 2-20 µg/mL concentration range, its relative error was lower than 7% and Relative Standard Deviation of the method is better than 0.9% while Mean Analytical Recovery value was 100.5%.

In standard solutions, human plasma and rabbit plasma studies, linearity range was 5-1000 ng/mL, %BH was lower than 6.0% and %RSD was better than 0.9%. Mean Analytical recovery was measured as 100% and 99.5% for pharmaceutical formulations and human plasma, respectively. Concentration-time graphs were derived for oral administration of Andazol tablet and Andazol Suspension and pharmacokinetic parameters were determined.

Conclusion. The applicability of the developed and validated method was monitored in both pharmaceutical formulations and plasma samples LC-MS/MS and UV-Vis spectroscopy methods by this proposed study.

Key words: Albendazole, LC-MS/MS, Metabolite, Pharmacokinetic, UV-Vis Spectrophotometry

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABZ	: Albendazol
ABZSO	: Albendazol Sülfoksit
ABZSO ₂	: Albendazol Sülfon
ABZ-SO ₂ -NH ₂	: Albendazol Amino Sülfon
RBZ	: Ricobendazol
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	: Sıvıkromatografi/ Tandem Kütle Spektrometrisi
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
MeOH	: Metanol
MRM	: Çoklu Reaksiyon izleme (Multiple Reaction Monitoring)
NaOH	: Sodyum Hidroksit
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
ppb	: Nanogram/Mililitre
ppm	: Mikrogram/Mililitre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. <i>E.granulosus</i> evrimi	5
Şekil 2.2. Karaciğer kist hidatiklerinde tedavi algoritmi.....	8
Şekil 2.3. Albendazolün molekül yapısı	9
Şekil 2.4. Albendazol sulfoxit (ABZSO) molekül yapısı	15
Şekil 2.5. Albendazole sülfon (ABZSO ₂) molekül yapısı	15
Şekil 2.6. Elektromanyetik Dalga.....	26
Şekil 2.7. Elektromanyetik spektrum	27
Şekil 2.8. Lamber-Beer Yasası	28
Şekil 2.9. UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi	30
Şekil 2.10. LC-MS/MS'in iç yapısı	32
Şekil 2.11. Triple Kuadrupol Kütle Spektrometresi	33
Şekil 2.12. QQQ cihazındaki bir MRM diyagramı	33
Şekil 2.13. ESI LC-MS/MS	34
Şekil 2.14. %Matriks etkisi formülü.....	45
Şekil 3.1. Agilent technologies 6460 Triple Quand LC/MS cihazı.....	47
Şekil 4.1. 2, 3, 4, 5.5, 6, 7 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda albendazol standart çalışma çözeltilerinin spektrumları	52
Şekil 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde ABZ standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi	53
Şekil 4.3. ABZ kalite kontrol çözeltilerinin (2.5, 5 ve 7.5 µg/mL) UV-Görünür Bölge Spektrumları	54
Şekil 4.4. Andazol (200 mg) ilaç çözeltilerinin spektrumu	56
Şekil 4.5. İlaç çözeltisine eklenen 3 farklı konsantrasyondaki ABZ'nin standart	

çalışma çözeltilerinin spektrumları	57
Şekil 4.6. Metanol'ün LC-MS/MS kromatogram.....	58
Şekil 4.7. 50 ng/mL konsantrasyonlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO ₂ içeren standart karışım çözeltisinin LC-MS/MS kromatogramı.....	59
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltilerinin LC-MS/MS kromatogramı	59
Şekil 4.9. ABZ standart çözeltisinin kalibrasyon eğrisi	60
Şekil 4.10. 500 ng/mL standart ABZ çözeltisinin MRM spektrumları	60
Şekil 4.11. ABZSO standart çözeltisinin kalibrasyon eğrisi	60
Şekil 4.12. 500 ng/mL standart ABZSO çözeltisinin MRM spektrumları	61
Şekil 4.13. ABZSO ₂ standart çözeltisinin kalibrasyon eğrisi	61
Şekil 4.14. 500 ng/mL standart ABZSO ₂ çözeltisinin MRM spektrumları.....	61
Şekil 4.15. 7.5 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZ'nin MRM spektrumları	63
Şekil 4.16. 150 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZ'nin MRM spektrumları	63
Şekil 4.17. 750 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZ'nin MRM spektrumları	63
Şekil 4.18. 7.5 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZSO'nin MRM spektrumları	64
Şekil 4.19. 150 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZSO'nin MRM spektrumları	64
Şekil 4.20. 750 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZSO'nin MRM spektrumları	64
Şekil 4.21. 7.5 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZSO ₂ 'nin MRM	

spektrumları	65
Şekil 4.22. 150 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZSO ₂ 'nin MRM	
spektrumları	65
Şekil 4.23. 750 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZSO ₂ 'nin MRM	
spektrumları	65
Şekil 4.24. 0.1 ng/mL konsantrasyondaki ABZ çözeltisinin kromatografisi	67
Şekil 4.25. 0.2 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO çözeltisinin kromatografisi	67
Şekil 4.26. 0.4 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO ₂ çözeltisinin kromatografisi	67
Şekil 4.27. 50 ng/mL konsantrasyonlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO ₂ karışımını	
içeren plazma çözeltisinin LC-MS/MS kromatogramı	70
Şekil 4.28. Boş insan plazmasının LC-MS/MS kromatogramı	71
Şekil 4.29. Farklı konsantrasyonlarda insan plazma çözeltilerinin LC-MS/MS pikleri.	71
Şekil 4.30. ABZ'nin insan plazması çözeltisi kalibrasyon eğrisi	72
Şekil 4.31. 1000 ng/mL insan plazması çözeltisinde ABZ'nin MRM spektrumları	72
Şekil 4.32. ABZSO'nun insan plazma çözeltisi kalibrasyon eğrisi	72
Şekil 4.33. 1000 ng/mL insan plazması çözeltisinde ABZSO'nun MRM	
spektrumları	73
Şekil 4.34. ABZSO ₂ 'nin insan plazma çözeltisi kalibrasyon eğrisi	73
Şekil 4.35. 1000 ng/mL insan plazması çözeltisinde ABZSO ₂ 'nin MRM	
spektrumları	73
Şekil 4.36. 50 ng/mL konsantrasyonlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO ₂ karışımını	
içeren tavşan plazma çözeltisinin LC-MS/MS kromatogramı	80
Şekil 4.37. Boş tavşan plazmasının LC-MS/MS kromatogramı	80
Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlarda tavşan plazması çözeltilerinin LC-MS/MS	
kromatogramı	81

Şekil 4.39. ABZ'nin tavşan plazması çözeltisi kalibrasyon eğrisi	81
Şekil 4.40. Tavşan plazması çözeltisinde 500 ng/mL konsantrasyonda ABZ'nin MRM spektrumları.....	81
Şekil 4.41. ABZSO'nun tavşan plazması çözeltisi kalibrasyon eğrisi	82
Şekil 4.42. Tavşan plazması çözeltisinde 500 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO'nun MRM spektrumları.....	82
Şekil 4.43. ABZSO ₂ 'nin tavşan plazması çözeltisi kalibrasyon eğrisi.....	82
Şekil 4.44. Tavşan plazması çözeltisinde 500 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO ₂ 'nin MRM spektrumları.....	83
Şekil 4.45. Tavşan plazma çözeltisinde 7.5 ng/mL konsantrasyondaki ABZ'nin MRM spektrumları.....	84
Şekil 4.46. Tavşan plazma çözeltisinde 150 ng/mL konsantrasyondaki ABZ'nin MRM spektrumları.....	84
Şekil 4.47. Tavşan plazma çözeltisinde 750 ng/mL konsantrasyondaki ABZ'nin MRM spektrumları.....	84
Şekil 4.48. Tavşan plazma çözeltisinde 7.5 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO'nun MRM spektrumları.....	85
Şekil 4.49. Tavşan plazma çözeltisinde 150 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO'nun MRM spektrumları.....	85
Şekil 4.50. Tavşan plazma çözeltisinde 750 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO'nun MRM spektrumları.....	85
Şekil 4.51. Tavşan plazma çözeltisinde 7.5 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO ₂ 'nin MRM spektrumları.....	86
Şekil 4.52. Tavşan plazma çözeltisinde 150 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO ₂ 'nin MRM spektrumları.....	86

Şekil 4.53. Tavşan plazma çözeltisinde 750 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO ₂ 'nin	
MRM spektrumları.....	86
Şekil 4.54. 0.1 ng/mL ABZ kromatografisi.....	88
Şekil 4.55. 0.2 ng/mL ABZSO kromatografisi.....	88
Şekil 4.56. 0.4 ng/mL ABZSO ₂ kromatografisi	88
Şekil 4.57. Oda sıcaklığında 24 saat bekletilen standart çözeltinin ABZ	
kromatogramı	92
Şekil 4.58. Oda sıcaklığında 24 saat bekletilen plazma ABZ çözeltisinin	
kromatogramı	93
Şekil 4.59. Andazol ilacı verilmeyen tavşan plazmasının LC-MS/MS kromatogramı ..	95
Şekil 4.60. Andazol ilacı verilmeyen tavşan plazmasında ABZ'nin A) LC-MS/MS	
kromatogramı B)MS/MS spektrumu	95
Şekil 4.61. Andazol ilacı verilmeyen tavşan plazmasında ABZSO'nun A) LC-MS/MS	
kromatogramı B)MS/MS spektrumu	96
Şekil 4.62. Andazol ilacı verilmeyen tavşan plazmasında ABZSO ₂ 'nin;	
A) LC-MS/MS kromatogramı B) MS/MS spektrumu	96
Şekil 4.63. Andazol tabletin oral (35 mg/kg) uygulaması sonucu tavşan	
plazmasının LC-MS/MS kromatogramı	96
Şekil 4.64. Andazol süspansiyon oral (35 mg/kg) uygulaması sonucu tavşan	
plazmasının LC-MS/MS kromatogramı	97
Şekil 4.65. Andazol oral (35 mg/kg) uygulaması sonucunda tavşan plazmasında	
ABZ'nin; A) LC-MS/MS kromatogramı B) MS/MS spektrumu	97
Şekil 4.66. Andazolün oral (35mg/kg) uygulaması sonucunda tavşan plazmasında	
ABZSO'nun; A) LC-MS/MS kromatogramı B)MS/MS spektrumu	97
Şekil 4.67. Andazolün oral (35mg/kg) uygulaması sonucunda tavşan plazmasında	

ABZSO ₂ 'nin; A) LC-MS/MS kromatogramı B)MS/MS spektrumu	98
Şekil 4.68. Andazol tabletin oral verilmesi sonucunda tavşan plazmasında ABZ'nin:	
A- Plazma konsatrasyon-zaman grafiği, B- Plazma logaritma grafiği	98
Şekil 4.69. Andazol tabletin oral verilmesi sonucunda tavşan plazmasında	
ABZSO'in: A- Plazma konsatrasyon-zaman grafiği, B- Plazma	
logaritma grafiği.....	99
Şekil 4.70. Andazol tabletin oral verilmesi sonucunda tavşan plazmasında	
ABZSO ₂ 'nun: A- Plazma konsatrasyon-zaman grafiği, B- Plazma	
logaritma grafiği.....	99
Şekil 4.71. Andazol süspansiyonun oral verilmesi sonucunda tavşan plazmasında	
ABZ'nin: A- Plazma konsatrasyon-zaman grafiği, B- Plazma	
logaritma grafiği.....	100
Şekil 4.72. Andazol süspansiyonun oral verilmesi sonucunda tavşan plazmasında	
ABZSO ₂ 'in: A- Plazma konsatrasyon-zaman grafiği, B- Plazma	
logaritma grafiği.....	100
Şekil 4.73. Andazol süspansiyonun oral verilmesi sonucunda tavşan plazmasında	
ABZSO'nun: A- Plazma konsatrasyon-zaman grafiği, B- Plazma	
logaritma grafiği.....	100

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Karaciğer kist hidatiklerinde tedavi yöntemleri.....	6
Tablo 2.2. Meulemans'ın çalışmasında albendazol ve albendazol sülfoksitin vücut sıvılarında dağılımı (ng/mL)	10
Tablo 3.1. ABZ için spektrofotometre yöntem şartları	48
Tablo 3.2. LC-MS/MS yöntem şartları	49
Tablo 4.1. ABZ standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri	53
Tablo 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6).....	55
Tablo 4.3. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin analitik geri kazanım değerleri	56
Tablo 4.4. Albendazol içeren andazol tabletinin miktar tayini (n=6)	57
Tablo 4.5. ABZ, ABZSO ve ABZSO ₂ standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri	62
Tablo 4.6. ABZ kalite kontrol çözeltilerinin doğruluk ve kesinlik değerleri	66
Tablo 4.7. ABZSO kalite kontrol çözeltilerinin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6) ..	66
Tablo 4.8. ABZSO ₂ kalite kontrol çözeltilerinin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6).	66
Tablo 4.9. Farmasötik preparatlarda standart ekleme yöntemine göre analitik geri kazanım değerleri	68
Tablo 4.10. ABZ'nin Standart Çözeltilerinin Stabilitesi.....	69
Tablo 4.11. ABZSO'in Standart Çözeltilerinin Stabilitesi.....	69
Tablo 4.12. ABZSO ₂ 'nin Standart Çözeltilerinin Stabilitesi	69
Tablo 4.13. LC-MS/MS yöntemiyle albendazol içeren andazol tabletinin miktar	

tayini	70
Tablo 4.14. ABZ, ABZSO ve ABZSO ₂ plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri	74
Tablo 4.15. ABZ plazma çözeltilerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6).....	74
Tablo 4.16. ABZSO plazma çözeltilerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6).....	75
Tablo 4.17. ABZSO ₂ plazma çözeltilerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6).....	75
Tablo 4.18. İnsan plazmasına katım yapılan ABZ çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri	76
Tablo 4.19. İnsan plazmasına katım yapılan ABZSO çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri.....	76
Tablo 4.20. İnsan plazmasına katım yapılan ABZSO ₂ çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri.....	77
Tablo 4.21. ABZ plazma çözeltilerin stabilitesi.....	78
Tablo 4.22. ABZSO plazma çözeltilerin stabilitesi.....	79
Tablo 4.23. ABZSO ₂ plazma çözeltilerin stabilitesi	79
Tablo 4.24. ABZ, ABZSO ve ABZSO ₂ plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri	83
Tablo 4.25. ABZ tavşan plazma çözeltilerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6).....	87
Tablo 4.26. ABZSO tavşan plazma çözeltilerin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6).....	87
Tablo 4.27. ABZSO ₂ tavşan plazma çözeltilerin günüçi ve günler arası doğruluk ve	

kesinlik değerleri (n=6).....	87
Tablo 4.28. Tavşan plazmasına katım yapılan ABZ çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri	89
Tablo 4.29. Tavşan plazmasına katım yapılan ABZSO çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri.....	89
Tablo 4.30. Tavşan plazmasına katım yapılan ABZSO ₂ çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri.....	90
Tablo 4.31. ABZ plazma çözeltilerin stabilitesi.....	91
Tablo 4.32. ABZSO plazma çözeltilerin stabilitesi.....	92
Tablo 4.33. ABZSO ₂ plazma çözeltilerin stabilitesi	92
Tablo 4.34. ABZ için matriks etkisi hesaplama	93
Tablo 4.35. İnsan plazmasında ABZ, ABZSO ve ABZSO ₂ için matriks etkisi (n=3) ...	94
Tablo 4.36. Tavşan plazmasında ABZ, ABZSO ve ABZSO ₂ için matriks etkisi (n=3).....	94
Tablo 4.37. Andazol tabletin (35mg/kg) oral olarak verilen tavşan plazmasında ABZ, ABZSO ve ABZSO ₂ 'nin farmakokinetik parametreleri	98
Tablo 4.38. Andazol süspansiyonun (35mg/kg) oral olarak verilen tavşan plazmasında ABZ, ABZSO ve ABZSO ₂ 'nin farmakokinetik parametreleri	99

1. GİRİŞ

Kist hidatik hastalığı halen dünyanın birçok bölgesinde endemik olarak görülmekte ve bölgemiz ve ülkemiz için yaygın bir sağlık sorunu olarak önemini korumaktadır. Bu hastalık *Echinococcus granulosus*'un larva sestodlarının neden olduğu zoonozdur¹. Kistlerin yaklaşık %50-70'i karaciğerde yerleşir. Afrika'da, Avrupa'nın Akdeniz kıyılarında, Ortadoğu'da, Güney Amerika'da, Yeni Zellanda'da halen endemiktir^{1,2}. Karaciğer kist hidatiğinin temel tedavisi cerrahidir.

Bir farmasötik preparat her türlü kalite kontrolünden geçmesine rağmen yine de hastaya verildiğinde etkisi yetersiz olabilir. Bu yüzden biyolojik ortamlarda ilaç veya diğer maddelerin miktar tayini, teşhisi ve belirlenmesi, ilaç imalat ve piyasa kontrolleri sırasında ilaç etken maddelerinin analizi bilimsel açıdan önemli çalışmalardır. Bu bilgilere göre, plazma albendazol konsantrasyonunun belirlenebilmesi, kist hidatiği tedavisinde yardımcı bir faktör olabilir. Ayrıca gerek imalat ve gerekse piyasa kontrolleri sırasında ilaç etken maddelerinin miktarlarının doğru olarak belirlenmesi ilacın kullanımı açısından çok önemlidir.

Literatür araştırmasında spektrofotometrik, spektroflorometrik, HPLC ve LC-MS/MS yöntemleri ile farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda albendazol miktar tayinine yönelik çalışmalara ulaşılmıştır. Ancak tavşanlarda albendazol'un oral uygulaması sonrası LC-MS/MS ile yapılan bir farmakokinetik çalışmaya rastlanmamıştır.

Son dönemde, kompleks matrislerde örnek hazırlama işlemlerinde kullanılan sistemlerin gelişmiş gereksiniminin minimum düzeyde olması, seçiciliği ve hassasiyetinin gün geçtikçe artması, kalitatif ve kantitatif değerlendirmelerin oldukça kolay yapılabilmesi nedeniyle, LC-MS/MS'ler tercih edilmeye başlanmıştır³.

Bu çalışmada, farmasötik preparatlarda albendazol miktarının belirlenmesi için UV-Görünür Bölge Spektrofometri yönteminin geliştirilmesi ve geçerlilik testlerinin yapılması, ayrıca farmasötik preparatlar ile tavşan ve insan plazmasında albendazol ve metabolitleri olan albendazol sülfoksit ve albendazol sülfonun miktar tayini için bir LC-MS/MS yönteminin geliştirilmesi, geçerlilik testlerinin yapılması; oral olarak albendazol verilen tavşan plazmasında albendazol ve metabolitlerinin miktar analizini yapmak ve farmakokinetik parametreleri belirlemek amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kist Hidatiği

Hidatik kist hastalığı dünyada geniş coğrafi yayılım gösteren zoonozlardan biridir. Bu hastalığa bir yassı solucan olan *Echinococcus granulosus*'un metacestod evresindeki larvası neden olur. Cestoidea sınıfına dâhil bir tenya olan *Echinococcus*'ların dört türü tanımlanmıştır. İnsanda en sık infestasyona sebep olan tür *Echinococcus granulosus*'dur⁴. İnsanlara, yaşam siklusunda yer alan hayvanlar yoluyla bulaşır. Hayvancılığın, özellikle koyun yetiştiriciliğinin yaygın olduğu Akdeniz, Doğu Avrupa, Afrika, Güney Amerika, Orta Doğu, Avustralya, Yeni Zelanda ve Çin gibi bölgelerde sık görülür^{5,6}. *E. Multilocularis* daha nadir görülen alveoler echinococcosis'e neden olur. Arctic bölge, Asya'nın bazı bölgeleri ve batı-orta Avrupa gibi daha soğuk bölgelerde görülür. Primer yerleşim yeri karaciğerdir. *E. vogeli* ve *E. Oligarthus* Güney Amerika'da endemik olarak polikistik echinococcosis'e neden olurlar ve klinik önemleri sınırlıdır^{4,7}.

Echinococcus cinsinin sınıflandırılması⁸:

Alem : Plathyhelminthes

Sınıf : Cestoda

Alt sınıf : Eucestoda

Takım : Cyclopylidea

Aile : Taeniidae

Cinsi : Echinococcus

Echinococcus'un bugün için kabul edilen 4 türü mevcuttur. Bunlar;

1. *Echinococcus granulosus*
2. *Echinococcus vogeli*
3. *Echinococcus multilocularis*

4. *Echinococcus oligarthus*

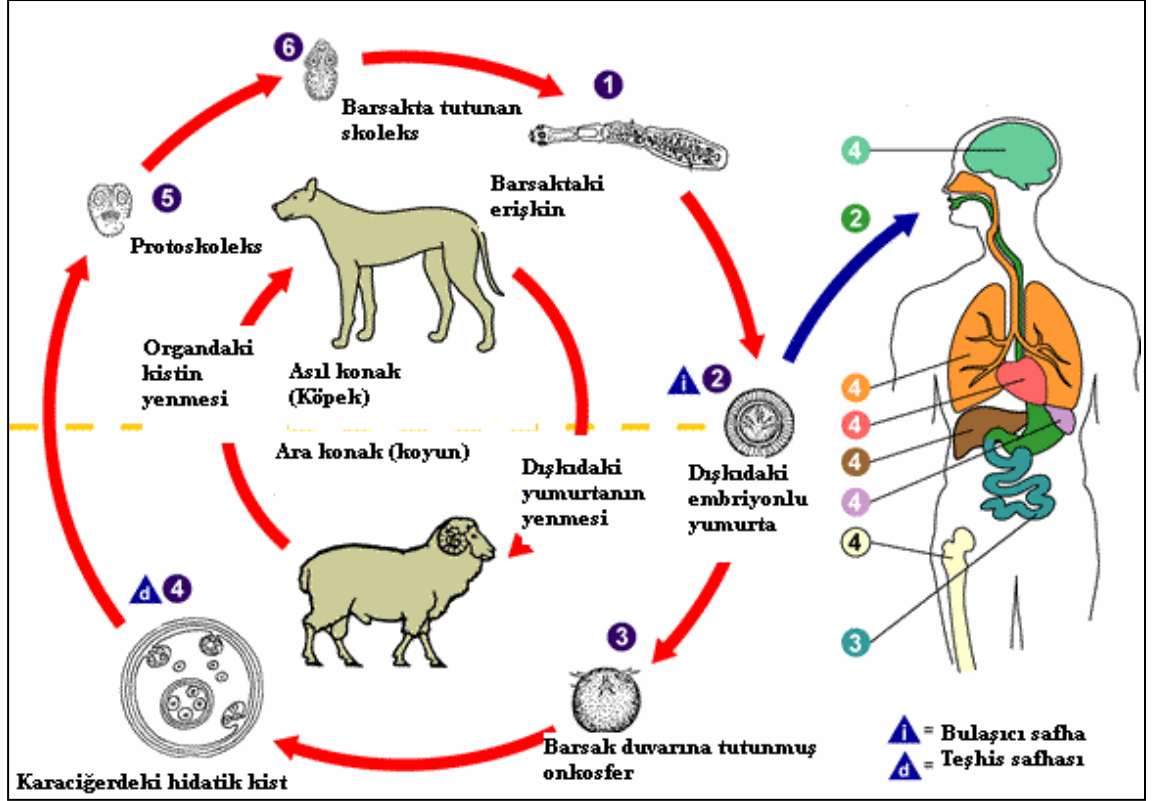
2.2. Yaşam Siklusu

E. granulosus yaşam siklusunu tamamlayabilmek için iki konağa gereksinim duyar. Erişkin formun bulunduğu köpek ve diğer yırtıcı etoburlar ana konak, yumurtadan larva formuna dönüştüğü koyun, keçi gibi otobur canlılar ara konağı oluşturur⁴. *E. Multilocularis* yaşam siklusunda ise tilki ve kurt gibi hayvanlar ana konak, kemirgenler ise ara konak olarak bulunur. İnsan tesadüfi bir arakonaktır⁴. Larval formun insanda gelişimi ile aslında insan, siklusun tamamlanamadığı bir son (“dead-end”) konaktır⁹.

Hastalık fekal-oral yol ile bulaşır. Ana konaktaki tenyanın yumurtaları dışkı ile atılır. Bu dışkı ile kontamine su ve gıdalar ara konaklar tarafından alınır. Ara konağın barsağında yumurtalar safra asitleri ve sindirim enzimleri ile açılır ve ortaya çıkan larvalar barsak mukozasına tutunur. Barsak mukozasında mezenterik dolaşıma katılan parazitler portal sistem yolu ile karaciğere ulaşır. Larvalar 25-30 µ çapındadır. Çoğu, 30 µ çapındaki karaciğer sinüzoidlerini geçemez. Bu nedenle kist hidatik en sık karaciğerde gelişir. Sinüzoidleri geçen larva hepatik ven, vena cava inferior, sağ kalp, pulmoner arterler yolu ile akciğere ulaşır. Akciğerde kapillerin çapı 8 µ’a kadar düşer. Akciğerlere ulaşan larvalar akciğer kapillerlerine takılıp akciğerlerde gelişimlerini tamamlarlar. Akciğerler kist hidatik’in ikinci sıklıkta görüldüğü organdır. Parazit akciğere transdiyafragmatik yol, lenfatik yol ve portokaval anastomozlar yoluyla da gelebilir.

Larva yerleştiği organda kistik metacestod formuna dönüşür. Büyüyen kistin çevresinde endotel hücreleri, eozinofiller ve dev hücreleri içeren, fibroblast ve kapillerden zengin fibröz tabaka oluşur (perikistik tabaka). Kist duvarı ise endokist ve egzokist olmak üzere iki tabakadan oluşmuştur. Mukopolisakkarit yapısında koruyucu dış tabaka egzokist, kız veziküllerin ve skolekslerin doğduğu fertil iç tabaka endokist

olarak adlandırılır. Kistin içinde kaya suyu olarak adlandırılan berrak, steril ancak antijenik yapıda bir sıvı bulunur. İnsanda gelişen hidatik kistler genellikle tektir ve primer kist olarak adlandırılır. Primer kist duvarının rüptürü sonucu kız veziküllerin ve skolekslerin, komşuluk veya kan yolu ile çevre dokulara ve uzak organlara taşınması, sekonder kistlerin oluşmasına neden olur¹⁰.



Şekil 2.1. *E. granulosus* evrimi¹¹

2.3. Kesin Tanı

E. granulosus enfeksiyonunun direkt onaylanma olasılıkları paraziti bulmak, spesifik antijen veya genetik materyalini bulmakla sınırlıdır. Parazitin aranması için invazif uygulamalara gerek vardır (ameliyat veya kist fonksiyonu). Sporadik olgularda *Echinococcus* çengelleri plevral kavite, balgam veya duodenal içerikten saptanabilir. *E. granulosus* tanısında en kolay yol parazitin karakteristik çengellerini bulmaktır. Çengeller fazla sayıdadır. Enfekte veya dejenere kistlerde bile bulunabilir. Fertil kist sıvısında protoskoleksleri bulmak kolaydır. Hidatik sıvı genellikle berraktır. Ancak

bazen safra ile kontamine olabilir. Hidatik sıvının elektrolitlerinin tayini yararlı olabilir. Bu tür sıvı düşük düzeyde sodyum (130±5,25 mEq/l) ve klor (87±9 mEq/l) içerir. *Echinococcus* genetik materyalinin PCR gibi daha özel tekniklerle kolayca saptanabildiği fakat rutin kullanımının kısıtlı olduğu unutulmamalıdır^{12,13}.

2.4. Kist Hidatikte Tedavi

Karaciğer kist hidatikleri tedavisinde temel prensipler, hastalığa sebep olan parazitin ara konak formunun öldürülmesi ve/veya vücuttan uzaklaştırılması, kistin yol açabileceği komplikasyonların önlenmesi boşaltılması ve sorunsuz kapanmasının sağlanmasıdır. İdeal tedavi hem hastalığın iyileştirilmesini tam olarak sağlamalı, hem de morbidite; mortalitesi minimal olmalıdır. Dezenfeksiyon amacı ile kullanılan skolosidal solüsyonların istenmeyen etkilerinin başında anaflaksi, toksisite ve sklerozan kolanjit, tercihlerde rol oynayan en önemli etkenlerdir. Hidatik hastalığın medikal, cerrahi ve perkütan tedavi olarak 3 ana tedavi yöntemi vardır¹⁴ (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Karaciğer kist hidatiklerinde tedavi yöntemleri¹⁴

Semptomatik tedavi	– Kalsifiye (ölü) kistlerde
Medikal tedavi	– Cerrahi tedaviye uygun olmayan veya reddeden olgularda – Cerrahi tedavi veya perkütan drenajla kombine olarak
Açık girişimler	– Marsüpiyalizasyon, – Total kist enüklüasyonu – İntrofleksiyon – Ultracision veya Ligasure ile dikişsiz kist duvarı eksizyonu – Radyofrekans ablasyon – Tüp drenajı Omentoplasti Transplantasyon – Karaciğer rezeksiyonu – Transkistik fenestrasyon – Kapitonaj İç drenaj: Periton boşluğuna veya G.I. sisteme – Kistektomi – Parsiyel hepatektomi
Videolaparoskopik tedavi	– Kistektomi ve/veya drenaj
Perkütan drenaj	– BT veya ultrasonografi eşliğinde

Güncel olarak karaciğer hidatik kistleri tedavisinde medikal tedavi

vazgeçilmezdir. Yalnız başına veya diğer yöntemlerle birlikte kullanılmaktadır.

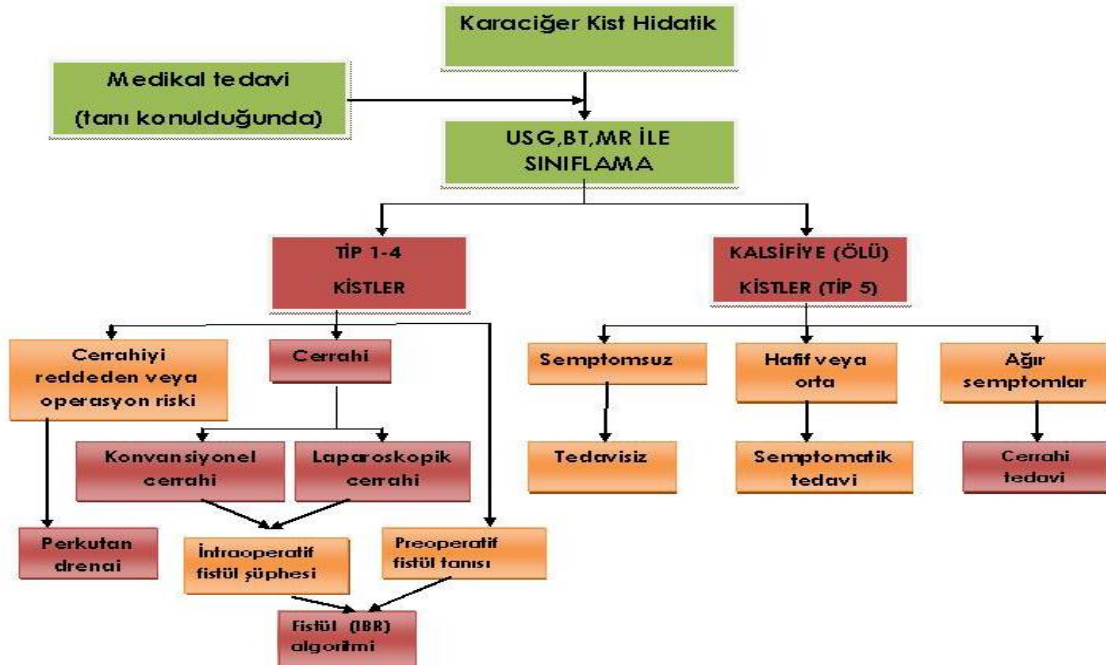
2.4.1. Cerrahi Tedavi

Karaciğer hidatik kistlerinin mortaliteye neden olabilen acil veya elektif ameliyat sonrası ciddi komplikasyonları bulunduğundan tedavide hala cerrahi yaklaşım çok önemlidir. Son 30 yılda yaygınlaşan medikal tedavi, perkütan drenaj gibi seçeneklere karşın; hastalığın yol açtığı organ yıkımı ve tehlikeli komplikasyonları (pleuraya veya safra yollarına açılma, rüptür, kanama, akciğer, mide, duodenum, ince ve kalın barsaklar, büyük damarlar, medulla spinalise fistülleşme) infekte olma, abseleşme gibi komplikasyonları nedeniyle hidatik kistlerin temel tedavisi cerrahidir. Medikal sanayide kaydedilen önemli gelişmeler karaciğer kist hidatiklerin tedavisinde daha radikal girişimlerin yapılabilmesine olanak sağlamıştır. Güncel cerrahi tedavi yöntemleri konservatif ve radikal olarak ikiye ayrılırlar. Konservatif veya radikal cerrahi girişim yöntemlerini seçiminde kistin sayısı, lokalizasyonu, yerleşim yeri, evresi etken olduğu kadar, hastanın yaşı, genel durumu da etken olur. Konservatif tedavinin esası, kistin boşaltılması, skolekslerin ve kız vesiküllerin saçılmasının önlenmesi, hastalığa neden olan çimlenme zarının çıkarılması, kist boşluğu içinde kalabilecek canlı skolekslerin öldürülmesi ve kalan kist boşluğunun kapatılmasıdır¹⁴.

2.4.2. Medikal Tedavi

Hidatik kistlerin medikal tedavisi, ilk kez 1977’de Bekhti tarafından bildirilmiştir. Bu amaçla Bekhti tarafından kullanılan ilaç, bir benzoimidazol karbamat türevi olan mebendazoldür. Daha sonraları aynı türevler olan albendazol, parbendazol, flubendazol, thiabendazol, cambendazol ve oxfendazol de kullanılmıştır. Bunlardan albendazol hidatik hastalığın tedavisinde en başta gelen ilaç değerini kazanmıştır. İzleyen dönemde değişik ilaçlar önerilmiş; ancak bunlardan sadece praziquantel kullanım alanına girmiştir. İvermektin ise son yıllarda kullanılmaya başlanılmıştır.

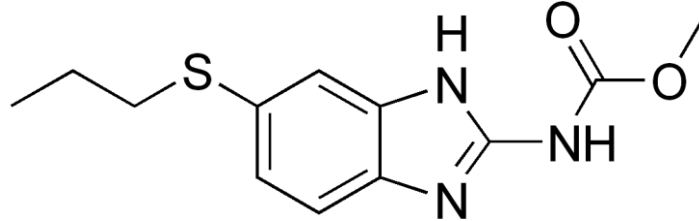
Mebendazol ise uygulamadaki sıkıntılar ve etkisinin albendazole göre daha az olmasından dolayı uygulamada ilgi görmemiştir. Benzoimidazol karbamat türevleri parazitin glukoz absorpsiyonunda blokaja, mikrotubuluslerde ve mikrotrikslerde dejenerasyona neden olmakta ve selüler otolize yol açarak parazitin ölümünü sağlamaktadır. Bekhti'nin çalışmalarını izleyen yıllarda praziquantel ve ivermektinin de antihelmintik özellikleri belirlenmiş ve hidatik kistlerin tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde hidatik hastalığın medikal tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlar albendazol, praziquantel ve ivermektindir. Bunlar içerisinde albendazol en yaygın kullanılan ilaçtır. Albendazol tedavisindeki en büyük sıkıntı gastrointestinal sistemden emiliminin ve kist duvarına; sıvısına perfüzyonunun düşük oranlarda olmasıdır. Güncel uygulanma alanları, cerrahiye uygun olmayan veya cerrahiye reddeden hastaların yanında, cerrahi ve perkütan drenaj uygulamalarında sekonder hidatidoz ve/veya nükslerin önlenmesi amacına yöneliktir¹⁴.



Şekil 2.2. Karaciğer kist hidatiklerinde tedavi algoritmi¹⁴

2.5. Albendazol

Benzoimidazol gurubundan geniş spektrumlu bir antihelmintiktir. Kimyasal formülü $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ 'tir. Açık formülü ise Methyl5-(propylt benzimidazolecarbamate)'tir²⁴.



Şekil 2.3. Albendazolün molekül yapısı²⁴

2.5.1. Albendazolün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri²⁴

1. Albendazol renksiz, kristal yapıda bir tuzdur.
2. Suda pratikte çözünmez. Metanol ve hidroklorik asitte ki çözünürlüğü oldukça iyidir.
3. Erime noktası 208-210 °C aralığındadır.
4. pH değeri 4.4-5.5 aralığındadır.
5. Molekül ağırlığı 265.33 g/mol'dür.

Uzun yıllar antiparaziter veteriner ilacı olarak kullanılmıştır. Hidatik hastalık üzerine etkileri belirlendikten sonra insanlarda da kullanılmaya başlanılmıştır. Albendazol, mebendazole benzer etkilere sahip olmasına karşılık, hem emilimi, hem protoskoloşidal hem de yan etkileri açılarından mebendazolden daha avantajlıdır. Albendazol sülfon ve albendazol sülfoksit olarak iki biyolojik metaboliti vardır. Esas aktif olanı albendazol sülfoksittir. Kist duvarında adenosine trifosfat, piruvatkinaz, fosfoenolpiru-vatkarboksikinaz, fumarat redüktaz ve malat dehidrogenazda azalmaya sebep olur. Bu etkiler, parazitin glukoz alımını ve ATP yapımını azaltır ve glukojenini tüketerek ölümüne yol açar^{15,16}. Ayrıca, albendazolün, parazitte distal sitoplazmalarda vakuolizaasyon, mitokondrialarda artma, mikrotrikslerde kısmi kayıp, otofagosomlarda

ve lipid depolanmasında artışa neden olduğu bildirilmiştir¹⁷. Keza albendazol uygulamasında intrakistik basınçta düşme olduğu da bildirilmiştir¹⁸. Yayınlarda albendazol ile başarı oranları %77.9 ve %99 düzeyine kadar ulaştığı bildirilmesine karşılık; WHO; IWGE¹⁹, medikal tedavi ile başarının %50 düzeyinde olduğunu bildirmiştir. Horton²⁰, çok merkezli araştırmasında albendazolün etkinliğini Avrupa’da %76.3, Amerika Birleşik Devletleri’nde %53, Avusturalya’da %47 olarak bildirmiştir. Serinin genelinde %71.5’ tur. Bu farklı sonuçta farklı protokollerin uygulanması etkindir. Oral verilen albendazolün ancak %5 ile %10’u gastrointestinal sistemden absorbe olur. Maksimal plazma konsantrasyonları 2 ile 5 saatte oluşur. Serum yarılanma süresi 8 ile 12 saattir. Plazma; kist sıvısı seviyeleri oranı 1/3;1/10, plazma; serebrospinal sıvı seviyeleri oranları 1/2;1/4’tür^{21,22}. Mekanik ikterli hastalarda maksimal serum konsantrasyonu (C_{max}) 2 kat artar. Keza maksimal konsantrasyona erişme süresi (T_{max}) 10 saate, serum yarılanma süresi 31.7 saate kadar yükselir.

Morris’in²³, çalışmasında albendazolün ve albendazol sülfoksitin karaciğer hücreleri ve safra da yoğun olarak bulunduğu bildirilmiştir. Bu, safra ile atıldığının göstergesi kabul edilmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Morris’in çalışmasında albendazol ve albendazol sülfoksitin vücut sıvılarında dağılımı (ng/mL)²³

	Albendazol	Albendazol sülfoksit
Serum	14.8	198.8
Safra	60	321.6
Kist duvarı	7	75.2
Kist sıvısı	6.1	187.6
Karaciğer	77	986

2.5.2. Farmakolojik Özellikler

Albendazol, benzimidazol sınıfından geniş spektrumlu bir antihelmintiktir. Ayrıca parenkimal helmintiyazis nedeni olan *Echinococcus granulosus* ve *Taenia solium*’un larva şekillerine karşı da etkilidir. Albendazol duyarlı helmintlerin deri ve

bağırsak hücrelerinde tubuline bağlanarak bu maddenin mikrotübüller halinde polimerizasyonunu inhibe eder. Mikrotübüllerin kaybı glukoz alımını ve ATP yapımını azaltır ve glukojen rezervlerini tüketir. Enerjisiz kalan parazit immobilize olarak ortamdan uzaklaştırılır. Albendazol intestinal helmintiyazis enfeksiyonlarının tedavisinde tek dozda etkili olan geniş spektrumlu bir antihelmintiktir. Tok karnına alınması biyoyararlanımını artırır. Bu özelliklerinden ötürü intestinal helmintiyazisin endemik olduğu bölgelerde kitle tedavisinde kullanılabilir²⁴.

2.5.3. Farmakokinetik Özellikler

2.5.3.1. Absorpsiyon ve Metabolizma

Albendazol ağız yoluyla alındıktan sonra absorbe olan miktar sistemik dolaşıma girmeden önce karaciğerde süratle ve geniş ölçüde metabolize olarak Albendazol sülfoksit'e dönüşür. İlacın antihelmintik etkisini bu madde yoluyla gösterdiği kabul edilmektedir. İlacın oral biyoyararlanımı, yağlı bir yemekle birlikte alınırsa (ortalama 40 g yağ), 5 kat kadar artabilir. Yani plazma albendazol sülfoksit konsantrasyonu 5 kata kadar yükselebilir. Maksimal plazma konsantrasyonları 2-5 saatte oluşur. 400 mg albendazol yağlı bir yemekle birlikte verildiğinde albendazol sülfoksit'in maksimal plazma konsantrasyonu 1.31 µg/mL'dir (0.46-1.58 µg/mL). Bu konsantrasyonlar terapötik doz aralığında dozla orantılı olarak artar. Albendazol sülfoksit'in ortalama eliminasyon yarı ömrü 8-12 saattir. Albendazol indüksiyonla kendi metabolizmasını stimüle eder. Albendazol'un tablet ve süspansiyon formları biyoeşdeğer kabul edilmektedir²⁴.

2.5.3.2. Dağılım

Albendazol sülfoksit plazma proteinlerine %70 oranında bağlanır. Vücutta dağılımı yaygındır; idrar, safra, karaciğer, kist çeperi, kist sıvısı ve serebrospinal sıvıda saptanmıştır. Aynı anda tayin yapıldığında plazmaya göre konsantrasyonu kist sıvısında

3 - 10 kat, serebrospinal sıvıda 2 - 4 kat daha azdır. Sınırlı sayıdaki in vitro ve klinik veri kistlerdeki albendazol sülfoksidin plazmadakine göre daha yavaş elimine olduğunu göstermektedir²⁴.

2.5.3.3. Biyotransformasyon

Albendazol karaciğerde süratle ana metaboliti olan albendazol sülfoksida ve sonrasında albendazol sülfon ile idrarda saptanmış olan başlıca diğer oksidatif metabolitlerine dönüşür. İlacın sistemik antihelmintik etkisini ana metaboliti albendazol sülfoksit yoluyla gösterdiği kabul edilmektedir. 12 hastanın albendazol (günde 3 defa 200 mg) ile 4 haftalık tedavisinin ardından plazma albendazol sülfoksit konsantrasyonu tedavinin ilk yarısına göre yaklaşık %20 daha düşük bulunmuştur. Bu durum albendazolün kendi metabolizmasını indükleyebileceğine işaret etmektedir²⁴.

2.5.3.4. Eliminasyon

Oral uygulamanın ardından idrarda albendazol saptanmamıştır. Albendazol sülfoksit idrarla %1'den daha az oranda idrarla atılır, bu nedenle idrarla atılım minör bir eliminasyon yoludur. Önemli bir kısmının safra ile atılması mümkündür. Çünkü safra ve plazma konsantrasyonları benzer seviyededir. Albendazol sülfoksidin ortalama eliminasyon yarı ömrü 25 sağlıklı denek ile 14 kist hidatik ve 8 nörosistiserkosis hastasında 8 - 12 saat aralığında bulunmuştur²⁴.

2.5.3.5. Doğrusallık/Doğrusal Olmayan Durum

İlacın terapötik doz aralığında yağlı bir yemekle birlikte (yağ içeriği 43.1 g) alınmasının ardından albendazol sülfoksidin plazma konsantrasyonları dozla orantılı olarak artar²⁴.

2.5.4. Albendazolün Güvenlik ve Tolerebilitesi

Albendazol tedavisi sırasında nadiren granülositopeni veya pansitopeniye bağlı ölüm bildirilmiştir. Albendazolün alta yatan karaciğer disfonksiyonu olan veya olmayan

hastalarda kemik iliği supresyonu, aplastik anemi ve agranülositoza neden olduğu gösterilmiştir. Albendazol ile tedavi süresince tüm hastalarda her 28 günlük tedavi kürünün başında ve ondan sonra her 2 haftada bir kan sayımı yapılmalıdır. Hepatik ekinokok hastalığı dâhil karaciğer hastalığı olan kişiler albendazol kullanımı nedeniyle pansitopeni, aplastik anemi, agranülositoz ve lökopeniye yol açan kemik iliği supresyonu bakımından daha fazla risk altında olabilir, bu kişilerin kan değerleri yakından izlenmelidir. Kan hücre sayısında klinik olarak belirgin azalma meydana gelen hastalarda albendazol tedavisi kesilmelidir²⁴.

Albendazolün gebe kadınlarda kullanılması, ancak alternatif bir tedavi şekli yoksa düşünülebilir. Albendazol tedavisi gören bayan hastalar tedavinin bitiminden sonraki ilk 1 ay içerisinde gebe kalmamaları yönünde uyarılmalıdır. Albendazol tedavisi sırasında hastanın gebe kalması halinde ilaç derhal kesilmelidir. İlaç kullanımı esnasında gebelik gelişirse hasta fetus üzerindeki olası riskler yönünden bilgilendirilmelidir.

Andazol® laktoz içerir. Nadir kalıtsal galaktoz intoleransı, Lapp laktoz yetmezliği veya glukoz-galaktoz malabsorpsiyon problemi olan hastaların bu ilacı kullanmamaları gerekir²⁴.

2.5.5. Albendazolün Kullanım Şekli ve Dozu

Nematodların sebep olduğu tek veya multipl intestinal helmintiasis tedavisi için (*Ascaris lumbricoides*, *Oxyuris (enterobius) vermicularis*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichiura*): Bir defada alınmak üzere 400 mg albendazol. *Taenia saginata*, *Taenia solium* ve *Hymenolepis nana*'nın sebep olduğu intestinal sesto d enfeksiyonlarında ve *Strongyloides stercoralis*'e bağlı intestinal helmintiasis tedavisi için günde 1 defa 400 mg albendazol 3 gün art arda alınır. Tedaviden 3 hafta sonra yapılan kontrolde dışkıda parazit veya yumurtaları görülüyorsa

tedavi tekrarlanabilir. Taeniasis'de 3 ay sonra ikinci bir kontrol yapılmalıdır. Albendazol tedavisi sırasında özel bir rejim uygulamaya veya müşil kullanmaya gerek yoktur. İlacın yemeklerden önce veya sonra veya yemek arasında alınması sonucu etkilemez. Echinococcus granulosus tarafından yapılan kist hidatik hastalığının tedavisi için albendazol 400 mg sabah, 400 mg akşam olmak üzere günde 800 mg dozda 30 gün süreyle uygulanır veya günde 10 mg/kg albendazol ikiye bölünerek 5 mg/kg sabah, 5 mg/kg akşam verilir. 30 günlük tedaviden sonra 15 günlük bir ara verilerek gerekirse kür tekrarlanır. Akciğer, karaciğer ve periton kistlerinde tedaviye iyileşme görülene kadar devam edilir. İyileşme için gerekli, 15 gün aralarla yapılan 30 günlük kürlerin sayısı bu kistlerde ortalama 6'dır. Kemik kistlerinin tedaviye cevabı sınırlı olduğundan hastanın daha fazla iyileşmeyeceği anlaşıncaya kadar tedavi kesilmelidir ²⁴.

2.5.6. Albendazol İçeren Ticari Preparatlar ve İçerikleri

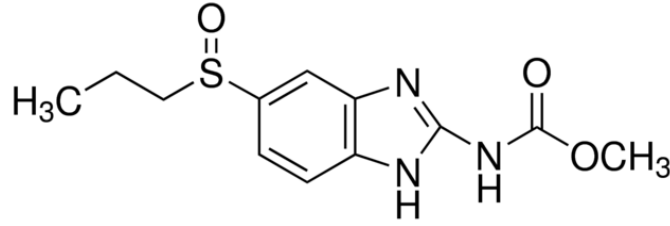
1. Andazol 200 mg, 2 film tablet - Biofarma İlaç Sanayi
2. Andazol 200 mg, 40 film tablet -Biofarma İlaç Sana
3. Andazol 200 mg, 6 film tablet - Biofarma İlaç Sanayi
4. Andazol 400 mg, 1 film tablet - Biofarma İlaç Sanayi
5. Andazol 400 mg, 3 film tablet - Biofarma İlaç Sanayi
6. Andazol 400 mg, 60 film tablet-Biofarma İlaç Sanayi
7. Andazol %2, 20mL suspansiyon - Biofarma İlaç Sanayi
8. Andazol %2, 60mL suspansiyon - Biofarma İlaç Sanayi

2.6. Albendazol Sülfoksit ve Albendazol Sülfon

Albendazol sülfoksit ve albendazol sülfon albendazolün iki önemli metabolitidir ve antihelmintik olarak görev yaparlar.

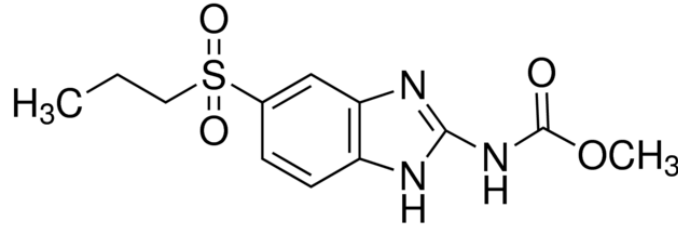
Albendazol sülfoksitin molekül formülü: Metil [5- (propan-1-sülfinil) -1 H-benzoimidazol-2-il] karbamat'tır. Kimyasal formülü: C₁₂H₁₅N₃O₃S, molekül ağırlığı:

281.33 g/mol'dür²⁴.



Şekil 2.4. Albendazol sulfoxit (ABZSO) molekül yapısı²⁴

Albendazol sülfon molekül formülü: Methyl [5-(propylsulfonyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]carbamate'tır. Kimyasal formülü; C₁₂H₁₅N₃O₄S, molekül ağırlığı; 297.33 g/mol²⁴.



Şekil 2.5. Albendazole sülfon (ABZSO₂) molekül yapısı²⁴

2.7. Albendazol Analizi İçin Analitik Yöntemleri

Oswal ve ark.²⁵ albendazolün tablet formülasyonlarda rutin analizleri için bir UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi geliştirdiler. Yöntemin Beer kanununa uyduğunu ve iyi bir korelasyon gösterdiğini tespit ettiler. Maksimum absorpsiyonu 298 nm'de ve Dimetil formamid (DMF) içinde gösterdiğini belirlediler. Yöntemin 2-10 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğunu tespit ettiler. Analiz sonuçlarını yüzde geri kazanım değeri ile vererek %99.43-101.55 olarak belirledi.

Marlene ve ark.²⁶ ilaç preparatlarında (oral süspansiyon) ABZ'nin belirlenmesi için iki analitik yöntem standardize ettiler, birinci yöntemde 230 nm'de çözücü olarak metanolde %2 sülfürik asit kullanılan UV- Spektrofotomere yöntemi, ikincisi ise HPLC yöntemidir. HPLC yönteminde, Nucleosil® C18 (5µ-4.6×150 mm) Phenomenex® kolon ve metanol:0.05M fosfat tamponu (70:30; h/h) oluşan mobil faz çalışma parametreleri

kullandılar. Geliştirip valide ettikleri iki yöntem ile yapay ve ticari olarak temin edilebilen örneklerde albendazol analizine uyguladılar ve sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Tella ve ark.²⁷ standart, tablet ve süspansiyon dozaj formlarında albendazolun miktar tayini için bir spektrofotometrik yöntem geliştirdiler. ABZ'ün metanolik buzlu asetik asit çözeltisi içinde 235 nm'de maksimum absorbans gösterdiğini ve yöntemin 2.5-20 µg/mL konsantrasyon aralığında Beer kanununa uyduğunu belirlediler. Regresyon eğrisi denkleminin eğimi ve kesişimi sırasıyla 0.0310 ve 0.00067 ayrıca korelasyon katsayısını 0.9998 olarak tespit ettiler. Yüzde geri kazanım sonuçları ile yöntemin, yaygın olarak kullanılan ilaç katkı maddelerinin varlığından etkilenmediğini gösterildi.

Dafang ve ark.²⁸ albendazol ve onun ana metaboliti albendazol sülfoksitin eş zamanlı tayini için LC-MS/MS yöntemini geliştirip valide ettiler. Analitleri plazma numunelerinden sıvı-sıvı ekstraksiyon ile ekstrakte ettiler. İnternal standart olarak estazolam kullandılar. Yöntemin, albendazol için 0.4-200 ng/mL ve albendazol sülfoksit için 4-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğunu belirlediler. ABZ ve ABZSO için Bağlı Standart Sapma (%BSS) değerlerini sırasıyla %7.1 ve %9.4 den daha az olduğunu ve geri kazanım değerlerini sırasıyla %77 ve %53 den daha fazla olduğunu belirlediler. Geliştirilen yöntemin, sağlıklı gönüllülere oral yolla verilen 400 mg albendazol verildikten sonra plazmada ABZ ve ABZ-SO analizleri gerçekleştirildikten sonra farmakokinetik parametreler tespit edildi.

Ruiz-Nuno ve ark.²⁹. klinik ve farmakokinetik analizler için ABZ ve onun metaboliti olan ABZ-SO'nun plazmadaki düzeylerini aynı anda belirlemek için LC-MS yöntemini geliştirdiler. Her bir plazma numuneleri bir katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile ekstrakte ettiler ve internal standart olarak fenasetin kullandılar. Ekstrakte edilen

numuneleri izokratik yöntem ile Zorbax XDB-CN kolonu ile elüe ettiler. Mobil fazın su- %1 asetik asit (%40, A) ve metanol (%60, B) ayrıca akış hızının 1mL/dk olduğunu bildirdiler. ABZ ve ABZ-SO'nun elektrosprey iyonizasyonlu kütle spektrometresi ile MRM modunda algılanabilir ve tanımlanabilir olduğunu belirttiler. Yöntemin ABZ için 5-1000 ng/mL ve ABZ-SO için 10-1500 ng/mL aralığında doğrusal olduğunu ayrıca ABZ ve ABZ-SO için LOQ değerlerinin sırasıyla 5 ng/mL ve 10 ng/mL olduğunu belirlediler. Düzenleyici kurumlara göre hem ABZ hem de ABZ-SO için numunelerin doğruluk- hassasiyet, matriks etkisi, ekstraksiyon geri kazanımı ve kararlılık testlerinde LOQ için %20'den fazla diğer kalite kontrolleri için %15'den fazla sapma olmadığını bildirildi.

Mullangi ve ark³⁰. 50 µL sıçan plazmasında ABZ ve Ricobendazolün miktarlarının eş zamanlı belirlenmesi için bir LC-MS/ MS yöntemini geliştirdiler. Sıçan plazmasından ABZ ve RBZ ekstre edilmesi için basit protein çöktürme yöntemi kullandılar. ABZ, RBZ ve internal standar'ın belirlenmesindeki kullanılan kromatografik parametreler; Chromolith RP-18e kolon, 1mL/dk akış hızı, 5mM amonyum asetat (pH 6) ve asetonitril (20:80, v/v) içeren bir mobil faz ve fenasetin internal standardı kullandılar. ABZ, RBZ ve IS kromatografik alıkonma sürelerini sırasıyla 1.66, 1.5 ve 1.59 dakika olarak tespit ettiler. Yöntemin ABZ için 2.01-2007 ng/mL ve RBZ için 6.02-6020 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu belirlendi. Geliştirilen yöntem ile sıçanlarda farmakokinetik parametreler belirlendi.

Batzias ve ark³¹. koyun sperm hücresi ve spermal plazmada albendazol metabolitlerinin kantitatif tayini için yeni bir analitik yöntem geliştirdiler. Analitleri etil asetat ile alkalileştirilmiş numunelerden ekstrakte ettiler. Ayırma işlemini tetra-n-butil amonyum, hidrojen sulfat ve oktan sulfonat sodyumun varlığında bir C18 kolonda gerçekleştirdiler. Florometrik deteksiyon sırasıyla 290 ve 320 nm'de uyarma ve

emisyona dalga boylarında gerçekleştirdiler. Doğruluk verileri ile, sperm hücresinde toplam geri kazanımların ABZSO için $83,1 \pm 1.2$, ABZSO₂ için 98.8 ± 0.6 ve ABZ-SO₂NH₂ için 85.3 ± 0.7 olduğunu tespit edildi. Sperm plazmada ise ilgili değerleri sırasıyla ; 88.0 ± 0.9 , 97.7 ± 0.5 ve 93.2 ± 1.7 olarak buldular. Hassas verilerin, varyasyon katsayısı değerlerinin sperm hücresi için %5.9'dan sperm plazma için %3.8'den daha düşük olduğunu gösterdiğini bildirildi. Oral yolla albendazol uygulanan kolardan toplanan meni numunelerinde üç albendazol metabolitinin tayinini gerçekleştirildi.

Torrado ve ark³². ABZ ve iki ana metaboliti olan ABZSO ve ABZSO₂ nin kantitatif tayini için üç farklı ve tamamlayıcı kromatografik yöntem tanımladılar. ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ iki farklı mobil faz ve ODS2 kolonuna sahip iki RP-HPLC yöntemi ile ölçülebilir olduğunu belirttiler. Mobil fazlardan biri ABZ için metanol-su (60:40) ikincisi ise ABZSO ve ABZSO₂ için su asetonitril (80:20) içeren fosforik asit olarak belirlediler. ABZSO'nun asimetrik sülfür merkezi taşımakta olduğunu ve (+)SOABZ ve (-)SOABZ'nin kantitatif tayininin HPLC ile yapılabileceğini bildirdiler. Kromatografik ayırım 2-propanol (%0-2) ve fosfat tamponu çözeltisi (pH 7.0; 8mM) kullanılarak şiral AGP kolonda gerçekleştirdiler. Farelerde 12 mg/kg ABZ'nin sıvı formülasyonunun oral yoldan verilmesinin ardından ABZ'nin farmakokinetik özelliklerini bu üç tamamlayıcı HPLC yöntemi ile incelediler ve sonuçları rapor ettiler.

Tucker ve ark³³. UV dedeksiyonlu izokratik sistem kullanarak, koyun plazmasında RBZ ve onun ana metaboliti ABZSO₂'nin eş zamanlı belirlenmesi için bir HPLC yöntemini geliştirdiler ve valide ettiler. Katı faz ekstraksiyonu içeren yöntemin bir C₁₈ kolonda ters faz ayırma işleminden oluştuğunu bildirdiler. Yöntemi optimize etmek için çok yönlü doğrusal regresyonun yardımı ile 3'lü komponentlerin bileşimi mobil faz tanımladılar. Alıkonma zamanlarının 10 dk içinde olduğunu bildirdiler.

Kalibrasyon eğrilerini hem RBZ hem de ABZSO₂ için 10-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğunu belirlediler ($r>0.099$). Güniçi bağıl standart sapma değerini; düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda RBZ için %5.5'den küçük ve ABZSO₂ için %4.6'dan küçük; ortalama doğruluklar RBZ için %98.3, 101.0 ve 100.5; ABZSO₂ için %101.0, 102.4, ve 100.8 olarak buldular. Aynı konsantrasyonlarda günler arası varyasyonları RBZ için %5.9, ABZSO₂ için %6.4'den küçük olduğunu bildirdiler. Bu konsantrasyonlarda RBZ, ABZSO₂ ve internal standart için ekstraksiyon geri kazanım değerlerini ortalama olarak %96 buldular. RBZ için miktar tayin sınırı ve gözlenebilme sınırını sırasıyla 7.1 ve 2.4 ng/mL ve her iki analit için 10 ng/mL olarak tespit edildi.

Fleckenstein ve ark³⁴. insan kanında ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ tayini için UV (295 nm) dedektörlü bir HPLC yöntemini geliştirdiler. ABZ, ABZSO, ABZSO₂ ve internal standart oksibendazolü insan plazmasından ekstrakte ettiler. Numuneleri bir azot akımı altında buharlaştırıp, mobil faz ile yeniden oluşturdular ve Waters μ BondapakTM phenyl 3.9*300mm HPLC kolonuna enjekte ettiler. Mobil faz su-metanol-asetonitril (72:15:13,h/h/h) (pH 3.1) karışımı içinde %1.25 trietilaminden oluşmaktadır. Akış hızı 1.0 mL/dk olarak kullandılar. ABZ, ABZSO, ABZSO₂ ve internal standartın alıkonma zamanları sırasıyla 24.4, 7.9, 13.4 ve 11.3 dk olarak belirlediler. Yöntemin insan plazmasındaki ABZ için 20-600 ng/mL, ABZSO için 20-1000 ng/mL, ABZSO₂ için 20-300 ng/mL konsantrasyon oranlarında doğrusal olduğunu tespit ettiler. ABZ (20, 40 ve 600 ng/mL) için varyasyon katsayılarını sırasıyla %6.7, %8.1 ve %7; ABZSO (20, 40 ve 800 ng/mL) için %6, %8.5 ve %5.9 ve ABZSO₂ (20, 150 ve 300 ng/mL) için %3.1, %3.9 ve %2.3 olarak tespit ettiler. Geliştirilen yöntem ile sağlıklı gönüllülerde ABZ'nin farmakokinetik çalışması da gerçekleştirildi.

Bonato ve ark³⁵. yaptıkları çalışmada insan plazmasında ABZSO

enantiyomerlerinin ve ABZSO₂'nin eş zamanlı tayini için bir HPLC yöntemini geliştirdiler. ABZSO enantiyomerleri ve ABZSO₂'nin ayırma işlemini Chiralpak AD kolonda mobil faz olarak hegzan-izopropanol- etanol (81:14.25:4.75 v/v/v) kullanarak gerçekleştirdiler. Analitleri floresan dedektör ($\lambda_{exc}=280$ nm, $\lambda_{em}=320$ nm) ile saptadılar ve 500 µL plazmadan etil asetat ile ekstrakte ettiler, sonra solvent evaporasyon, atıkları mobil fazda çözdüler ve analizi gerçekleştirdiler. Varyasyon katsayılarını ve bağlı hataları incelediklerinde yöntemin doğru ve kesin olduğunu belirlediler. Yöntemin doğrusallığı ABZSO enantiyomerleri için 5-2500 ng/mL ve ABZSO₂ için 1-500 ng/mL konsantrasyon aralığında tespit ettiler. Tipik bir plazma konsantrasyon -zaman grafiği elde edildi.

Moamen ve ark³⁶. tabletlerde ABZ miktarının belirlenmesi için bir yöntem geliştirdiler. Bu, (donar gibi davranan) ABZ ilacının tayini için DDQ (2,3-dikloro-5,6-disiyano-p-benzokinin) ve p-CLA (3,6-dikloro-2,5-dihidroksi-p-benzokinin) gibi bazı π -aksaptörlerin yararını içerir. Deneysel şartları optimize ettiler ve DDQ ve pCLA kullanan ABZ'nin sırasıyla 7.5 - 80 ve 1 - 85 µg/mL için sistemin Beer kuralına uyduğunu tespit ettiler. Molar soğurganlık; sırasıyla DDQ ve pCLA kullanılan 1.83×10^3 ve 1.12×10^3 L/mol.cm ve sandell duyarlılık sırasıyla 2.6 ve 3.4 ng/cm² olarak hesapladılar. DDQ kullanılan için, miktar tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı sırasıyla 7.2 ve 6.73 µg/mL ve P-CLA kullanılan için miktar tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı sırasıyla 9.94 ve 4.13 µg/mL buldular. Önerilen yöntemler, ticari olarak uygun dozajlarda ABZ'nin belirlenmesinde uygulandı.

Rouini ve ark³⁷. insan serumunda ABZ ana metabolitleri ABZSO, ABZSO₂ ve albendazol amino sülfon (ABZSO₂NH₂) belirlenmesi için bir HPLC yöntemini geliştirdiler. Yöntemde serum etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu, n-hekzan ile temizlenmesi ve etil asetat ile tekrar ekstraksiyonunu takiben elüsyon çözücü olarak

metanol:asetonitril:asetik asit: su (40:1:10:49) bir karışımı ile RP-C8 kolonu üzerinde ayırma olaylarını içermektedir. İnternal standart olarak kullanılan ABZSO ve mebendazol UV ($\lambda=286$ nm) saptandığını ve ABZSO₂ ile ABZSO₂NH₂ floresans spektrometre ile sırasıyla (uyarma = 286 nm, emisyon = 333 nm) ve (uyarma=286 nm, emisyon=315 nm) olarak belirlediler. Yöntemin gözlenebilme sınırı ABZSO için 10 ng/mL, ABZSO₂ için 2 ng/mL ve ABZSO₂NH₂ için ise 4 ng/mL olarak tespit ettiler. Oral uygulama sonrasında insan plazmasında bulunmadığından farmakokinetik önem taşımayan ABZ'nin belirlenmesi, önerilen yöntemin ayrıca bu ilacın metabolizma ve farmakokinetik çalışması için uygun olduğunu belirtildi.

Kılıç ve ark. günümüzde çok büyük öneme sahip olan ve piyasada yaygın olarak kullanılan ilaçlarda albendazol tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmeyi amaçlamışlar ve bu amaçla, albendazolün çeşitli çözücülerde floresans özelliklerini incelemişler, yine aynı çözücülerde tayin edebileceği en alt tayin sınırını belirlemişlerdir. Kloroformda hazırlanan bir seri albendazol çözeltisi kullanılarak çeşitli dalga boylarında uyarma yapılarak en uygun uyarma ve emisyon dalga boyu $\lambda_{uy}=350$ nm'de ve $\lambda_{em}= 440$ nm'de 2 μ g/L albendazolün tayin edilebileceğini tespit ettiler. Uygun uyarma ve emisyon dalga boylarında çalışarak 2.65 ng/L-2.65 mg/L aralığında kalibrasyon eğrileri elde ettiler. Bu eğrilerden yararlanarak piyasada bulunan ve albendazol içeren tabletlerde etken madde tayinini gerçekleştirdiler. Bu arada tablette bulunan sodyum sakkarin, titan dioksit ve diğer dolgu maddelerin tayine etkisini incelediler. Geliştirilen yöntemin duyarlılığı ve doğruluğu araştırılarak albendazol için mevcut diğer yöntemlerle karşılaştırılması da yapıldı.

Bonato ve ark.³⁸. plazmada ABZSO, ABZSO₂ prazikuantel ve trans-4-hidroksi prazikuantel'in analizi için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirdiler. Plazma numunelerini; ekstraksiyon çözücüsü olarak diklorometan kullanarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile

hazırladılar. İlaç ve metabolitlerin kısmi HPLC çözünürlüğünü siyanopropil kolonda ve metanol:su (3:7, h/h) ek olarak %0.5 asetik asit içeren mobil fazın 1mL/dk akış hızında sağladılar. Çoklu reaksiyon izleme dedeksiyonu yöntemine ek seçicilik kazandıran pozitif iyon modunda, elektrosprey iyonizasyonu ile gerçekleştirildi. Tüm analitler için yöntemin bağıl standart sapma (hassas) ve bağıl hataların (doğruluk) %15'den daha düşük olduğunu belirlediler. Tüm analitler için doğrusal aralığın 5-2500 ng/mL olarak tespit edildi. Domuz plazması numunelerinde ilaç ve metabolitlerin tespit edilmesi için yöntemi uygulayıp farmakokinetik parametreleri belirlediler.

Gomes ve Nagaraju³⁹. antelmintik ilaçların içeriğindeki mebendazol, fenbendazol, albendazol gibi potansiyel maddeleri belirlemek ve ayırmak için basit, özel ve hızlı bir ters fazlı HPLC yöntemi geliştirdiler. Bu yöntem ile incelenen tüm yabancı maddelerin etkili ayrılma, iyi bir çözünürlük ve tayinini sağladığı; seçilen antelmintik ilaçların yalnızca kalite güvencesi değil aynı zamanda proses gelişimi için de başarılı bir şekilde uygulandığını gösterildi.

Bonato ve ark⁴⁰. plazma numunelerinde ABZ ilacının iki önemli metaboliti ABZSO ve ABZSO₂ nin eş zamanlı tayini için LC/MS/MS yöntemini geliştirdiler. Diklorometan ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon sonrası iki albendazol metaboliti ve internal standart olan fenasetini bir CN kolonda elüe ettiler. Mobil faz, metanol:su (4:6, h/h) %1 asetik asit ile asitleştirdiler. Algılamayı, Elektrosprey Kütle spektrometre ile pozitif iyon modunda uyguladılar. Yöntemin ABZSO için 2500 ng/mL ve ABZSO₂ için 250 ng/mL'ye kadar doğrusal olduğunu ve ortalama geri kazanımın %85'den fazla olduğunu tespit ettiler. 5 gün boyunca günler arası ve günüçi değişimlere dayalı hassasiyet ve doğruluk verilerini %15'den daha düşük buldular. ABZSO₂ ve ABZSO için 0.5 ve 5 ng/mL'lik kantitasyon limitlerinin, yöntemin farmakokinetik incelemelerde uygun olması için yeterli düzeyde olduğunu tespit edildi. Nörosistiserkoz olan bir

hastaya ABZ'nin oral olarak verilmesini müteakiben önerilen yöntem ile farmakokinetik parametreleri belirlendi.

Shaikh ve ark⁴¹. çelikbaş alabalık, tilapiya balığı ve somon balığı cilt dokusuna yapışmış kaslarda ABZ ve onun ana metabolitleri ABZSO, ABZSO₂ ve albendazol -2-amino sülfonun tayini için sıvı kromatografik yöntem geliştirdiler. Kas dokusu numunelerini potasyum karbonat ile bazikleştirdikten sonra etil asetat ile ekstrakte ettiler. Ekstraktların ayrıca sıvı-sıvı ekstraksiyon basamaklarının bir dizisi kullanılarak temizliğe ve çözücünün buharlaştırılmasından sonra kalıntıyı mobil fazda yeniden sıvılaştırarak kromatografiye tabii tuttular. Kromatografi işlemini ters fazlı Luna C18 kolonunda, mobil faz olarak asetonitril/metanol/tampon madde ve floresans dedektörü kullanarak gerçekleştirdiler. 3 balık türünün güçlendirilmiş kas dokusundan ortalama geri kazanımları; ABZ (25-100 ng/mL), ABZSO₂ (1-10 ng/mL), ABZSO (15.5-62 ng/mL) ve albendazol-2-aminosülfon (10-100 ng/mL) için sırasıyla; %94, %77, %82 ve %67 olarak tespit ettiler. Her bir bileşik için ortalama varyasyon katsayısını %10'dan düşük bulundu.

Batzias ve Delis⁴². koyun kanı plazmasında ABZSO, ABZSO₂ ve ABZSO₂-NH₂'nin eş zamanlı ölçümü için HPLC yöntemini geliştirdiler. Plazma numunelerini alkalın şartlar altında ekstrakte ettiler. Ayırma işlemini bir C-18 ters faz kolonda, pozitif (tetra-n-bütillamaonyum hidrojen sülfat) ve negatif yüklü (oktansülfonat sodyum) iyon çiftlerinin varlığında, floresans dedektör ile gerçekleştirdiler. Uyarma ve emisyon dalga boylarını sırasıyla 290 nm ve 320 nm buldular. Ölçüm limitlerini ABZSO için 39 ng/mL, ABZSO₂ için 4.95 ng/mL, ABZ-SO₂-NH₂ için ise 4 ng/mL buldular. Geri kazanım verimliliği açısından doğruluk verileri ABZSO için %85.6±1, ABZSO₂ için %100±1 ve ABZ-SO₂-NH₂ için %89.1±0.6 genel değerlerini tespit ettiler. Oral yoldan ABZ verilmiş koyunlardan toplanan plazma numunelerinde üç ABZ metabolitini nicel

olarak belirlemek için geliştirilen yöntem uygulandı.

Oliveira ve ark⁴³. sığır plazmasında ABZ metabolitleri olan ABZSO, ABZSO₂ ve ABZ-SO₂NH₂'nin eş zamanlı tayini için tam otomatik bir akiral-kiral HPLC yöntemini geliştirdiler ve valide ettiler. Bütün bileşiklerin kromatografik ayrımları 30°C'de, fosfat tampon (10 mmol/L; pH 7.5): asetonitril'den oluşan bir mobil faz kullanılarak akış hızı 0.5 mL/dk ve floresans dedeksiyonu uyarma ile emisyon için sırasıyla 290 nm ile 320 nm çalışma parametrelerinde gerçekleştirdiler. ABZSO'nun enantiyomer ayırımında, sabit fazın kiral seçici ve farklı organik modifiye edicilerin etkisini araştırdılar. Geliştirilen yöntem tamamen valide edildi. Kalibrasyon eğrilerinin; her bir ABZSO enantiyomeri için 40-1280 ng/mL, ABZSO₂ için 10-320 ng/mL ve ABZ-SO₂NH₂ için 20-320 ng/mL konsantrasyon aralıklarında doğrusal olduğunu belirlendi. Yöntemin günüçi ve günler arası bağıl standart sapması (BSS) %0.760 ile 7.79; doğruluk değerinin ise %114 den %101 arası değiştiğini belirlendi.

Cook ve ark⁴⁴. nörosistiserkoz hastalarında beyin omirilik sıvısı ve plazmada ABZ metabolitlerinin (ABZSO ve ABZSO₂) eş zamanlı tayini için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirip valide ettiler. Plazma numuneleri (200 µL) eter-diklorometan-kloroform (60:30:10, h/h/h) ile ekstrakte edildi. Kromatografik ayırma işlemi, mobil faz olarak metanol-formik asit 20 mmol/L (70:30) kullanarak bir C₁₈ kolonda gerçekleştirildi. Yöntemin ABZSO için 20-5000 ng/mL ve ABZSO₂ için 10-1500 ng/mL aralığında doğrusal olduğu tespit edildi. Her iki analit için, yüksek geri kazanımla (> %90) yöntemin kesin (RSD< %12) ve doğru (RE< %7) olduğu belirtildi. Yöntem 7 gün süre ile günde 30 mg/kg ABZ verilen nörosistiserkoz hastalarında ABZSO ve ABZSO₂'nin plazma ve beyin sıvısındaki miktarlarını belirlemek için uygulandı. Bu LC-MS/MS yöntemin plazma ve beyin sıvısı numunelerinde ABZSO ve ABZSO₂ tayinleri gerçekleştirildi.

2.8. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopik yöntemler, atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan geniş bir analitik yöntemler grubudur. Bu yöntemler; inorganik ve organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde yaygın olarak kullanılır. Ayrıca molekül yapılarının aydınlatılması alanında da en sık başvurulmuş yöntemler grubundandır.

2.8.1. Spektrofotometri

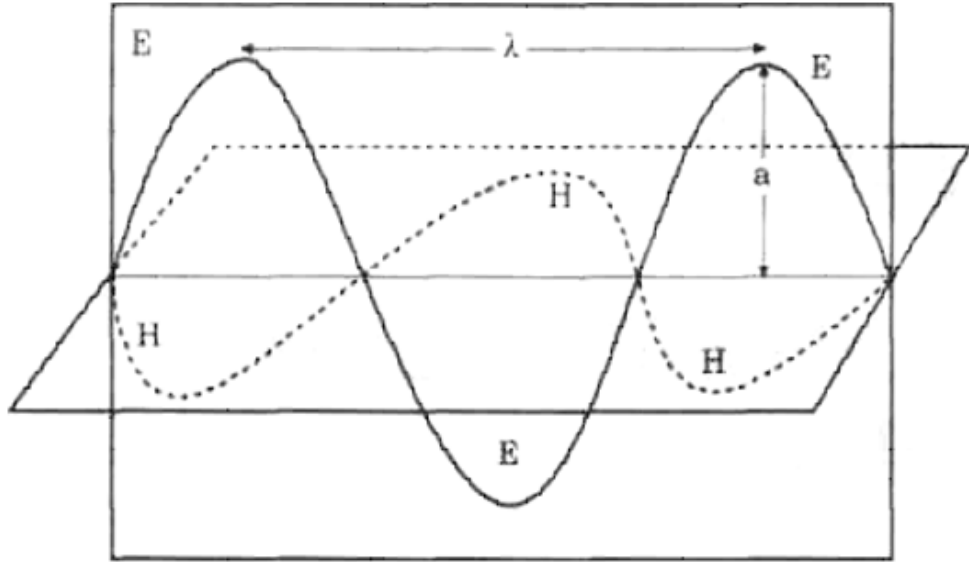
Spektroskopik yöntemler, ışığın kullanıldığı ve kullanılmadığı yöntemler olarak ikiye ayrılır. Maddenin ışın ile etkileşmesini inceleyen bilim dalına spektrofotometri denir. Spektrofotometrik yöntemler de atomik ve moleküler olmak üzere ikiye ayrılır. Spektrofotometri, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi esasına dayanır. En geniş tanımıyla spektrofotometri, ışık ile maddenin etkileşmesi sonucu meydana gelen olayların incelenmesine denir. Bu açıklamalardan sonra, kütle spektrometresi ışığın kullanılmadığı spektroskopik yöntemler sınıfına girmektedir⁴⁵.

Spektroskopi çalışmaları, 1665 yılında Newton'un üçgen bir cam prizma kullanarak beyaz ışığın belirli bir aralık içinde çeşitli renklere dağıldığını gösteren ünlü deneyi ile başlamıştır. 1860 yılında Bunsen ve Kirchhoff, analitik bir cihaz olarak entegre bir birim olan prizma spektroskopunu geliştirmişlerdir. Yapılan ilk çalışmalar, alev üzerinde çeşitli numunelerin emisyon spektrumlarının gözlenmesi, çeşitli elementler için alev deneylerinin başlangıcı ve güneş ışınları üzerine yapılan deneylerdir⁴⁶. Günümüzde spektroskopik çalışmalarda incelenen ışın kaynakları tanımı değiştirilmiş, görünür bölge ışınları, X ışınları, ultraviyole (mor ötesi), infrared (kızıl ötesi), mikro dalgalar, radyo dalgaları ve ses dalgalarını da içine alacak şekilde kapsamı genişletilmiştir.

2.8.1.1. Elektromanyetik Işıma (Radyasyon) ve Genel Özellikleri

Işın veya elektromagnetik ışıma (radyasyon) uzayda çok büyük bir hızla hareket eden bir enerji şeklidir. Işının uzaydaki hareketi dalgalar halinde olur. Elektromanyetik ışıma dalga ve tanecik olarak davranmaktadır. Elektromanyetik ışının, dalga boyu, frekans, periyodu, hızı, dalga sayısı, kırınımı ve genlik gibi parametreleri de içeren birçok özelliği ışının klasik sinüs dalga modeliyle açıklanabilir. Işın enerjisinin absorpsiyonu ve emisyonuyla ilgili olayların açıklanmasında dalga modeli başarılı olamamıştır. Bu olayların anlaşılabilmesi için, bir parçacık modeli geliştirilmiştir. Bu modelde elektromanyetik ışın, enerjileri ışın frekansı ile orantılı ve foton adı verilen parçacıklar veya dalga paketlerinden oluşmuş olarak görülür⁴⁷.

Elektromanyetik ışıma, hem elektrik alan vektörü hemde magnetik alan vektörüne sahiptir. E: dalganın elektrik vektörü, H: manyetik vektörü. Bu iki vektör birbirine dik ve her ikisi de yayılma yönüne diktir (a: genlik, λ :dalga boyu (Şekil 2.6)⁴⁵.

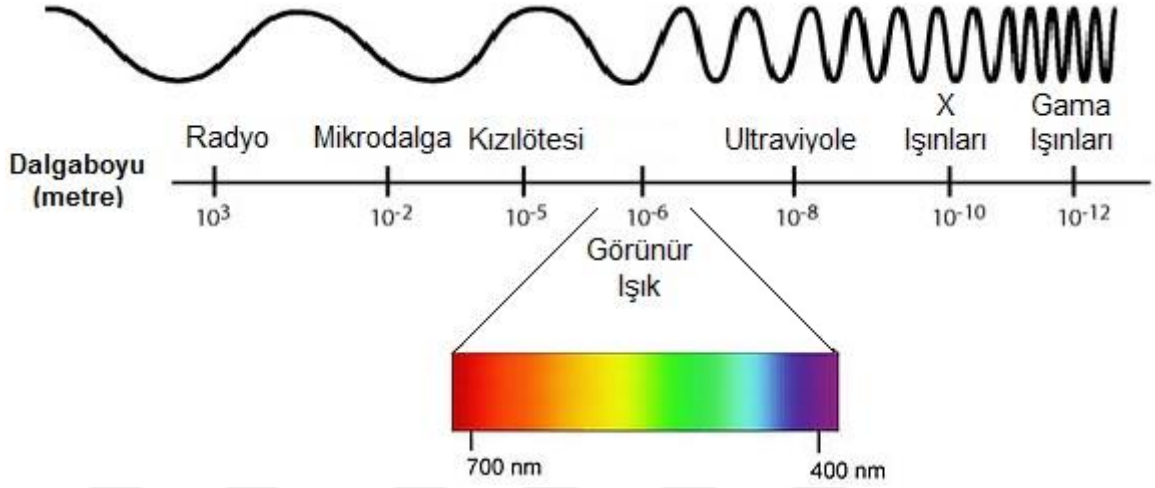


Şekil 2.6. Elektromanyetik Dalga⁴⁵

2.8.1.2. Elektromanyetik Spektrum

Şekil 2.7’te görüldüğü gibi elektromanyetik spektrum, çok geniş bir dalga boyu ve frekans (enerji) aralığını içine almaktadır. Aynı şekil üzerinde, başlıca spektral

bölgeler de gösterilmiştir. Spektral bölge ayrıntıları, her bölgedeki ışınları elde etme ve bu ışınları belirleme yöntemlerini esas almaktadır⁴⁷.



Şekil 2.7. Elektromanyetik spektrum⁴⁷

2.8.1.3. Işının Absorpsiyonu ve Absorpsiyon Spektrumu

Belli bir potansiyel enerji düzeyinde bulunan atomlar $h\nu$ (Enerji taşıyan ışın tanecikleri olan fotonların enerjisi) enerjili ışını absorpladıklarında dış elektronları belirli enerji düzeylerine geçiş yaparlar. Temel düzeydeki bir atomun ışık absorplayarak veya yüksek enerjili elektron, iyon veya moleküllerle çarpışarak yüksek enerjili uyarılmış düzeye ulaşmasına ait geçişler atomun absorpsiyon spektrumunu oluşturur. Atomun yüksek enerjili düzeylerden daha düşük enerjili düzeylere geçişlerinden dolayı emisyon spektrumu gözlenir⁴⁵.

Moleküller de atomlarda olduğu gibi uygun enerjili fotonlarla etkileştiklerinde bu fotonları absorplayarak uyarılmış hale geçerler. Uyarılmış moleküller bu kararsız durumdan fazla enerjilerini yayarak kurtulurlar ve böylece moleküler emisyon gözlenir.

Bir atomun veya molekülün uyarılması için gerekli enerji elektromanyetik spektrumun UV Görünür Bölgesine karşılık gelir⁴⁵.

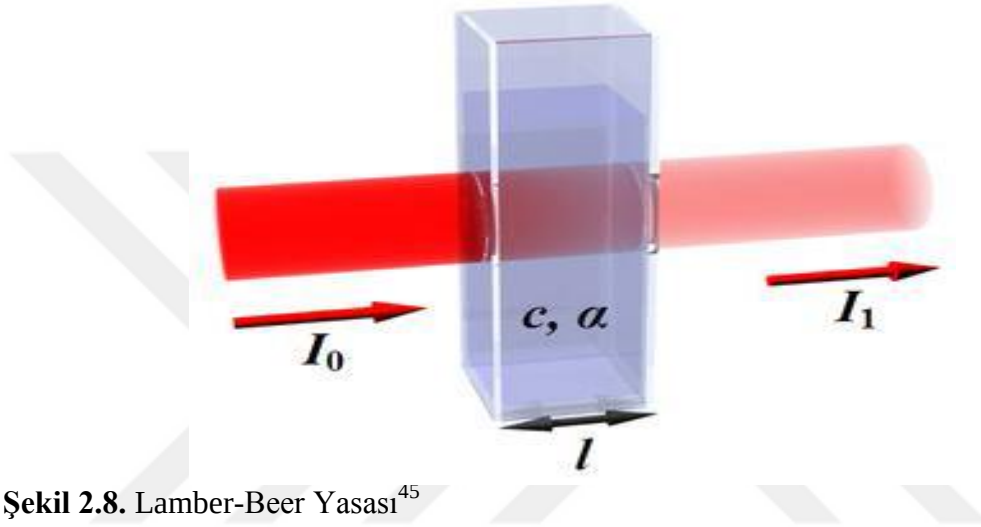
Bir molekül UV-visible fotonunu absorpladığı zaman elektronik enerjisiyle beraber dönme ve titreşim enerjisi de değişebilir. Bu nedenle moleküler spektrum,

atomik spektrum gibi basit olmayıp (keskin değil), hem karmaşık hem de geniş bantlar şeklindedir⁴⁵.

2.8.1.4. Lambert- Beer Kuralı

Absorpsiyon olayında, absorplanan ışının şiddeti *Lambert-Beer* eşitliği ile verilir (Şekil 2.8)⁴⁵. Buna göre;

$$A = \text{Absorbans} = \log I_0 / I = \epsilon \cdot l \cdot C$$



Şekil 2.8. Lamber-Beer Yasası⁴⁵

- ϵ =Absorpsiyon katsayısı (t/mol.cm)
- l (veya b ile gösterilir)= Işığın etkileştiği yol (cm)- (şekilde l olarak verilmiştir.)
- C = Konsantrasyon (mol/L)
- $c=g/L$ alınırsa $\epsilon=a$ ile gösterilir ve L/g.cm birimi ile verilir.
- Böylece $A=a.b.c$ olur.
- I/I_0 oranına geçirgenlik denir ve T ile gösterilir.
- $I/I_0 = T = 10^{-\epsilon l C}$ $A = -\log T = 2 - \log \%T$
- $\%T = \%$ Geçirgenlik adını alır.
- Çözeltide veya örnekte uygulanan λ' 'da ışığı absorplayacak birden fazla molekül veya atom varsa;

- $A=A_1+ A_2+\dots = \epsilon.b.c_1+ \epsilon.b.c_2+\dots$
- Bu ise sapmalara neden olur⁴⁵.

2.8.1.5. Lambert-Beer Yasasından Sapmalar

a) Gerçek Sapmalar:

- Bu yasa monokromatik ışın için geçerlidir.
- Örnek homojen olmalıdır.
- Aynı λ 'da absorpsiyon yapan birden fazla türün birbirinin absorpsiyonunu etkilememesi gerekir. $A= \epsilon.l.C$ eşitliğinde A-C doğrusal ilişkisi yukarıdaki şartlarda geçerlidir. Ayrıca C'nin 0,01 M'dan daha küçük olması gerekir. Daha derişik çözeltilerde kırılma indisi n artacağından ve moleküller arası etkileşmeler etkili olacağından A-C doğrusal ilişkisi bozulur. Çünkü $A= \epsilon.l.C$ eşitliğindeki ϵ aslında;

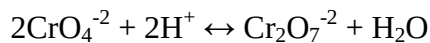
$\epsilon.n/(n^2+2)^2$ 'dir. Ancak seyreltik çözeltilerde $n/(n^2+2)^2$ değeri konsantrasyonla değişmediğinden, orantı katsayısı ϵ yazılmıştır⁴⁵.

b) Aletlerden İleri Gelen Sapmalar: Lambert-Beer eşitliği monokromatik ışın için geçerli olduğundan dedektöre kaçak ışık gelmesi veya ışığın saçılması sonucu şiddetinde azalma olması sapmalara neden olur⁴⁵.

c) Çözelti Etkileşmelerinden Gelen Sapmalar: Eğer örnek homojen değilse, bazı yerlerinde koagüle olmuş parçalar varsa, doğru bir absorbans ölçülemez. Bu parçalar ayrıca ışığın saçılmasına da neden olurlar. Moleküllerin assosyasyon (birleşme) veya disosyasyonu (ayırışma) da doğru absorbans değerini okumada sapmaya neden olur.



(suda) (benzende)



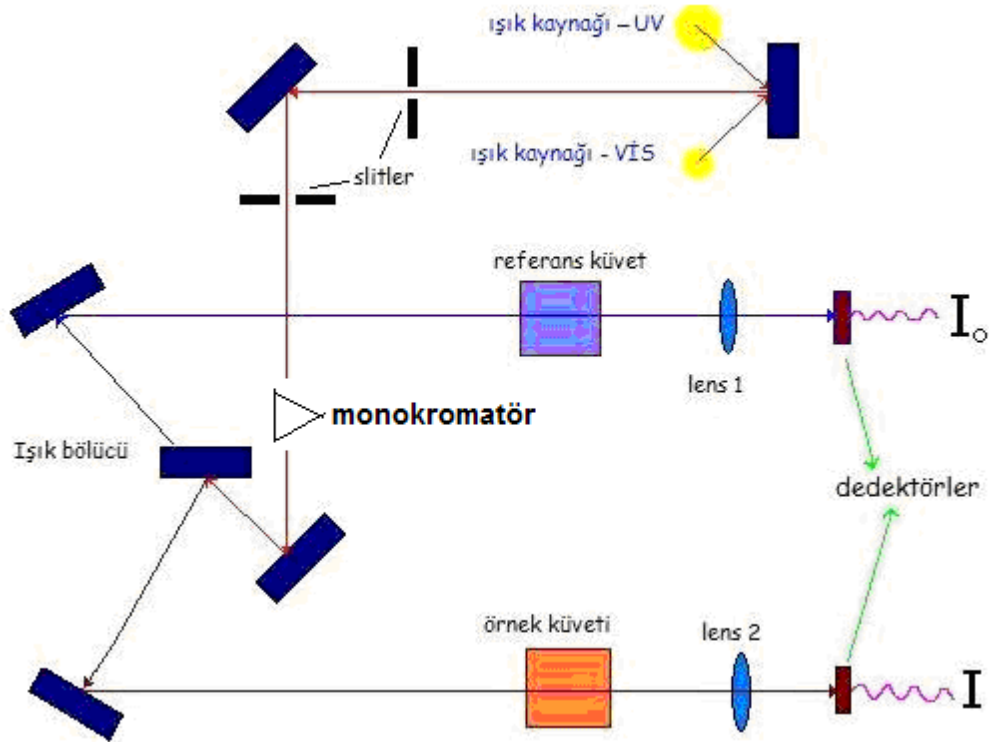
reaksiyonlarında görüldüğü gibi çözücü veya pH'ın değişimi farklı türlerin oluşumuna, bu da sapmalara neden olur. Çünkü her bir türün absorptans yaptığı λ boyu farklıdır⁴⁵.

2.8.1.6. UV-Görünür Bölge Spektroskopisi

Esası: Lambert-Beer eşitliğine göre moleküllerin monokromatik ışınları absorptlamasına dayanır.

Alet: Işın Kaynağı → Monokromatör → Örnek → Dedektör → Kaydedici

Bu ana bileşenlere ek olarak spektrometrelerde ışığı toplamak, odaklamak, yansıtmak, iki demete bölmek ve örneğin üzerine belli bir şiddetle göndermek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüleri ve giriş çıkış aralıkları vardır. Örnek ise kullanılan dalga boyu bölgesinde ışını geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına konularak ışık yoluna yerleştirilir. Şekil 2.9'da UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi verilmiştir⁴⁵.



Şekil 2.9. UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi⁴⁵

Spektrofotometrelerde konsantrasyonu bilinen bir standart çözeltinin absorptladığı ışık miktarı (absorptans, optik dansite) ile konsantrasyonu bilinmeyen

çözeltinin absorpladığı ışık miktarı karşılaştırılır⁴⁵.

2.8.1.7. Analitik Uygulamalarda Spektrofotometre

Nicel Analiz: Analizi yapılacak bileşenin veya ondan türetilen bileşiğin maximum absorpsiyon yaptığı λ seçilerek (ayrıca örnekte bulunan diğer bileşenlerin absorpsiyon yapmadığı λ), analizi yapılacak bileşenin farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerinin bu λ 'da absorbansları ölçülür. Böylece çizilen C-Absorbans grafiğine *kalibrasyon grafiği (veya çalışma grafiği)* denir⁴⁵.

Nitel Analiz: Organik maddelerin UV-Görünür Bölge ışınlarını absorplamasıyla elektronik geçişler genellikle σ , π ve n elektronlarında olur. 185 nm'den büyük λ bölgesinde absorpsiyon yapan fonksiyonel gruplara *kromofor* denir.

$\sigma \rightarrow \sigma^*$: Diğer geçişlere oranla bu geçişler için daha büyük enerji gereklidir. Örnek; CH_4 de sadece C-H bağları vardır ve bu bağlar 125 nm'de absorpsiyon yaparlar. C_2H_5 'te C-C bağı, C-H'tan daha zayıf olduğundan, bu bağın uyarılması daha az enerji gerektirir. Bu nedenle bu bağlar 135 nm'de absorpsiyon yaparlar. 200 nm'nin altında havadaki N_2 ve O_2 de absorpsiyon yaptığından vakumda çalışmak gerekir. Bu da kullanışlı değildir.

$n \rightarrow \sigma^*$: Hidrojence doymuş bileşikler fonksiyonel grup taşıyorlarsa bu grupta ortaklanmamış elektron çifti bulunabilir. Bunlar 150 – 250 nm arasında $n \rightarrow \sigma^*$ geçişi yaparlar. Bu gruplar fazla olmadığından kullanışlı değildirler.

$n \rightarrow \pi^*$ ve $\pi \rightarrow \pi^*$: 200 – 700 nm arası ışınları absorplar. $n \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin ϵ 'ları 10-100 nm; $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerinde ise $\epsilon = 1000-10000 \text{ L/cm mol}$ arasındadır.

$n \rightarrow \pi^*$ geçişlerindeki pikler çözücünün polarlığı arttıkça kısa λ 'na kayarlar (maviye kayma ya da hipsokromik kayma). $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerinde ise ters bir eğilim yani kırmızıya kayma (batokromik kayma) meydana gelir.

Çeşitli kromoforların ışığı maximum absorpladıkları λ 'ları farklı yerde olmakla

beraber;

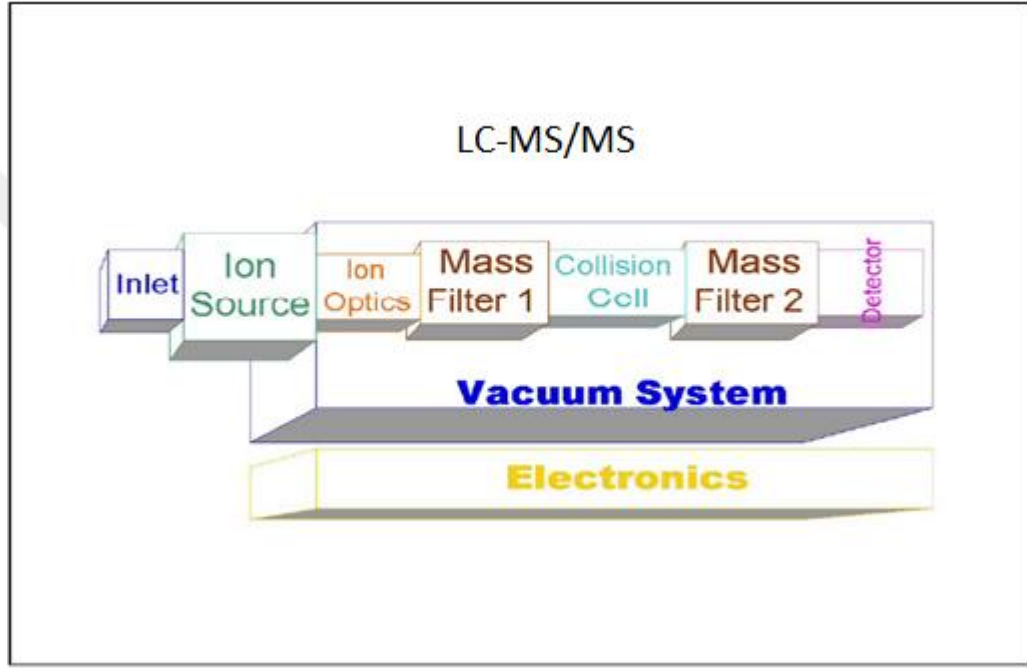
A- Bir kromofor diğerrinin absorpsiyonunu etkileyebildiğinden,

B- Çeşitli kromoforların absorpsiyon bandları birbiri ile örtüştüğünden,

C- Absorpsiyon bandları genellikle geniş olduğundan

UV-Görünür Bölge spektrofotometresi ile nitel analiz pek kullanışlı değildir⁴⁵.

2.8.2. LC-MS/MS Yöntemi



Şekil 2.10. LC-MS/MS'in iç yapısı⁴⁹

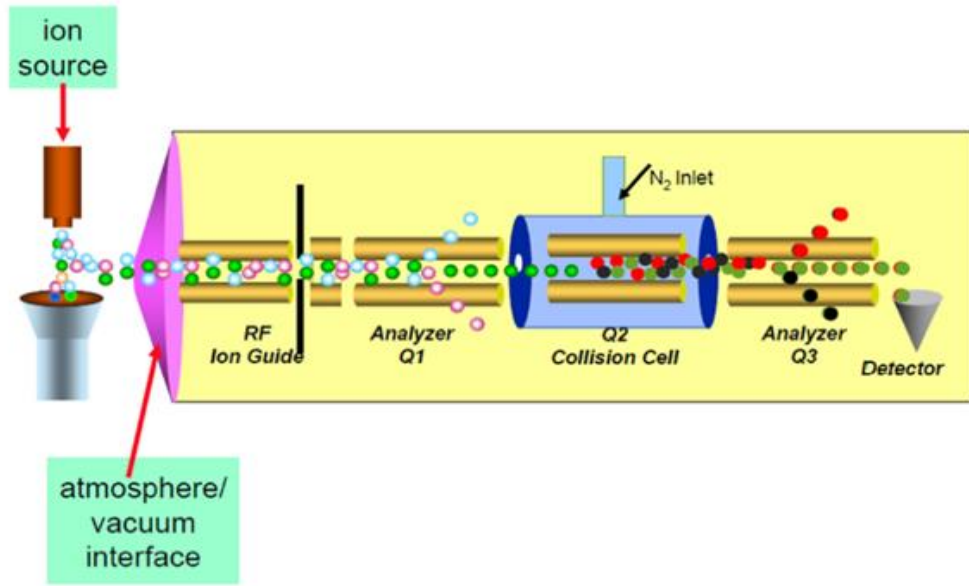
LC-MS/MS tekniğinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller kütle detektörü ile analiz edilmektedir. İyonlaşma odasında iyonlaştırılan ve birincil parçalanmaya uğratılan moleküller, birinci kuadrupol filtrede m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılır. Tayin yapılacak iyon filtreden geçer, diğerleri kalır. Filtreden geçen iyon moleküller collision gaz adı verilen yüksek saflıkta azot gazı ile parçalanmaya tabi tutulur. İkinci kuadrupol filtrede parçalanma sonucu oluşan iyonlar arasından seçilen ikincil iyon detektöre ulaşır ve bu iyon üzerinden teşhis ve miktar tayini yapılır. LC sisteminde kullanılan kolon ve çözücüler kontaminasyona

karşı çok stabildir, böylece çok kirli örneklerle çalışabilme avantajına sahiptir⁴⁹. Şekil 2.10'da LC-MS/MS'in iç yapısı, Şekil 2.11'de Triple Kuadrupol Kütle Spektrometresi ve Şekil 2.12'de QQQ cihazındaki MRM diyagramı verilmiştir.

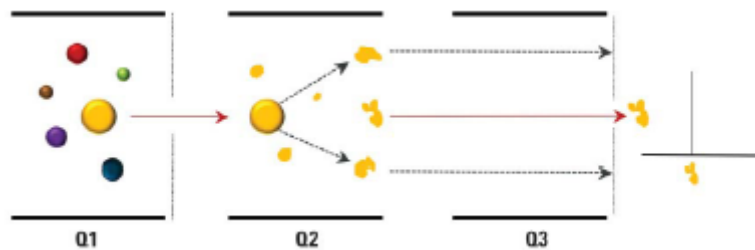
İyon optik bölümü: İyon optikler iyonların cam kapilerden sonra odaklanarak Quadrupollere etkin şekilde girişini sağlar.

Quadrupoller seçici filtrelerdir. İstenilen iyonların ilerleyişini sağlar. LC-MS/MS de iki adet Quadrupole bulunur⁴⁹.

Parçalama hücresi iki Quadrupolun ortasında bulunur. İlk Quadrupoleden seçilip gelen iyonlar parçalama hücresinde yüksek saflıktaki azot gazına çarptırılarak parçalanır. Oluşan Fragmanlar ikinci Quadrupole girer⁴⁹.



Şekil 2.11. Triple Kuadrupol Kütle Spektrometresi⁴⁹



Şekil 2.12. QQQ cihazındaki bir MRM diyagramı⁴⁹. Q₁ Precursor iyonu seçer. Q₂ de parçalanma(fragmentation) meydana gelir. Q₃ ise oluşan product iyonu seçer.

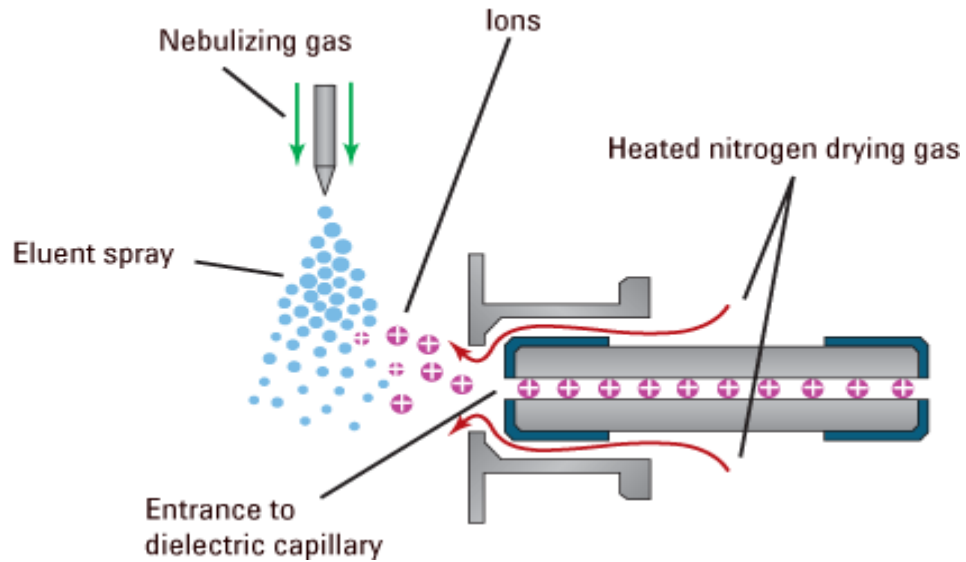
İkinci Quadrupole gelen fragmanlar seçilerek istenilenler dedektöre gönderilir⁴⁹.

Dedektör: Quadrupollerde seçilen iyonlar elektronlara dönüştürülerek dedektörde okunur. Pozitif modda gelen pozitif iyonlar dedektöre düşürülerek (10 kV) elektronlar fırlatılır. Elektronlar saptırılarak elektron çoğaltıcıya gönderilir. Ölçülen akım sinyale dönüştürülür. Negatif modda gelen negatif iyonlar dedektöre düşer fırlayan pozitif iyonlar tekrar elektronlara çevrilerek elektron çoğaltıcıya gönderilir.

LC/MS sisteminde 4 farklı iyonizasyon tekniği bulunmaktadır.

1. Doğrudan sıvı girişi (Direct liquid introduction) (DLI)
2. Termosprey (TS)
3. Atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırma (APCI)
4. Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)

Biz çalışmamızda elektrosprey iyonizasyon (ESI) kullandık. Bu teknikte analit, likit kromatografiden gelen çözücü ile birlikte püskürtülür, bu esnada ısıtılmış kurutucu gaz ve güçlü bir elektrik alan uygulaması ile kütle dedektörüne girmeden önce iyonlaşır⁴⁸. Şekil 2.13'de bir ESI LC-MS/MS diyagramı verilmiştir.



Şekil 2.13. ESI LC-MS/MS⁴⁹

Elektrosprey arayüzü (ES) genelde polar yapılı, kolay iyonlaşabilen ve kolay

parçalanabilen maddeler için iyi bir tercihtir. Parçalanma tekniği basittir ve parçalanma çok az miktarda olur. Bu birimde iyonlaşma, likit kısımdan yollanan solventin içinden geçtiği dışarıdan ısıtılan kapiler tüpe 3-4 kV potansiyel uygulanmasıyla sağlanır. Isınan ve aynı zamanda yük kazanan damlacıkların çapı küçüldüğü sırada nozül içerisinden sisteme spreylenebilir. Bazı ticari modellerde nozül etrafında içinden inert gazın geçtiği ve buharlaşmayı kolaylaştıran bir başka tüp daha bulunmaktadır⁵⁰.

Kütle/iyon (m/z) oranı aynı olan pek çok molekül mevcuttur. Fakat doğada aynı parçalanma iyonuna sahip molekül 1/10000 oranındadır. Bu nedenle LC-MS/MS tekniği analiz edilen maddeye özgü özel bir testtir. Bunun yanısıra çok düşük konsantrasyonlarda maddenin kantitatif tayininin yapılabilmesi LC-MS/MS ile mümkündür⁵¹.

Standart HPLC tekniğinde madde sadece alıkonma süresine (t_R) göre teşhis edilirken LC-MS/MS teknolojisi ile alıkonma süresine (t_R) ek olarak “1.cil ve 2.cil” iyonlarla (moleküler iyon ve ürün iyon) değerlendirilmektedir. Bu da bu tekniğin spesifikliğini güçlendiren bir faktördür⁵¹.

Madde enjeksiyondan sonra guard (koruyucu) kolondan geçerek yağlar ve diğer kolon tıkayıcı maddelerden arınarak analitik ayırmanın gerçekleştirileceği kolona, mobil faz karışımı içinde geçer. Kolonda elüsyon gerçekleşirken maddeler kolon duran fazına olan farklı ilgilerine göre kolonda birbirlerinden ayrılır. Ayrımı gerçekleştirilmek istenen maddelerin özelliğine göre optimum mobil faz karışımı kullanılarak (A ve B mobil fazların en uygun karışım oranları) piklerin birbirinden ayrılması sağlanır. Kolonla etkileşimde ve madde bileşenlerinin birbirinden etkin olarak ayrılmasında en etkili faktörlerden biri polarite, pH ve molekülün yapısıdır. Maddenin hangi oranda non-iyonize formda bulunacağı ortamın pH'ına ve molekülün pKa değerine bağlı olduğundan, mobil fazda uçucu özellikte tampon çözeltileri kullanılabilir. Zira

maddenin alıkonma zamanı maddenin hangi formda bulunduğuna da bağlıdır. Mobil fazlar degaze edilerek kolona hava girmesi engellenir⁵¹.

Örnek, kuadropollerden geçerek parçalanmak üzere MS'e girer. Bir kuadropol, bir kare düzlem boyunca sıralanmış 4 paralel çubuktan oluşur. Analit iyonları kuadropolün oluşturduğu karenin içine yönelir. Çubukların ortasında elektromanyetik alan üretmek üzere çubuklara voltajlar uygulanır. Bu elektromanyetik alanlar verilen bir zaman aralığında, hangi m/z oranına sahip iyonların filtreden geçeceğini belirler. Kuadropoller, en basit ve en az pahalı kütle analizörleridir⁵¹.

Multiple-stage MS'lerde; kapiler boruya, (Q_0) giren örnek, burada parçalanır, birinci kuadropol (Q_1) öncül iyonu (örn: $[M+H]^+$) seçmek için kullanılır. İkinci parçalanma, CID, çarpışma hücresi denilen (Q_2) de gerçekleşir. Q_2 , argon gazıyla dolu bir odada radyofrekanslı bir çarpışma odacığdır. Q_2 , seçilen öncül iyondan farklı parçalar elde edildiği hücredir. Q_3 sadece tek bir ikincil iyonu filtre eder. Sadece bu iyon detektöre ulaşır ve bu iyondan hem nicel tayin, hem de öncül iyondan oluşan ikincil iyon gözlenerek nitel tayin gerçekleştirilebilir. Birincil parçalanmadan elde edilen öncül iyonun ikinci kez parçalanması ve bu parçalanmadan elde edilen o analite özgü karakteristik iyonun izlenmesi işlemine MRM (Çoklu Reaksiyon İzleme) denir. MRM işleminin duyarlılığı, oluşan ikincil iyonun miktarını belirler. Q_3 'ten detektöre gelen iyonlar sayılır⁵¹.

Genel bir bakış açısıyla kütle analizörleri iki modda çalışır: Scan modu ve SIM modu. Scan modunda, kütle analizörü geniş bir aralıkta farklı m/z oranlarına sahip iyonları izler. SIM modunda ise, sadece belli m/z oranına sahip parçaları izler. Daha duyarlı olmakla birlikte, daha az iyon hakkında bilgi verir. Scan mod, tipik olarak önceden tüm analit kütlelerinin bilinmediği zaman, tarama ve kalitatif analiz amacıyla kullanılır. SIM mod ise, hedef bileşiklerin tayini, izlenmesi ve kantitasyonu amacıyla

kullanılır. SIM tek MS li sistemlerde kullanılmakta olup, LC-MS/MS te daha ziyade MRM kullanılır⁵¹.

2.8.2.1. LC-MS/MS'in Avantajları^{52,53}

1. Son derece hassas ve güvenilir bir yöntem olması.
2. Yaklaşık iki dakika gibi kısa sürede sonuca ulaşılması.
3. Otomasyona uygun olması ve kısa sürede çok sayıda analiz yapabilmesi.
4. Testler için çok az miktarda kan örneğine ihtiyaç duyulması.
5. Yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçların az oranda olması.
6. Tek bir analiz ile bir çok etken maddenin aynı anda taranması.
7. Maliyet açısından ekonomik olmasıdır.

2.8.2.2. LC-MS/MS'in Uygulama Alanları

LC-MS/MS ilaç ile ilgili olan çalışmalarda oldukça sık başvurulan bir yöntemdir. Bundan dolayı farmakokinetik ve biyoanaliz çalışmalarında yaygın bir kullanım alanı vardır. Bu çalışmalarda en kısa sürede ilacın kanda, idrarda ve organlarda tayinini yapmak çok önemlidir. MS/MS hassasiyetinin, analiz süresinin ve seçiciliğinin üst düzeyde olması nedeni ile diğer yöntemlere tercih edilmektedir⁵⁴.

MS/MS kullanımındaki en büyük avantajlardan biri de dedektörün sadece belli bir iyonun ölçülmesine programlanabilmesidir. İşlem genelde bir seçim işlemidir fakat görüldüğünden daha komplekstir. MS/MS yöntemi ile analiz süresi bir dakika ve altına düşürülebilmektedir. Bu analiz süresi HPLC'nin ortalama 10 dakikalık analiz süresi ile karşılaştırıldığında oldukça hızlı görünmektedir. LC-MS/MS yöntemi yüksek çözünürlükteki kütle spektroskopilerinde çakışan moleküllerin analizinde dahi kullanılır⁵⁴.

2.9. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Uygun zamanda doğru ve güvenilir veri sağlama kabiliyetinde analitik kimyanın

rolü çok fazladır. Analitik verilerin niteliği, yöntem geliştirme ve yöntem geçerlilik (validasyon) testlerinin kalitesi üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Burada ilk adım yöntem için kabul edilebilir şartlar olan minimum kriterleri belirlemektir⁵⁵.

2.9.1. Yöntem Geliştirme

Yöntem geliştirme basamakları aşağıda belirtilmektedir⁵⁵;

1. Yöntemin amacını, kapsamını ve uygulaması tanımlanmalıdır.
2. Yöntemin performans parametreleri ve kabul kriterleri tanımlanmalıdır.
3. Cihazın performans karakterleri tanımlanmalıdır.
4. Çalışılan materyaller nitelenmelidir.
5. Son olarak yöntem geliştirilip belgelenmelidir.

2.9.2. Yöntem Geçerlilik (Validasyon) Testleri

Yöntem geçerlilik testleri (validasyon), ürünlerin değerlendirme prosesinde, kalitatif veya kantitatif analizlerde seçilen yöntem veya yöntemlerin bu analiz işlemlerinde uygulanabilir olduğunu göstermek için yapılan testlerin tamamıdır⁵⁵.

Bir yöntemle yapılan ölçümün sonuçları birçok faktöre bağlıdır (Laboratuvar şartları, cihaz, kullanılan kimyasal madde, standart ve operatör deneyimi). Bu nedenle yöntemin ölçüm sonucuna etki eden parametreleri tek tek ölçülerek ölçüm sonucuna etkileri belirlenmeli ve ölçülmelidir⁵⁵.

Uluslararası kabul edilen çeşitli geçerlilik (validasyon) kriterleri mevcuttur. ISO/IEC, ICH, US EPA, US FDA, USP, cGMP gibi kurumlar tarafından belirlenmiş kriterler kullanılmaktadır. Analitik yöntem validasyonunun gerekli olduğu durumlar aşağıda sıralanmaktadır⁵⁵.

1. Herhangi bir yöntemin laboratuvarda ilk defa kullanılacağı zaman,
2. Bir analiz için yeni yöntem geliştirildiğinde,
3. Kullanılmakta olan yöntemde değişiklik yapıldığında,

4. Valide bir yöntemin başka bir laboratuvarında kullanılacağı durumlarda,
5. Yeni personel tarafından yöntemin ilk defa kullanılması durumunda,
6. Temel kimyasallarda önemli bir değişiklik yapıldığında (yöntem modifiye edildiğinde),
7. Uzun süredir kullanılmamış bir valide yöntemin yeniden kullanıma alınması durumunda,
8. Laboratuvarında yapılan ve sonuçları etkileyebileceği düşünülen değişiklikler olduğunda,
9. İki yöntemin karşılaştırılması amacıyla,
10. Kalite kontrol testleri sonucunda yöntemin performansında zamanla bir değişme olduğu anlaşıldığında yöntem geçerlilik testleri (validasyon) yapılır.

2.9.2.1. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon) Nasıl Yapılır⁵⁵ ?

- Geçerli kılma için bir strateji oluşturulur.
- Yöntemin uygulama amacı ve kapsamı belirlenir.
- Geçerli kılma deneyleri yapılır.
- Kullanılacak cihazların performansının yöntem için yeterli olup olmadığı kontrol edilir.
- Kullanılacak kimyasallar ve standartların kalitesi belirlenir.

2.9.3. Analitik Yöntem Geçerlilik Test (Validasyon) Parametreleri

Analitik yöntemin kabul edilebilirliğini göstermek için kullanılan analitik parametreler⁵⁵:

1. Belirleyicilik/ Seçicilik (*Specificity/ Selectivity*)
2. Doğruluk (*Accuracuy*)
3. Kesinlik (*Precision*)
 - a-Tekraralabilirlik (*Repeatability*)

b-Arakesinlik (*Intermediate Precision*)

c-Yenilenebilirlik (*Reproducibility*)

4. Doğrusallık (*Linearity*) ve Çalışma aralığı (*Range*)

5. Duyarlılık Limiti (*Sensitivity*)

a- Gözlenebilme Sınırı (Teşhis Limiti) (Limit of Detection, LOD)

b-Miktar Tayin Alt Sınırı (Tayin Alt Limiti) (Limit of Quantitation, LOQ)

6.Geri kazanım (*Recovery*)

7. Sağlamlık /Dayanıklılık (*Robustness/ Ruggedness*)

8. Özgünlük (Matriks etkisi)

9. Stabilité (*Stability*)

2.9.3.1. Belirleyicilik/Seçicilik (*Specificity/ Selectivity*)

Numunede bilinen parçalanma ürünlerinin varlığında bir analitin ölçülebilme yeteneğidir⁵⁶. Yöntemin analite özgü olup olmadığını gösterir. Seçicilik için tayin edilecek olan maddenin standart çözeltilerinin piklerinin elde edildiği kromatogramlar, etken madde hariç diğer maddelerin içinde çözülmüş halde bulunduğu matriks (kör idrar örneği) kromatogramı ile kıyaslanır. Etken madde pikinin geldiği alıkonma zamanında çözücünden kaynaklanan bir girişim olmadığı gözlenirse, optimize edilmiş cihaz parametrelerinde enstrümental yöntemin seçici olduğuna karar verilir. Eğer etken madde, biyolojik sıvılar, toprak, karaciğer vs. gibi bir matriksten ekstrakte edilecekse özütleme sonunda elde edilen madde kromatogramında, matriksin kendinden ve özütleme işlemlerinde kullanılan kimyasallardan gelen herhangi bir pik girişimi olmadığı da test edilmelidir. İçine bildiğimiz miktarda analit katılmış olan örneklerle aynı şekilde özütlenmiş kör matriks kromatogramı kıyaslanarak etken maddenin cihazdaki sinyaline herhangi bir girişim olup olmadığı anlaşılır. Bu şekilde de yöntemin seçiciliği ortaya konmuş olur⁵⁶.

2.9.3.2. Doğruluk (Accuracuy)

Doğruluk, bir analitik yöntemde elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlığı olarak ifade edilir. Doğruluk iki şekilde verilir: 1- Bağıl Hata ve 2- Geri Kazanım. Doğruluk çalışmasında, ilk önce kalibrasyon eğrisi içine düşen düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda kalite kontrol çözeltileri hazırlanır ve belirlenen yöntem ile en az altı kez ölçümleri alınır. Analiz sonuçlarının ortalama değeri ve standart sapması belirlenir. % Bağıl Hata (%BH) = [(Bulunan Değer-Gerçek Değer)/Gerçek Değer]x100 formülünden belirlenir. İkinci yöntemde ise geri kazanım değerleri belirlenir^{56,57}.

Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi işlemi aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- a. Bilinen konsantrasyonlara sahip bir seri örneğin analiz ve sonucunun gerçek değerle karşılaştırılması ile gösterebilir.
- b. Sonuçların daha önce belirlenen doğru bir yöntemle alınmış sonuçlarla karşılaştırması ile gösterilebilir.
- c. Hedef konsantrasyon üzerinde üç düzeyde üç deney yapılarak katım yapılmış numune üzerinde çalışılarak gösterilebilir.

2.9.3.3. Kesinlik (Precision)

Aynı şartlarda ve aynı yöntemle elde edilen analiz sonuçlarının birbirine yakınlığını, diğer bir deyişle ölçümlerin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Analitik bir işlemin veya ölçümün kesinliği yaygın olarak 3 terimle ifade edilmektedir.

- a. **Tekrarlanabilirlik:** Aynı çalışma şartlarında kısa bir zaman aralığında olacak tekrarlanan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. Günlük kesinlik olarakta adlandırılır. % BSS (yüzde bağıl standart sapma) değeri ile verilir.
- b. **Ara kesinlik:** Değişik gün, operatör ve cihazda yapılan deneyin sonuçlarının kesinliğini göstermektedir. Günler arası kesinlik, gün değişkenliği kullanılarak yapılan ara kesinlik çalışmasıdır ve aynı çalışma şartlarında

numunelerin farklı günler (en az üç gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az $n=6$) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsü olarak tanımlanır. %BSS değeri ile verilir.

c. Yenilenebilirlik: Laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder. %BSS değeri ile verilir.

2.9.3.4. Doğrusallık (*Linearity*) ve Çalışma Aralığı (*Range*)

En düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru bir seri çözelti hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralığın belirlenme işlemine doğrusallık denir. Bu aralık belirlendikten sonra çözeltinin konsantrasyonuna karşı elde edilen cevaplar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Kalibrasyon eğrisinin analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür. Çalışma aralığı ise kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın elde edildiği analit konsantrasyon genişliğidir⁶⁷.

2.9.3.5. Duyarlılık Limiti (*Sensitivity*)

Bir cihazın ve yöntemin hasaslığı, tayini yapılacak maddenin konsantrasyonda meydana gelecek en küçük değişiklikleri bile fark edebilme özelliğidir ve analitik yöntemin en düşük konsantrasyonlardaki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür⁶⁷.

a. Gözlenebilme Sınırı (Teşhis Limiti, Limit of Detection-LOD):

Bir analitik işlemin gözlenebilme sınırı, bir örnekteki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük miktarıdır. Ancak burada belirlenen konsantrasyon kantitatif tayin için tam olarak kesinlik ifade eden bir değer değildir. LOD değerleri yöntemin özelliğine göre değişik şekillerde belirlenebilmektedir. Kromatografik çalışmalarda pik yüksekliğinin gürültü yükeğine oranının 3 olduğu konsantrasyon gözlenebilme sınırı (LOD) olarak kabul edilir⁶⁷.

b. Miktar Tayin Alt Sınırı (Tayin Alt Limiti, Limit of Quantitation-LOQ):

Kalibrasyon eğrisinde veya cihazın tayin edebileceği analitin en düşük konsantrasyona miktar tayin alt sınırı denilmektedir. Belirlenen deney koşulları altında, analitik yöntemin miktar tayin alt sınırı değeri numune içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyondur. LOQ değerleri de yöntemlerin özelliklerine göre değişik şekillerde belirlenmektedir. Kromatografik çalışmalarda pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranının 10 olduğu konsantrasyon miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlenir⁶⁷.

2.9.3.6. Geri Kazanım (Recovery)

Kimyasal ölçümlerde gerçek değerın ölçülmesi uygulanan yöntemle bağımlı olarak değişim gösterir. Deneysel işlemler esnasında çeşitli nedenlerle bir kayıp oluşur. Bu kayıp miktarının oranını ve belirsizliğini hesaplamak gerekir. Kayıp miktarı yöntemin geri kazanım oranı olarak ifade edilir. Analiz sonucunda bulunan değerin gerçek değere oranıdır⁶⁷.

2.9.3.7. Sağlamlık /Tutarlılık (Robustness/Ruggedness)

Bir yöntemin sağlamlığı, onun yüzde organik madde içeriği, mobil fazın pH'sı, tampon konsantrasyonu, sıcaklık ve enjeksiyon hacmi gibi parametrelerdeki küçük değişikliklerden etkilenmeme yeteneğidir. Bir yöntemin tutarlılığı ise, gerçek kullanım şartları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bu parametrelerin etkileri üzerinde veri elde etmek, son yöntem prosedüründe yer alacak kabul edilir değerlerin bir dağılımına izin verebilir. Örneğin, zamanla kolon performansı değişiyorsa, kolondaki değişimleri telafi etmek (gözetmek) için mobil faz kuvveti ayarlamaya izin verilebilir, eğer böyle bir veri validasyonda yer alıyorsa yöntem sağlamlığı; farklı veya aynı laboratuvarlarda farklı kişiler, farklı cihazlar, farklı kimyasallar ve farklı zamanlarda yapılan analizlerin değerlendirilmesi ile de ölçülür⁶⁷.

2.9.3.8. Özgünlük (Matriks Etkisi)

LC-MS/MS'in kendi özünde olan yüksek hassasiyet ve seçiciliğinden dolayı kantitatif bioanalizler için güçlü analitik bir tekniktir. Bioanalitik yöntemlerin doğruluğu, hassasiyeti ve kararlılığına matriks etkisi ilaç endüstrisinde artan bir endişe konusudur⁵⁸. Matriks etkisi, kütle spektrometresinde plazma gibi biyolojik matriks içindeki analitten alınan cevap ile standart solüsyon içindeyken aynı analitten alınan cevap arasındaki fark olarak tanımlanmıştır⁵⁸.

Matriks etkisi son derece değişken olabilmektedir. Kontrol veya tahmin etmek zor olabilmektedir ve biyoanalitik yöntemlerin doğruluk ve kesinliğinde önemli hatalara neden olabilmektedir⁵⁸. Güncel Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) kılavuzunda artık bu etkilerin kantitatif LC-MS/MS yönteminin gelişimi, validasyonu ve rutin kullanımının bir parçası olarak değerlendirilmektedir.

Matriks etkisini değerlendirmek için iki yaygın yöntem vardır. Bunlar post-kolon infüzyon ve post-ekstraksiyon pik yöntemidir. Post-kolon infüzyon yöntemi büyük olasılıkla matriks etkisi ile karşılaşılan kromatografik bölgeleri tanımlar, matriks etkisinin nitel bir değerlendirmesini sağlamaktadır⁵⁸. Tersine post-ekstraksiyon pik yöntemi matriks etkisini numune hazırlama işlemi gerçekleşmiş blank matriks örneğinden elde edilen analit pik cevabı ile matriks içermeyen çözeltideki analit pik cevabını karşılaştırarak kantitatif bir değerlendirme sağlamaktadır⁵⁵. Bu şekilde, numunedeki tüm analitlerde karşılaşılacak iyon supresyon veya iyon arttırmanın kantitatif etkisi, analitik yöntemdeki her değişiklikte ölçülebilecektir. Bu yöntemde Chambers ve ark⁵⁸, matriks etkisini hesaplamak için %matriks etkisini kullanmışlardır ve %matriks etkisini aşağıdaki formülle hesaplamışlardır.

$$\% \text{Matriks Etkisi} = [(A/B) - 1] \times 100$$

A: Cevap_{post-ekstrakte numune piki}

B: Cevap_{non-ekstrakte matriks içermeyen numune piki}

Şekil 2.14. %Matriks etkisi formülü

2.9.3.9. Stabilite (Stability)

Bir çalışma boyunca çalışılan örneklerde ve çalışma sonrası saklanan örneklerde analiz edilen bileşenin bozunmadan sabit kaldığı süreyi belirlemek için yapılan işlemlerin tümüne stabilite çalışması denilmektedir. Yayınlanan literatürler de dikkate alınarak laboratuvar testleri ile analiti veya analit çözeltisinin laboratuvar şartlarında, nem, ısı, ışık, ve hava gibi etkilere maruz bırakıldığında ne kadar süreyle bozunmadan kaldığı Uluslararası Kabüllere göre belirlenmelidir.

- a) Donma ve erime stabilitesi:** Biyolojik numunelerde çalışma esnasında numunelerin derin dondurucuda bekletilip çalışma amacıyla çıkarıp çözme işlemlerindeki stabilitesi olup bunun içinde üç donma ve erime turlarından sonra çalışılan analitin stabilitesinin belirlenmesidir⁶⁷.
- b) Kısa-dönem sıcaklık stabilitesi:** Oda sıcaklığında 2 ile 24 saat arasında numune bekletildiğinde bozunup bozunmadığının belirlenmesidir⁶⁷.
- c) Uzun dönem stabilitesi:** Çalışılan numunenin bozunmadan kaldığı sürenin belirlenmesi için yapılan işlemlere denir⁶⁷.
- d) Stok çözeltinin stabilitesi:** Çalışılan analitin ve internal standartın stok çözeltisinin bozunmadan kaldığı sürenin belirlenmesi işlemidir. Ayrıca eğer stok çözeltiler uygun peryotlarla dondurulup veya buzdolabında tutulurakta stabilitesi belirlenmelidir⁶⁷.
- e) Hazırlama sonrası stabilite:** Oto örnekleyici içindeki bekleme zamanını içeren işlenmiş örneklerin stabilitesinin belirlenmesidir⁶⁷.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Çalışmalarda kullanılan albendazol (ABZ) standart maddesi Sigma- Aldrich (Germany)'den temin edildi. Kimyasal çözücü olarak metanol (Merck, Germany) HPLC saflıkta ve Hidroklorik Asit (Merck, Germany) analitiksel saflıkta kullanıldı. Ayrıca albendazol sülfoksit (ABZSO) ve albendazol sülfon (ABZSO₂) Sigma- Aldrich (Germany)'den temin edildi. Çözücü olarak LC-MS saflıkta metanol (Fluka) kullanıldı. Mobil faz için LC-MS saflıkta metanol (Fluka), Milli-Q saflıkta su, formik asit, Amonyum Asetat (Merck) kullanıldı.

Çalışmalarda kullanılan otomatik pipetler (10 - 100 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL ve 1000 - 5000 µL) ve kuvartz küvet (USA) Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvar'ından temin edildi.

Biyolojik matriks olarak kullanılan tavşan plazması ve New Zealand türü Beyaz sağlıklı tavşanlar Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) tarafından temin edildi. Tavşan deneyleri için Etik Kurul onayı Ek-2.'de verildi.

Albendazol içeren, Andazol isimli ticari farmasötik preparatlar eczanelerden temin edildi.

3.1.2. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihaz isimleri ve markaları:

- Spektrofotometre: Thermospectronic HeλIOS β
- Bilgisayar: Vestel
- Santrifüj: Hettich, RPM x 100
- Terazî: Metler Toledo Ad 104-5

- Vorteks: IKA
- Su banyosu: GFL
- Etüv: Memmert
- Ultrasonik Banyo: Elma LC30
- LC-MS/MS Sistemi (Erzurum Adli Tıp Grup Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesi): Agilent Technologies 6460 Triple Quand ve HP bilgisayar
- Kolon: Agilent poroshell 120 EC-C18 (4.6*150mm 2.7 micron) kolon



Şekil 3.1. Agilent technologies 6460 Triple Quand LC/MS cihazı

3.2. Yöntemler

3.2.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Yöntem Şartları

ABZ'nin standart çözeltileri ve gerçek numuneler için spektrofotometrik yöntem şartları Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1. ABZ için spektrofotometre yöntem şartları

Yöntem Şartları	Albendazol (ABZ)
Data Modu	Absorbans
Start Lamba (nm)	280
Stop Lamba (nm)	340
Lamba Değişimi (nm)	325
Tarama Hızı (nm/dk)	600
Bant Genişliği (nm)	2.0
Düzgünlük	Yüksek

3.2.2. LC-MS/MS Yöntem Optimizasyonu

Albendazol (ABZ), Albendazol sülfoksit (ABZSO) ve Albendazol sülfon (ABZSO₂)'nun metanolde 10 µg/mL çözeltileri hazırlandıktan sonra LC-MS/MS yöntemi aşağıda verilen basamaklar takip edilerek optimize edildi.

1. Molekülün polaritesi (pozitif mi negatif mi olduğu) ve Precursor iyon belirlendi.
2. Fregmantör Voltajı belirlendi.
3. Product iyon belirlendi.
4. Collesion enerjisi belirlendi.

ABZ için:

1. Precursor iyon: 266 pozitif
2. Fregmantör Voltajı: 110V
3. Product iyon: 234, 190.9
4. Collesion Enerjisi: 234 için; 16, 190.9 için; 34

ABZSO için:

1. Precursor iyon: 282 pozitif
2. Fregmantör Voltajı: 160V
3. Product iyon: 240, 208

4. Collision Enerjisi: 240 için; 8, 208 için; 22

ABZSO₂ için:

1. Precursor iyon: 298.1 pozitif

2. Fregmantör Voltajı: 160V

3. Product iyon: 266, 159

4. Collision Enerjisi: 266 için; 16, 159 için; 36

3.2.2.1. LC-MS/MS Yöntem Şartları

LC-MS/MS çalışmasında, ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için uygulanan kromatografik yöntem şartları Tablo 3.2’de verildi.

Tablo 3.2. LC-MS/MS yöntem şartları

Analiz Parametresi	Şartlar
Kolon	C ₁₈ ters faz
Kolon Sıcaklığı	40°C
Mobil Faz	Metanol-su-amonyum asetat
Enjeksiyon Hacmi	5 µL
Analiz Süresi	16 dk
Akış Hızı	0.5 mL/dk
İyon Kaynağı	Elektro Sprey İyonizasyon (ESI)
İyonlaştırma Gücü	Pozitif
Kapiler Voltajı	3000V
Source Sıcaklığı	300°C
Azot Gazı Sıcaklığı	300°C
Azot Gazı Akış Hızı	10 L/dk

3.2.3. ABZ’nin Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi

1000 µL kan numunesine 4000 µL metanol eklenerek 5000 rpm’de, 10°C de 30 dk santrifüj edildi. Organik faz ayrıldı daha sonra kartuştan geçirildi. 3 mL %99.9'luk metanol ile kartuş yıkandı 20 dk 5000 rpm’de santrifüjde kartuşlar kurutuldu. Kartuşların üzerine 1 mL metanol ilave edilerek çözüldü. Daha sonra vortekslenen numuneler viallere alınarak LC-MS/MS cihazına verildi.

3.2.4. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

Albendazol içeren tablet formundaki ticari farmasötik preparattan (Andazol 200 mg) 5 adet tablet alınıp tartılarak tek bir tabletin ortalama kütlesi belirlendi. Tabletler havanda ezilerek iyice toz haline getirilip karıştırılarak homojenize edildikten sonra yaklaşık 1 tablet miktarında (200 mg albendazol içeren) tartılarak alındı, metanolde eklenerek 15 dakika boyunca sonike edilerek çözüldü ve çözelti oda sıcaklığına soğutuldu. 2000 µg/mL konsantrasyonda tablet çözeltisi hazırlandı. Elde edilen çözelti süzülerek, çalışmalarda kullanılacak çözeltilerin istenilen konsantrasyonları bu çözeltilerden uygun miktarlarda alınarak spektrofotometrik çalışmalar için 0.01 M hidroklorik asit ve metanol, LC-MS/MS çalışmaları için ise sadece metanol ile seyreltilerek elde edildi.

3.2.5. Tavşan Çalışması (Numune Alımı Protokolü ve Deney Hayvanlarına Ait Özellikler)

Tavşan çalışması için 30.05.2013 tarih ve 2013/53 etik kurul izni alındı. Çalışmada kullanılan tavşanlar Atatürk Üniversitesi Tıbbi Uygulama ve Araştırma Merkezinden (ATADEM) temin edildi. Tavşanların izlemi, tavşanlara yapılan tüm girişimler bu merkezde gerçekleştirildi. Çalışmamızda ağırlıkları 3.2 – 4.0 kg arasında değişen, 3 adet New Zealand cinsi, dişi, beyaz sağlıklı tavşanlar kullanıldı. Hayvanlar, herhangi bir ilaç alımını önlemek amacıyla, çalışmaya başlamadan 10 gün önce özel kafeslere alındı. Tavşanlar standart tavşan yemi ile beslendi ve su verildi. Deney gününde ilaç uygulama saatinden 12 saat önce tavşanlar aç bırakıldı (sadece su verildi). Deney boyunca ise sadece su ve ilaç uygulamasından 3 saat sonra yemleri verildi. ABZ içeren ve Türk ilaç piyasasından temin edilen Andazol ® ticari tabletin su içerisinde süspansiyonu hazırlandı. 35 mg/kg dozda tavşana gavaj yardımı ile oral yoldan uygulandı. Ayrıca, ilaç piyasasından temin edilen Andazol süspansiyon oral

yoldan tavşanlara uygulandı. Uygulanan doz literatür verileri göz önünde tutularak saptandı²⁹. İlaç verilmeden önce ve verildikten 0.08, 0.25, 0.42, 0.5, 0.6, 0.75, 2, 4, 6, 8, 11, 14, 16, 20 ve 24 saat sonra tavşanların kulak veninden 1 mL kan örneği alındı ve EDTA'lı tüplere aktarıldı. 4000 rpm de santrifüj edildi ve plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazmala örnekleri analiz edilinceye kadar -20°C'de muhafaza edildi.

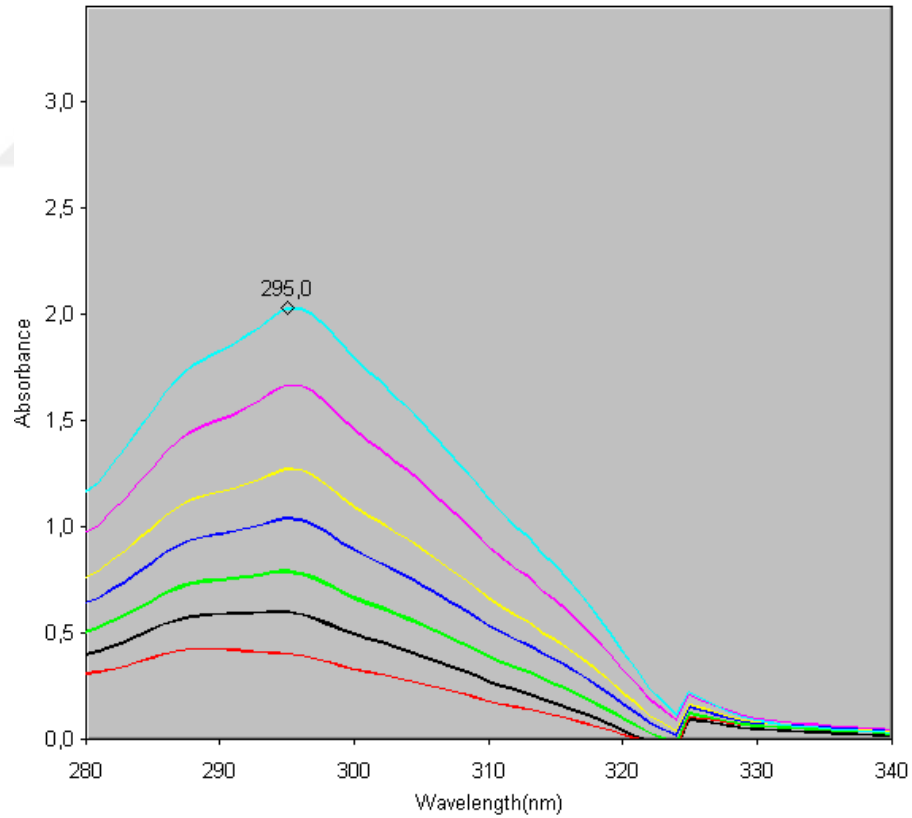


4. BULGULAR

4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi

4.1.1. Stok, Standart ve Kalite Kontrol Çözeltilerin Hazırlanması

10 mg ABZ hassas terazide tartıldıktan sonra 100 mL metanolde ultra sonik banyo üzerinde çözülerek 100 µg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden 2, 3, 4, 5.5, 6, 7 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri ve 2.5, 5 ve 7.5 µg/mL konsantrasyonlarda kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri de 280-340 nm dalga boyunda taraması yapıldı ve ABZ standart çözeltilerinin 295.0 nm dalga boyunda maksimum absorbans verdiği belirlendi. Bu dalga boyunda çözeltilerin spektrumları alındı ve Şekil 4.1 'de verildi.

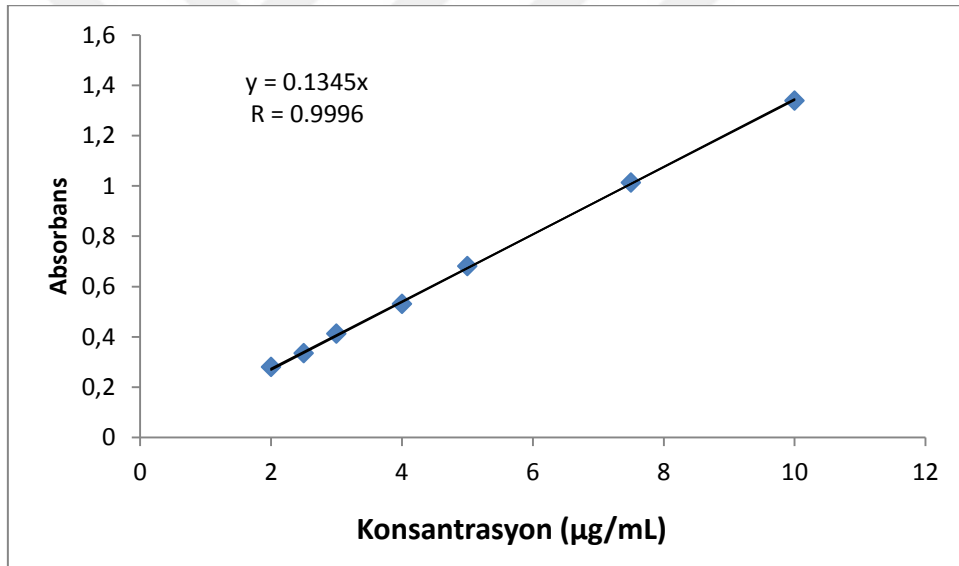


Şekil 4.1. 2, 3, 4, 5.5, 6, 7 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda albendazol standart çalışma çözeltilerinin spektrumları

4.1.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

4.1.2.1. Doğrusallık/Çalışma Aralığı ve Kalibrasyon Eğrisi

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde 2-10 µg/mL konsantrasyon aralığında metanolde hazırlanan 7 farklı konsantrasyonda (2, 3, 4, 5.5, 6, 7 ve 10 µg/mL) hazırlanan ABZ'nin standart çözeltilerinin spektrumları alındıktan sonra ABZ çözeltilerinin konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile standart kalibrasyon eğrisi türetildi ve Şekil 4.2'de verildi. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisini istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.1'de verildi.



Şekil 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde ABZ standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

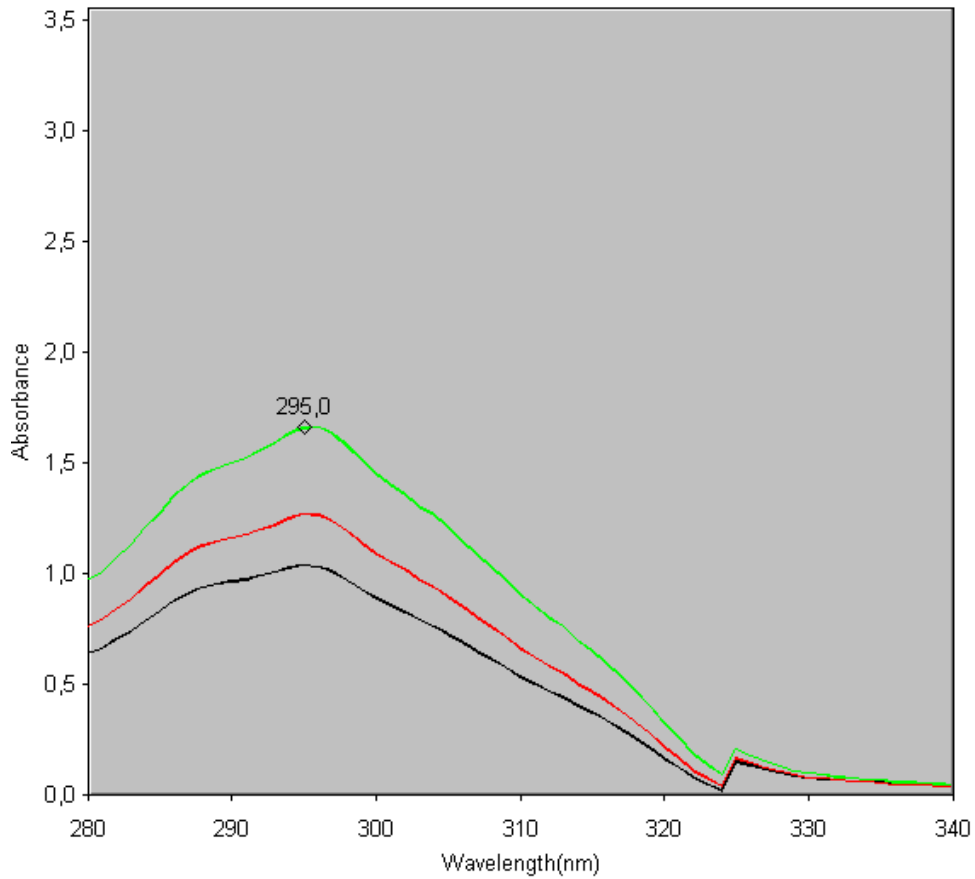
Tablo 4.1. ABZ standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

^a ÇA (µg/mL)	^a LR	Sa	Sb	R
2-10	A= 0.1345x	0.00	0.00	0.9996

ÇA: çalışma aralığı, a:6 kalibrasyon eğrisi ortalaması, LR: lineer regresyon denklemi,
Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki
eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

4.1.2.2. Doğruluk/ Kesinlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği günüçi ve günler arası değişkenlerle verildi. ABZ kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı konsantrasyonda (2.5, 5 ve 7.5 µg/mL) kalite kontrol çözeltilerinin günüçi (aynı yöntem ve aynı labaratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) miktar tayinleri yapıldı. Kalite kontrol çözeltilerinin spektrumları Şekil.4.3'te verildi. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası belirlendi. Doğruluk; bağıl hatayla [% BH = ((bulunan değer-eklenen değer)/eklenen değer)x100] ve kesinlik bağıl standart sapma ile [% BSS= (standart sapma/bulunan değer) x 100]] ile verildi (Tablo 4.2).



Şekil 4.3. ABZ kalite kontrol çözeltilerinin (2.5, 5 ve 7.5 µg/mL) UV-Görünür Bölge Spektrumları

Tablo 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

λ (nm)	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Günüçi			Günler arası		
		Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)	Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)
295	2.5	2.49 $\pm$ 0.02	6.67	0.8	2.50 $\pm$ 0.007	6.66	0.28
	5	5.12 $\pm$ 0.04	5.16	0.8	5.10 $\pm$ 0.05	4.68	0.98
	7.5	7.51 $\pm$ 0.01	5.72	0.13	7.49 $\pm$ 0.01	6.32	0.13

λ : Dalga boyu, SS: Standart sapma (n=6), BH: Bağlı hata, BSS: Bağlı standart sapma

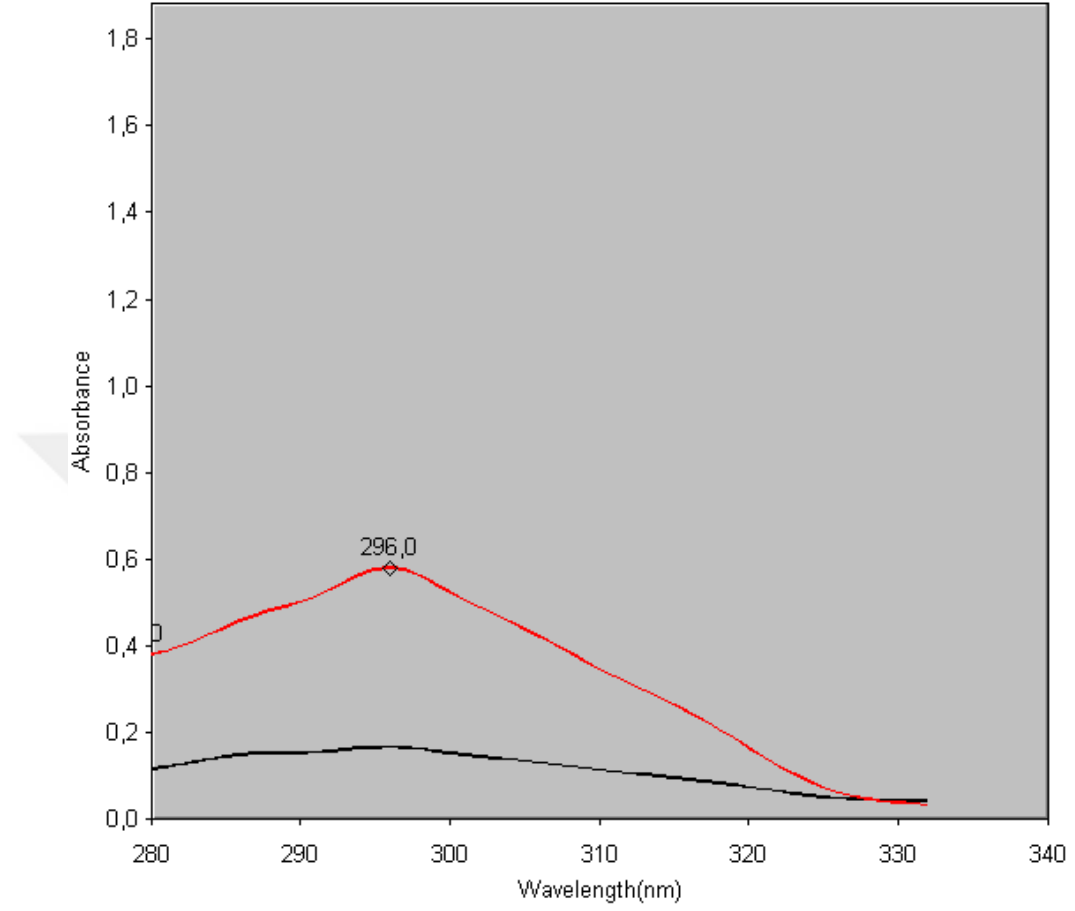
4.1.2.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Kalibrasyon eğrisinin en düşük değeri olan 2 $\mu\text{g/mL}$ 'den daha küçük konsantrasyonlarda bir seri standart çözeltiler hazırlandı ve altı kez absorbansları okundu. Okunan değerlerin ortalaması alındı ve standart sapma ile bağlı standart sapma değerleri (%BSS) belirlendi. Yüzde bağlı standart sapma değeri %20'den küçük olan konsantrasyon değeri gözlenebilme sınırı (LOD) ve %10'dan küçük olan konsantrasyon ise miktar tayin alt sınırı (LOQ) değeri olarak belirlendi. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ve 0.5 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi.

4.1.2.4. Analitik Geri Kazanım

Farmasötik preparattan yöntemin analitik geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Albendazol içeren, film tablet formundaki ticati farmasötik preparattan (Andazol 200 mg) 1.25 $\mu\text{g/mL}$ ve 2.5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda preparat çözeltileri Bölüm 3.2.4'de verildiği şekilde hazırlandı ve bu çözeltilerin UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi ile absorbansları okunarak spektrumları alındı (Şekil 4.4). Daha sonra 1.25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki tablet çözeltisine 2.5, 7.5 ve 12.5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda hazırlanan ABZ standart çözeltileri eklendi. Elde edilen bu çözeltilerin absorbansları okunarak spektrumları alındı (Şekil 4.5). Elde edilen analiz sonuçların ortalaması, standart sapması ve bağlı standart sapması belirlendi. Analitik Geri Kazanım [%GK= (toplam çözeltinin bulunan değeri-ilaç çözeltisinin bulunan değeri) / eklenen standart çözeltisinin değeri) x 100]. Çalışma sonucunda elde edilen,

standart sapma, bağıl standart sapma ve yüzde geri kazanım (%GK) değerleri Tablo 4.3’de verildi.

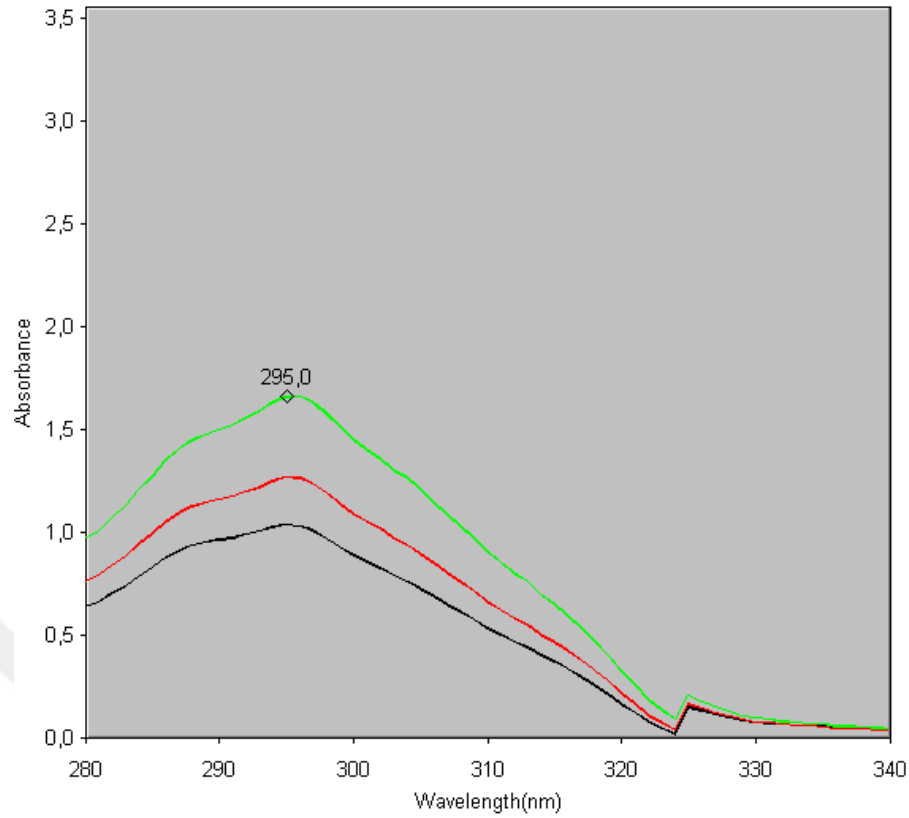


Şekil 4.4. Andazol (200 mg) ilaç çözeltilerinin spektrumu

Tablo 4.3. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin analitik geri kazanım değerleri

Farmasötik Preparat	Tablet çözeltisi (µg/mL)	Eklenen ABZ (µg/mL)	Ortalama±SS (µg/mL)	% GK	%BSS
Andazol (200 mg/tablet)	1.25	2	3.24±0.09	99.2	2.78
		5.0	6.26±0.12	100.8	1.92
		7.5	8.77±0.23	101.6	2.62

SS: Standart sapma (n=6), % BSS: Bağıl standart sapma, %GK: Geri kazanım



Şekil 4.5. İlaç çözeltisine eklenen 3 farklı konsantrasyondaki ABZ'nin standart çalışma çözeltilerinin spektrumları

4.1.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

200 mg/tablet albendazol içeren andazol tablet çözeltileri Bölüm 3.2.4'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi sınırlarında tayin edilecek şekilde çözeltiler seyreltildi ve UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemi ile miktar tayinleri yapıldı. Elde edilen absorban değerleri standart albendazol çözelti değerleri ile karşılaştırılarak %GK ve %BSS değerleri Tablo 4.4'de verildi.

Tablo 4.4. Albendazol içeren andazol tabletinin miktar tayini (n=6)

Ticari Preparat	Ölçülen (mg)	Bulunan $\pm$ SS (mg)	% Geri kazanım	%BSS	Güven Aralığı
Andazol (200 mg/tablet)	200	200.02	100.1	1.258	89.0-101.2

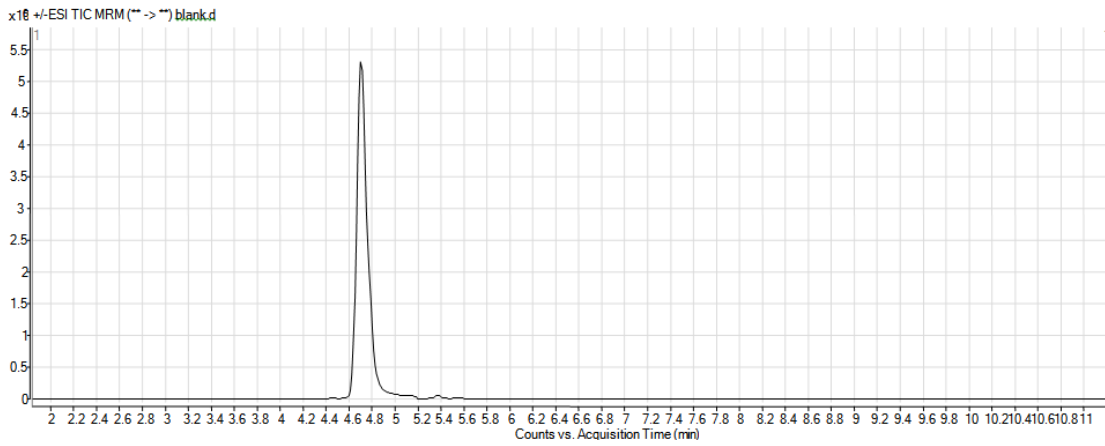
SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GK: Geri kazanım

4.2. LC-MS/MS Yöntemi

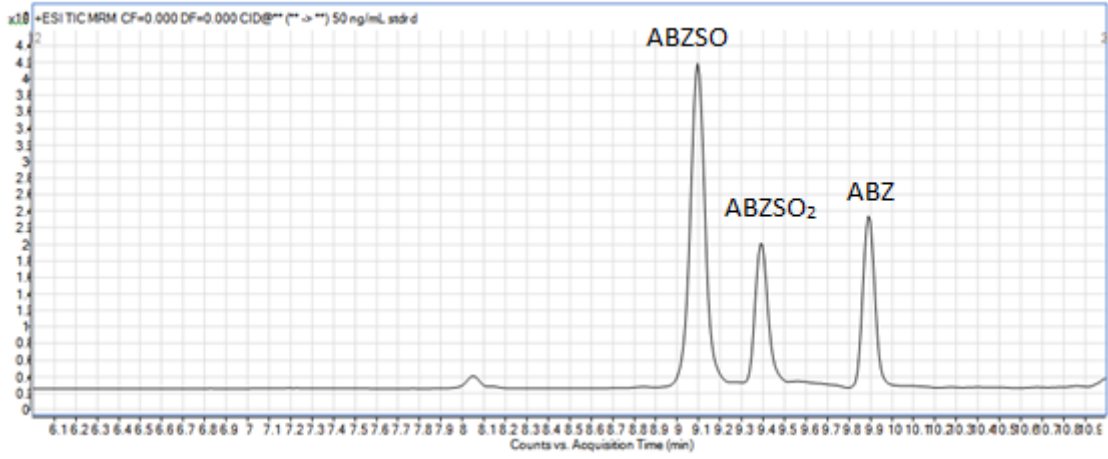
4.2.1. Farmasötik Preparatlarda ABZ ve Metabolitlerinin (ABZSO, ABZSO₂) Miktar Tayini ve Geçerlilik Testleri (Validasyon)

4.2.1.1. Özgünlük (Belirleyicilik)

Albendazol (ABZ), albendazol sülfoksit (ABZSO) ve albendazol sülfon (ABZSO₂) standart çözeltileri, metanolde çözülerek hazırlandığından dolayı LC/MS/MS yönteminin seçiciliğini göstermek amacı ile boş metanol çözücüsünün LC-MS/MS kromatogramı alındı (Şekil 4.6) ve daha sonra 50 ng/mL konsantrasyonlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ içeren standart karışım çözeltisinin kromatogramı alındı (Şekil 4.7). Kromatogramlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için belirlenen alıkonma zamanlarında çözücünden kaynaklanan herhangi bir girişimin olmadığı gözlemlendi. Alıkonma süreleri ABZ'ün 9.1 dk, ABZSO'dün 9.4 dk ve ABZSO₂'nin ki ise 9.9 dk olarak tespit edildi.



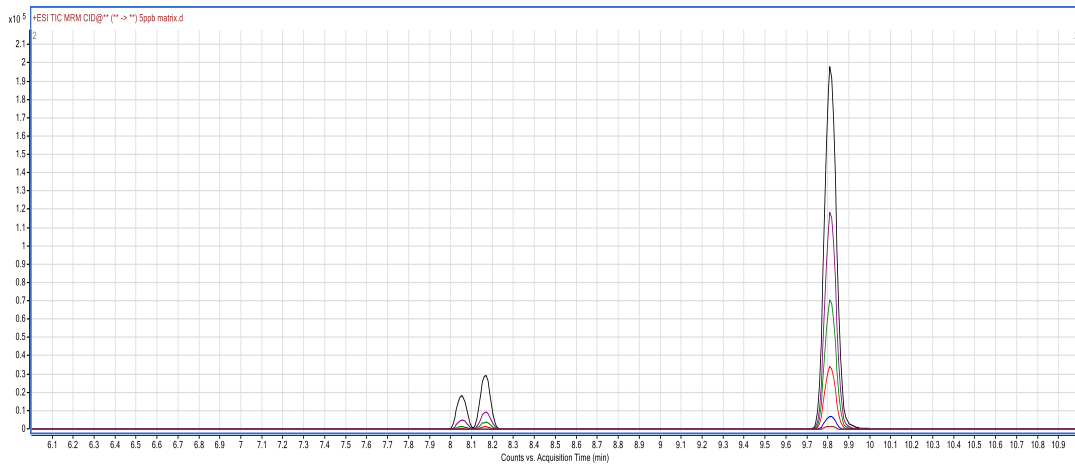
Şekil 4.6. Metanol'ün LC-MS/MS kromatogram



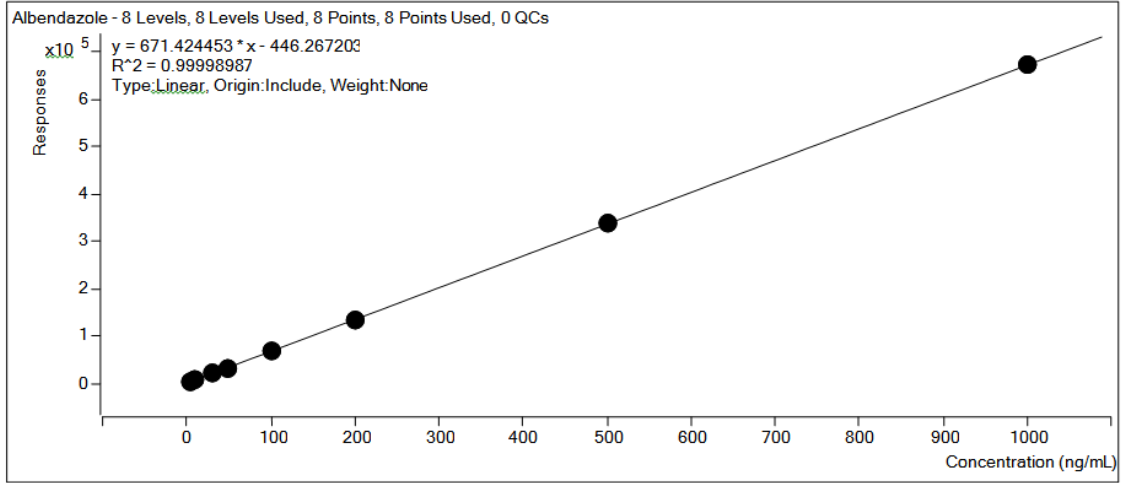
Şekil 4.7. 50 ng/mL konsantrasyonlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ içeren standart karışım çözeltisinin LC-MS/MS kromatogramı

4.2.1.2. Doğrusalık/Çalışma Aralığı

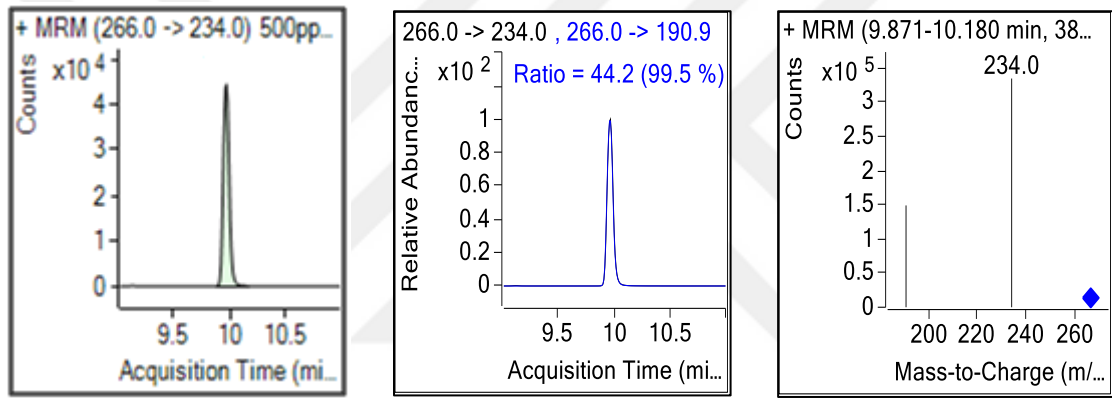
Metanolde ABZ, ABZSO, ABZSO₂'nin stok çözeltileri hazırlandı ve bu stok çözeltilerden 8 farklı konsantrasyonda (5, 10, 30, 50, 100, 200, 500 ve 1000 ng/mL) standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin LC-MS/MS spektrumları ve kromatogramları alındı (Şekil 4.8). ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ konsantrasyonlarına karşı respons grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.9, Şekil 4.11 ve Şekil 4.13). Her bir eğrinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.5'de verildi. Ayrıca Şekil 4.10, Şekil 4.12 ve Şekil 4.14'de 500 ng/mL standart ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ çözeltilerine ait MRM spektrumları verildi.



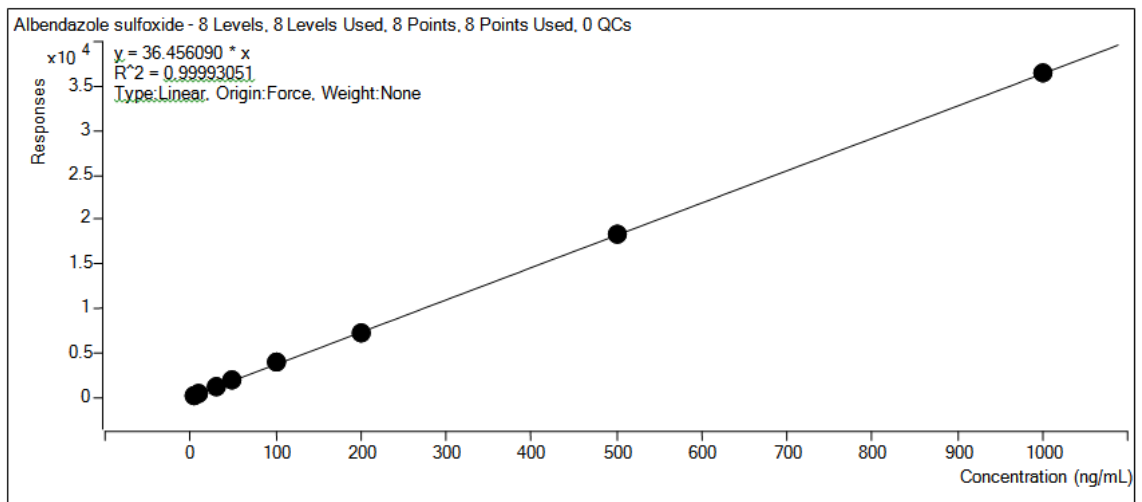
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltilerinin LC-MS/MS kromatogramı



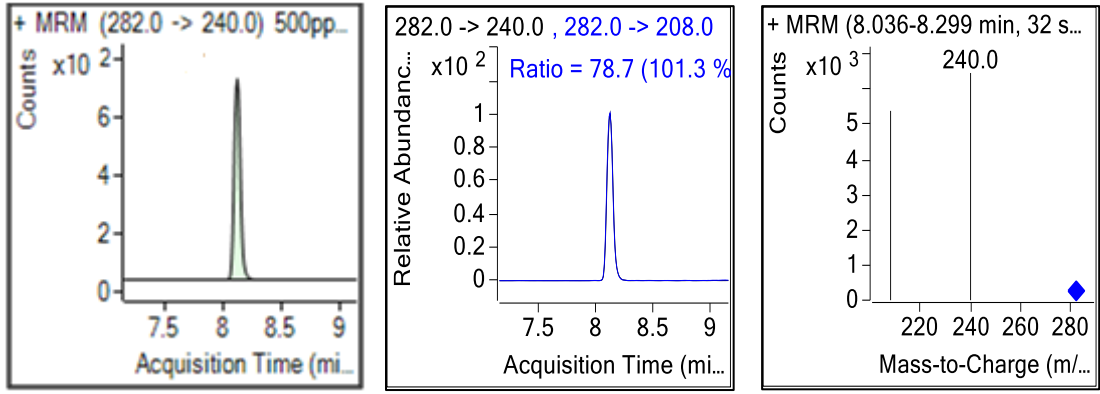
Şekil 4.9. ABZ standart çözeltisinin kalibrasyon eğrisi



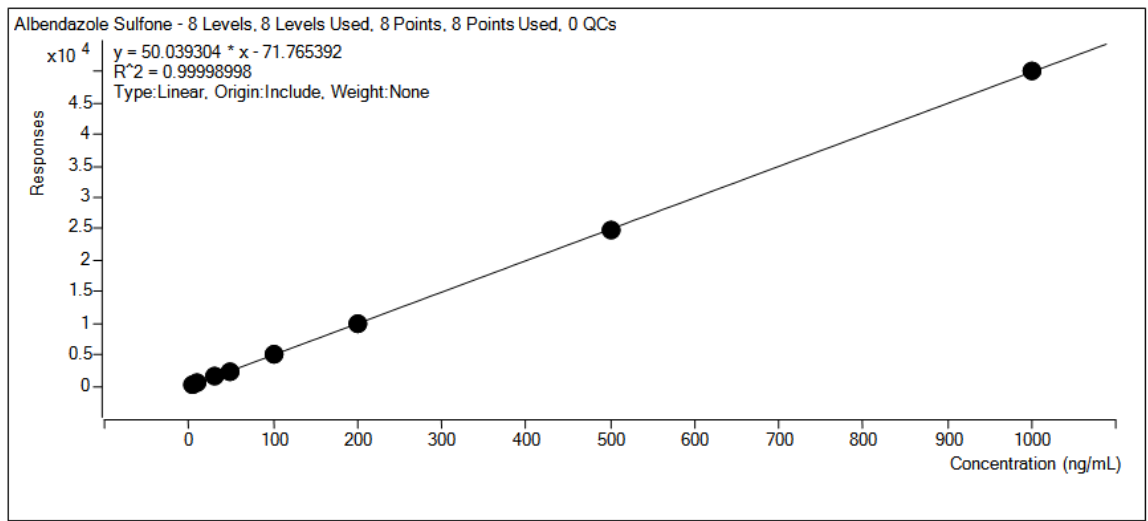
Şekil 4.10. 500 ng/mL standart ABZ çözeltisinin MRM spektrumları



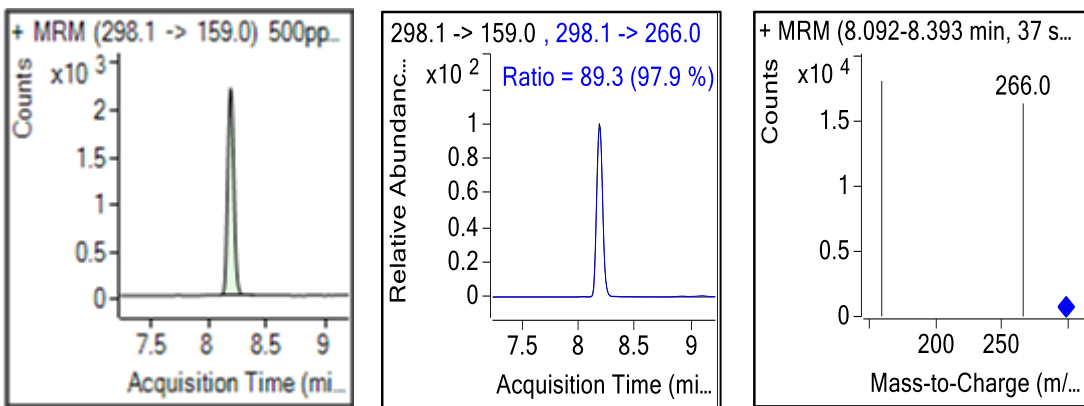
Şekil 4.11. ABZSO standart çözeltisinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.12. 500 ng/mL standart ABZSO çözeltisinin MRM spektrumları



Şekil 4.13. ABZSO₂ standart çözeltisinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.14. 500 ng/mL standart ABZSO₂ çözeltisinin MRM spektrumları

Tablo 4.5. ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

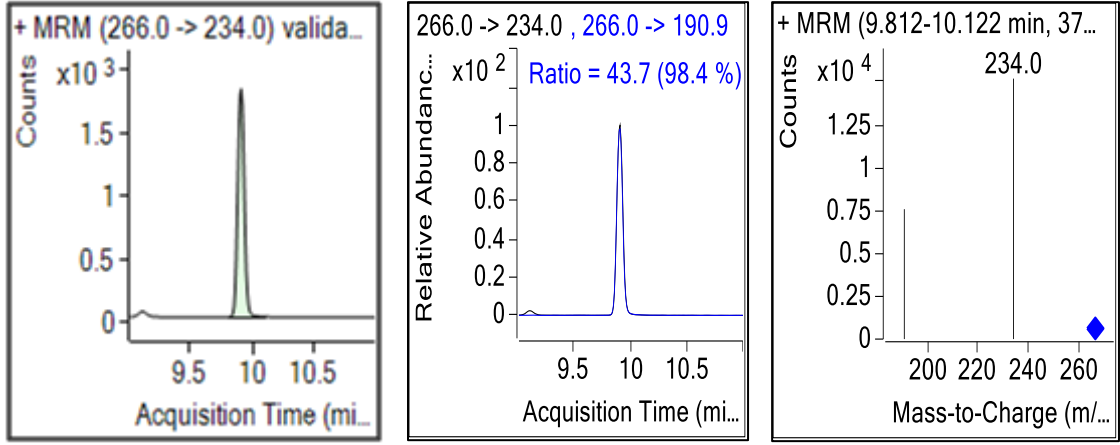
Madde türü	ÇA (ng/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R
ABZ	5-1000	$y=671.424x - 446.267$	0.540	0.355	0.9999
ABZSO	5-1000	$y = 36.456x$	0.175	0.218	0.9999
ABZSO ₂	5-1000	$y=50.039x-71.765$	0.212	0.464	0.9999

ÇA: çalışma aralığı, a:6 kalibrasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı

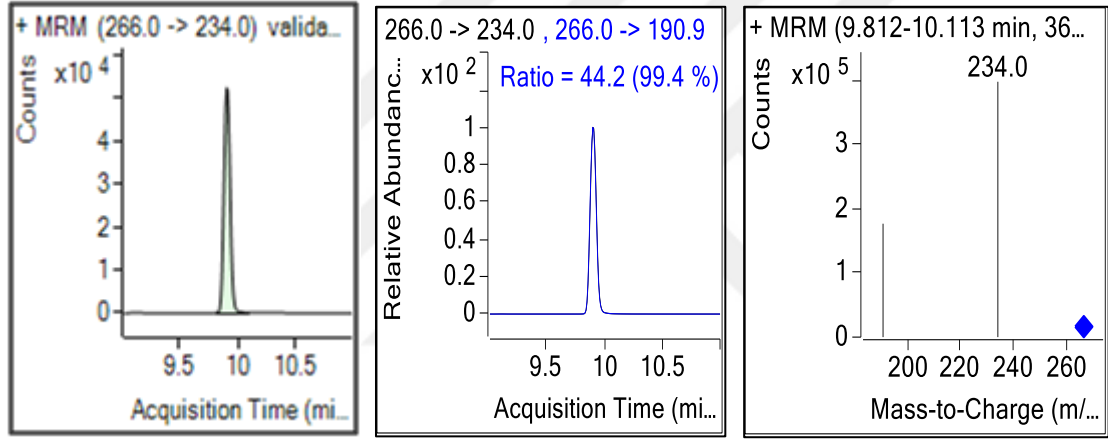
4.2.1.3. Doğruluk/ Kesinlik

ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin stok çözeltisinden kalibrasyon eğrilerinin içerisine düşen yüksek, orta ve düşük konsantrasyonlarda (7.5, 150 ve 750 ng/mL) kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler günüci (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6'şar kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) LC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası belirlendi.

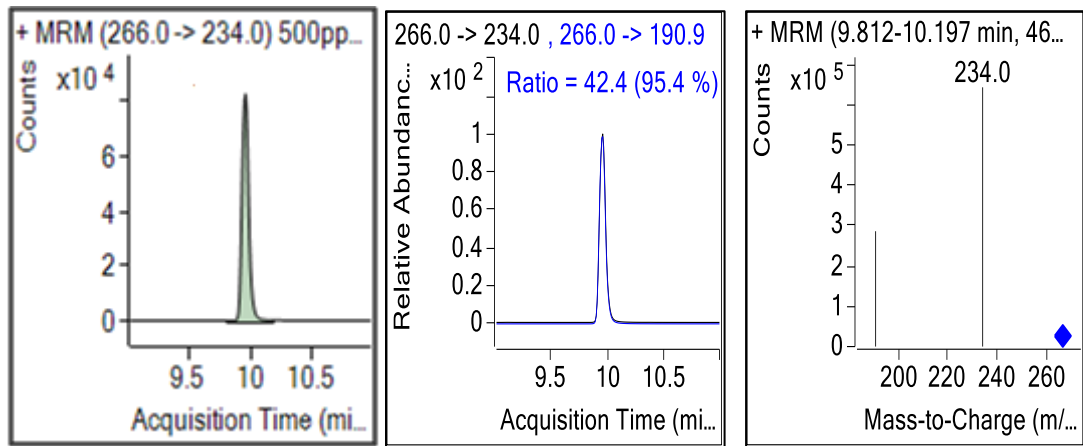
Doğruluk bağıl hatayla [%BH= ((bulunan değer-eklenen değer)/eklenen değer) x 100] ve kesinlik ise bağıl standart sapma [%BSS = (standart sapma/ortalama değer) x100] ile verildi. ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için standart çözeltilerinden LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.6, Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'de verildi. Ayrıca 7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda ki standart karışım çözeltilerinde ABZ'nin MRM spektrumları sırasıyla Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de, ABZSO'nun MRM spektrumları sırasıyla Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de ve ABZSO₂'nin MRM spektrumları sırasıyla Şekil 4.21 Şekil 4.22, Şekil 4.23'de verilmiştir.



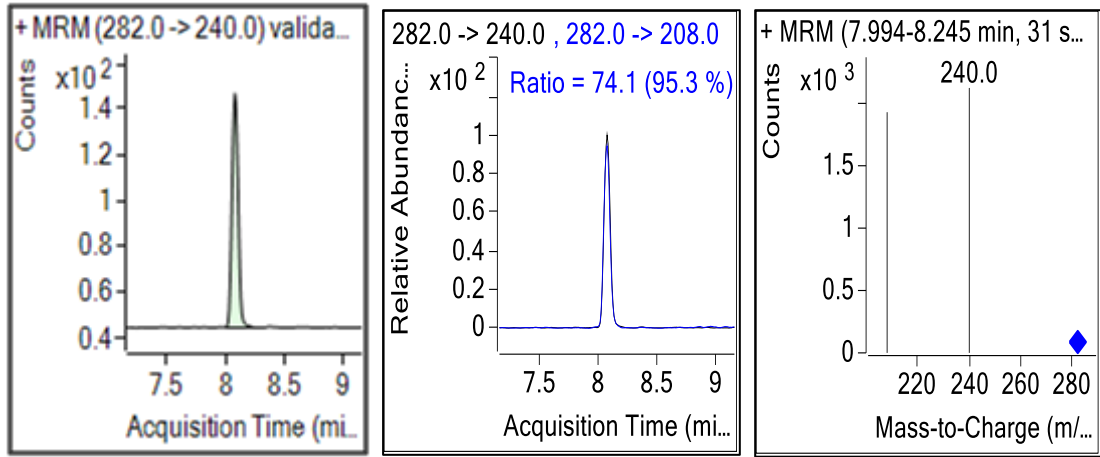
Şekil 4.15. 7.5 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZ'nin MRM spektrumları



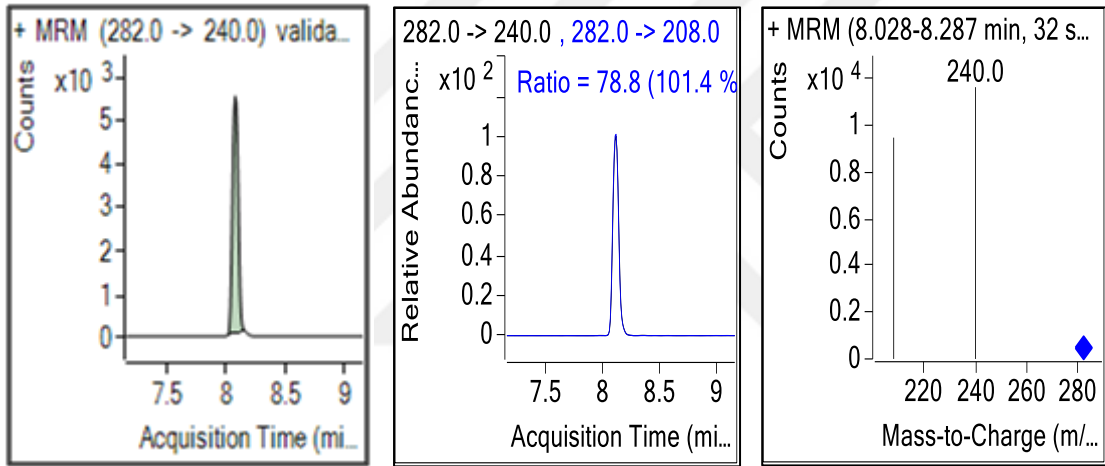
Şekil 4.16. 150 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZ'nin MRM spektrumları



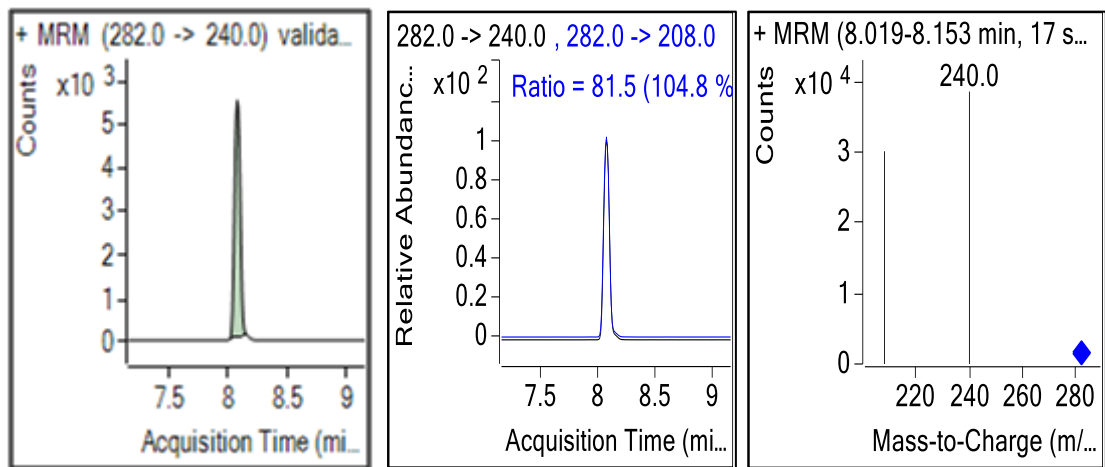
Şekil 4.17. 750 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZ'nin MRM spektrumları



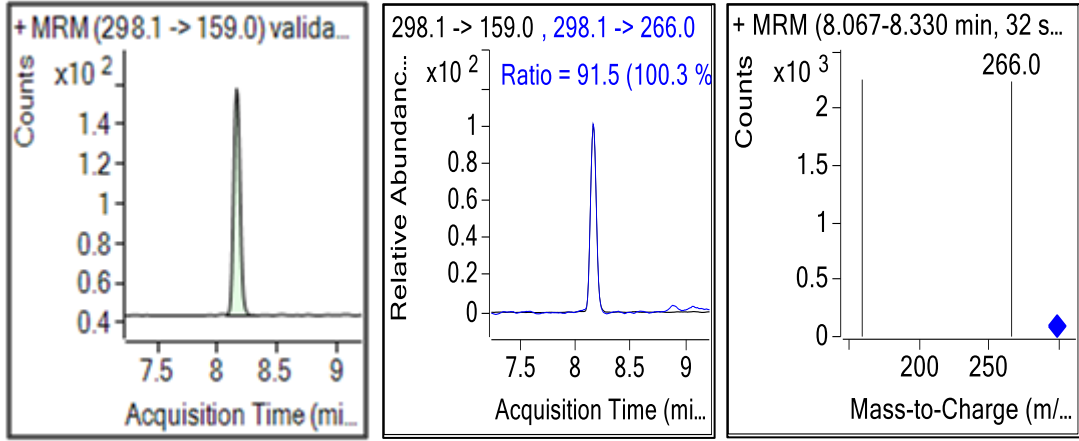
Şekil 4.18. 7.5 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZSO'nin MRM spektrumları



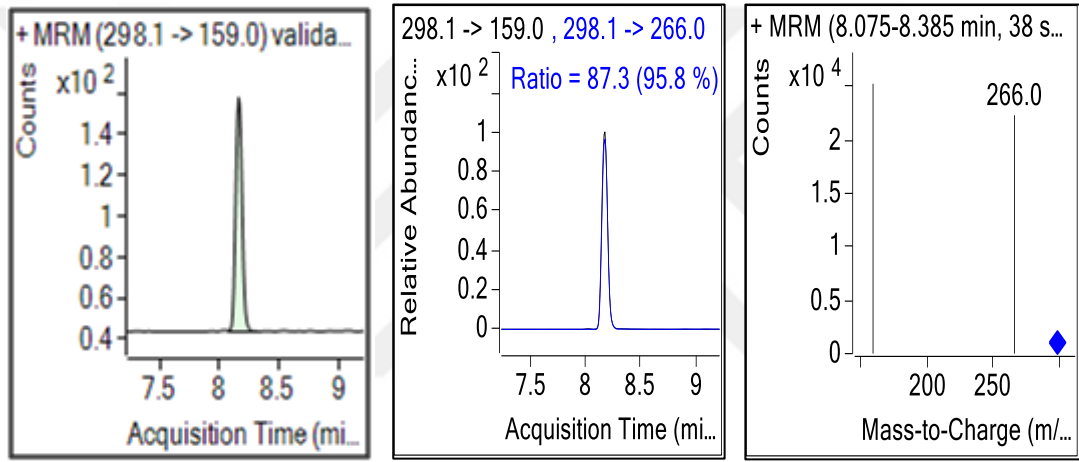
Şekil 4.19. 150 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZSO'nin MRM spektrumları



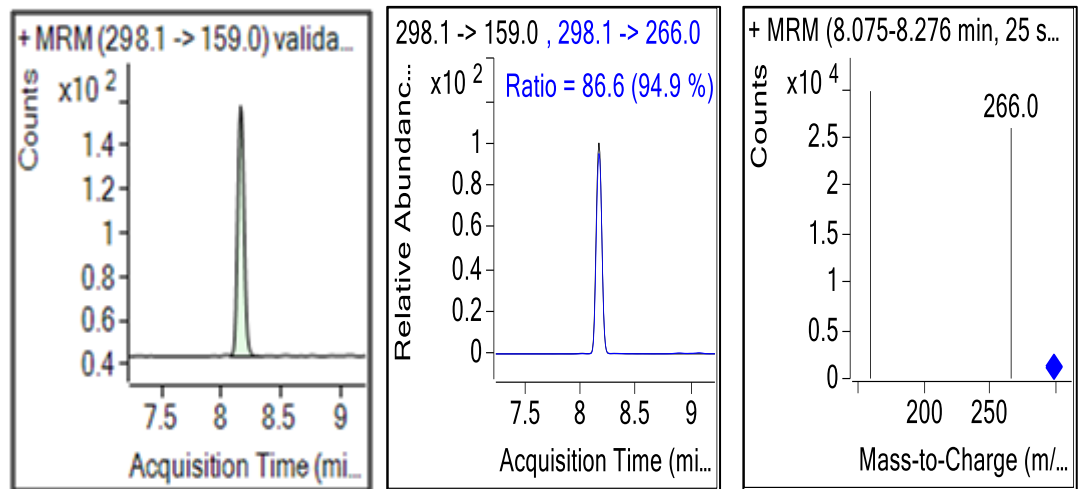
Şekil 4.20. 750 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZSO'nin MRM spektrumları



Şekil 4.21. 7.5 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZSO₂'nun MRM spektrumları



Şekil 4.22. 150 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZSO₂'nun MRM spektrumları



Şekil 4.23. 750 ng/mL konsantrasyonda karışım çözeltisinde ABZSO₂'nun MRM spektrumları

Tablo 4.6. ABZ kalite kontrol çözeltilerinin doğruluk ve kesinlik değerleri

Ortam	Eklenen (ng/mL)	Güniçi			Günler Arası		
		Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)	Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)
Standart	7.5	7.51 ± 0.02	2.22	0.27	7.51 ± 0.01	4.44	0.13
	150	150.33±0.80	3.56	0.53	150.09 ± 0.12	5.88	0.08
	750	750.58 ±0.63	7.46	0.08	750.39 ± 0.51	5.22	0.07

SS: Standart sapma (n=6), BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

Tablo 4.7. ABZSO kalite kontrol çözeltilerinin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Ortam	Eklenen (ng/mL)	Güniçi			Günler Arası		
		Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)	Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)
Standart	7.5	7.51 ± 0.02	4.44	0.30	7.50 ± 0.01	4.44	0.14
	150	150.45±0.47	1.22	0.31	150.04 ± 0.26	2.33	0.17
	750	750.62 ±0.72	3.87	0.10	750.25 ± 0.48	3.36	0.06

SS: Standart sapma (n=6), BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

Tablo 4.8. ABZSO₂ kalite kontrol çözeltilerinin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Ortam	Eklenen (ng/mL)	Güniçi	Güniçi		Günler Arası		
		Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)	Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)
Standart	7.5	7.5 ± 0.02	6.67	0.27	7.5 ± 0.011	5.33	0.15
	150	150.45±0.47	7.78	0.31	150.1 ± 0.21	6.67	0.14
	750	750.62 ±0.68	6.01	0.09	750.4 ± 0.42	5.07	0.06

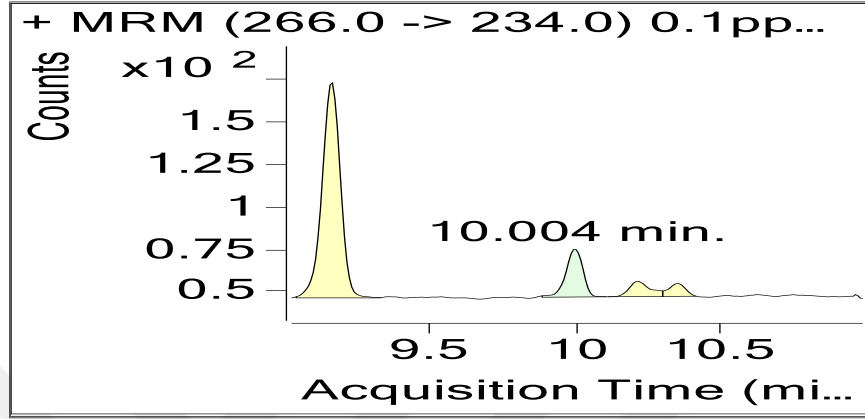
SS: Standart sapma (n=6), BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

4.2.1.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

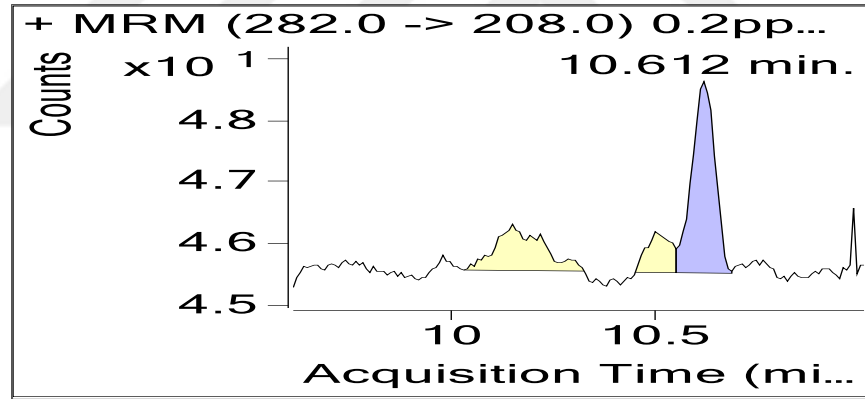
ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin standart çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük konsantrasyondan daha küçük konsantrasyonlara (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8 ve 1 ng/mL) inilerek bir seri standart çözeltiler hazırlandı ve LC-MS/MS cihazında okutuldu. Kromatogramlarda sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon gözlenebilme sınırı (LOD) ve 10 olduğu konsantrasyon ise miktar tayin alt sınırı (LOQ) değerleri olarak belirlendi.

LC-MS/MS yönteminin ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ maddelerinin standart

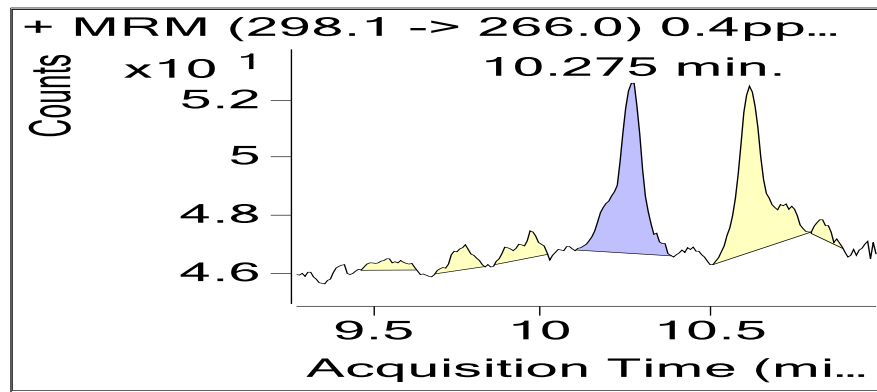
çözeltilerinde gözlenebilme sınırı (LOD) değerleri sırasıyla 0.1 ng/mL, 0.2 ng/mL ve 0.4 ng/mL, miktar tayin alt sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 0.3 ng/mL, 0.6 ng/mL ve 1.2 ng/mL olarak tespit edildi. Her birinin LC-MS/MS kromatogramları Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da verildi.



Şekil 4.24. 0.1 ng/mL konsantrasyondaki ABZ çözeltisinin kromatografisi



Şekil 4.25. 0.2 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO çözeltisinin kromatografisi



Şekil 4.26. 0.4 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO₂ çözeltisinin kromatografisi

4.2.1.5. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan analitik geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Albendazol içeren, film tablet formundaki ticari farmasötik preparat (Andazol 200mg) Bölüm 3.2.4’de verildiği şekilde 1 mg/mL’lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiden metanol ile seyreltilerek 1.0 ng/mL konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı ve LC-MS/MS cihazında okutuldu. Sonra bu çözelti üzerine ABZ’nin 3 farklı konsantrasyonda (7.5, 150 ve 750 ng/mL) hazırlanan kalite kontrol çözeltileri eklendi ve LC-MS/MS cihazında okutuldu. Elde edilen analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası belirlendi. Analitik Geri Kazanım [% GK= (toplam çözeltinin bulunan değeri-ilaç çözeltisinin bulunan değeri) / eklenen standart çözeltisinin değeri) x 100]. Çalışma sonucunda elde edilen, standart sapma, bağıl standart sapma ve yüzde geri kazanım (%GK) değerleri Tablo 4.9’da verildi.

Tablo 4.9. Farmasötik preparatlarda standart ekleme yöntemine göre analitik geri kazanım değerleri

Farmasötik Preparat	Tablet çözeltisi (ng/mL)	Eklenen ABZ (ng/mL)	Ortalama±SS (ng/mL)	% GK	%BSS
Andazol (200 mg/tablet)	1.0	7.5	8.51±0.02	101.0	0.24
		150	150.98±0.72	98.0	0.48
		750	751.01±0.83	101.0	0.11

SS: standart sapma (n=6), BSS: bağıl standart sapma, GK: Geri Kazanım

4.2.1.6. ABZ, ABZSO₂ ve ABZSO’nun Standart Çözeltilerinin Stabilitesi

7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ABZ, ABZSO ve ABZSO₂’nin standart çözeltilerinin analiz boyunca hangi ortamlarda ne kadar süre ile bozunmadan stabil kaldığını belirlemek amacı ile yapıldı. Bu amaçla hazırlanan standart çözeltiler oda sıcaklığında 6, 24, 48 ve 60 saat, +4 °C (buzdolabı) ve -20°C’ de (derin dondurucu) 24, 48 ve 60 saat bekletildikten sonra LC-MS/MS’de analizleri yapıldı. Bulunan değerler, 7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlardaki yeni hazırlanıp LC-MS/MS cihazında analiz edilen değerler ile kıyaslanarak sonuçlar %Geri Kazanım

olarak Tablo 4.10, 4.11 ve 4.12’de verildi.

Tablo 4.10. ABZ’nin Standart Çözeltilerinin Stabilitesi

Stabilite	Eklenen (ng/mL)	6 Saat (%GK±SS)	24 Saat (%GK±SS)	48 Saat (%GK±SS)	60 Saat (%GK±SS)
(Oda Sıcaklığı)	7.5	99.49 ± 0.21	99.27 ± 0.26	99.71 ± 0.06	99.62 ± 0.17
(%GK±SS)	150	99.35 ± 0.98	98.77 ± 0.28	98.87 ± 0.38	99.68 ± 0.09
	750	99.60 ± 0.05	99.64 ± 0.09	99.65 ± 0.16	99.67 ± 0.09
(+4 °C)	7.5	-	99.93 ± 0.16	99.89 ± 0.21	99.71 ± 0.10
(%GK±SS)	150	-	99.05 ± 0.51	99.07 ± 0.39	99.11 ± 0.62
	750	-	99.78 ± 0.04	99.75 ± 0.11	99.86 ± 0.08
(-20 °C)	7.5	-	99.87 ± 0.15	99.87 ± 0.01	99.97 ± 0.01
(%GK±SS)	150	-	99.55 ± 0.27	99.74 ± 0.16	99.63 ± 0.20
	750	-	99.87 ± 0.06	99.93 ± 0.04	99.95 ± 0.04

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): analiz yapılmadı

Tablo 4.11. ABZSO’in Standart Çözeltilerinin Stabilitesi

Stabilite	Eklenen (ng/mL)	6 Saat (%GK±SS)	24 Saat (%GK±SS)	48 Saat (%GK±SS)	60 Saat (%GK±SS)
(Oda Sıcaklığı)	7.5	98.99 ± 1.21	99.26 ± 0.27	99.81 ± 0.05	99.82 ± 0.10
(%GK±SS)	150	99.45 ± 0.71	98.97 ± 0.31	98.95 ± 0.22	99.38 ± 0.25
	750	99.58 ± 0.29	99.51 ± 0.15	99.85 ± 0.14	99.51 ± 0.28
(+4 °C)	7.5	-	99.86 ± 0.19	99.87 ± 0.16	99.86 ± 0.16
(%GK±SS)	150	-	99.35 ± 0.52	99.71 ± 0.11	99.37 ± 0.62
	750	-	98.63 ± 0.14	99.48 ± 0.39	99.86 ± 0.08
(-20 °C)	7.5	-	98.89 ± 0.14	99.27 ± 0.27	99.67 ± 0.08
(%GK±SS)	150	-	99.75 ± 0.07	99.84 ± 0.06	99.59 ± 0.29
	750	-	99.57 ± 0.28	99.98 ± 0.01	99.96 ± 0.02

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): analiz yapılmadı

Tablo 4.12. ABZSO₂’nin Standart Çözeltilerinin Stabilitesi

Stabilite	Eklenen (ng/mL)	6 Saat (%GK±SS)	24 Saat (%GK±SS)	48 Saat (%GK±SS)	60 Saat (%GK±SS)
(Oda Sıcaklığı)	7.5	99.68 ± 0.06	99.23± 0.24	99.65± 0.05	99.62 ± 0.08
(%GK±SS)	150	99.51 ± 0.28	98.85 ± 0.18	98.89 ± 0.17	99.78 ± 0.04
	750	99.38± 0.57	99.58 ± 0.23	99.65 ± 0.05	99.84 ± 0.03
(+4 °C)	7.5	-	99.95 ± 0.03	99.54 ± 0.29	99.75 ± 0.07
(%GK±SS)	150	-	99.14 ± 0.51	99.86 ± 0.19	99.10 ± 0.61
	750	-	99.69 ± 0.06	99.41± 0.56	99.53 ± 0.31
(-20 °C)	7.5	-	99.39 ± 0.58	99.77 ± 0.07	99.85 ± 0.20
(%GK±SS)	150	-	99.45 ± 0.46	99.31± 0.49	99.21 ± 0.61
	750	-	99.75 ± 0.07	99.89 ± 0.03	99.48± 0.58

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): analiz yapılmadı

4.2.1.7. LC-MS/MS Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

200 mg/tablet albendazol içeren andazol tablet çözeltileri Bölüm 3.2.4’de belirtildiği şekilde hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi sınırlarında tayin edilecek şekilde

çözeltiler seyreltilerek LC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen değerler standart albendazol çözelti değerleri ile karşılaştırılarak %GK ve %BSS değerleri Tablo 4.13’de verildi.

Tablo 4.13. LC-MS/MS yöntemiyle albendazol içeren andazol tabletinin miktar tayini

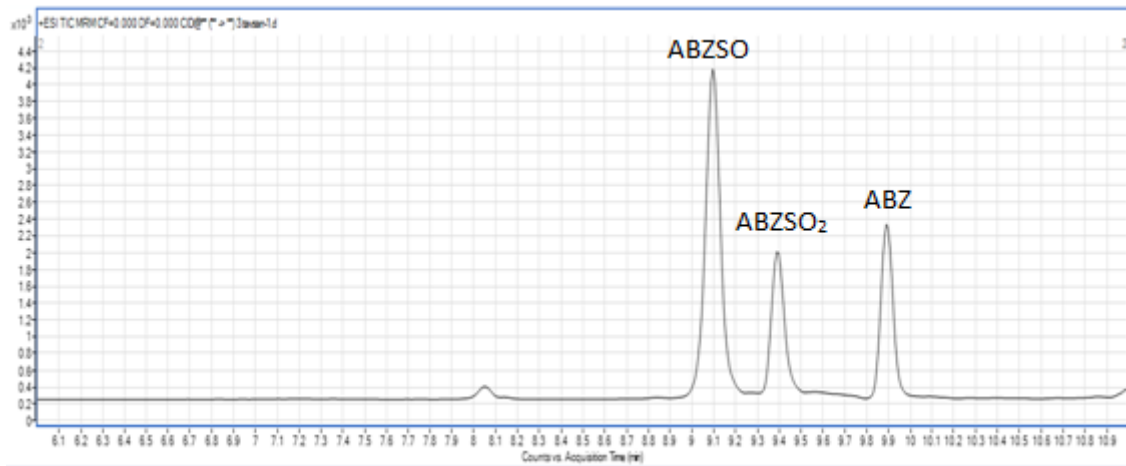
Ticari Preparat	Ölçülen (mg)	Bulunan $\pm$ SS (mg)	%Geri kazanım	%BSS	Güven Aralığı
Andazol (200 mg/tablet)	200	199.98 $\pm$ 3.40	99.99	1.70	90.0-102.4

n=6, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GK: Geri kazanım

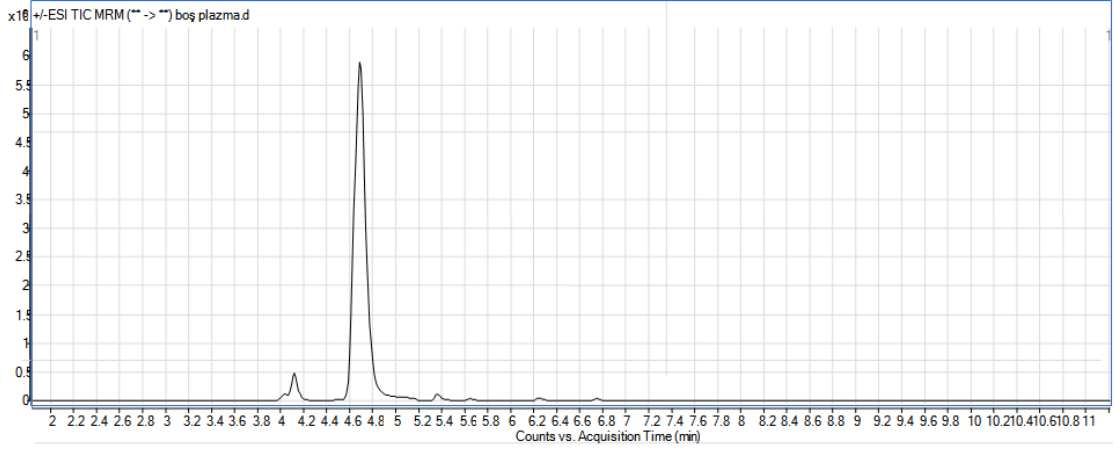
4.2.2. ABZ ve Metabolitlerinin (ABZSO, ABZSO₂) İnsan Plazmasında Miktar Tayini ve Geçerlilik Testleri (Validasyon)

4.2.2.1. Plazma Çözeltileri için Özgünlük (Belirleyicilik)

Cihazın çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu kullanılarak ekstraksiyon öncesi kör kan numunesine katım yapılan ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ içeren ve bu maddeleri içermeyen kör kan örneği (sinyal, gürültü düzeyindedir) analiz edildi. Analiz sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 4.27 ve Şekil 4.28’de verildi. Kromatogramlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için belirlenen alıkonma zamanlarında matriksten ve ekstraksiyon işleminden kaynaklanan herhangi bir girişim olmadığı gözlemlendi.



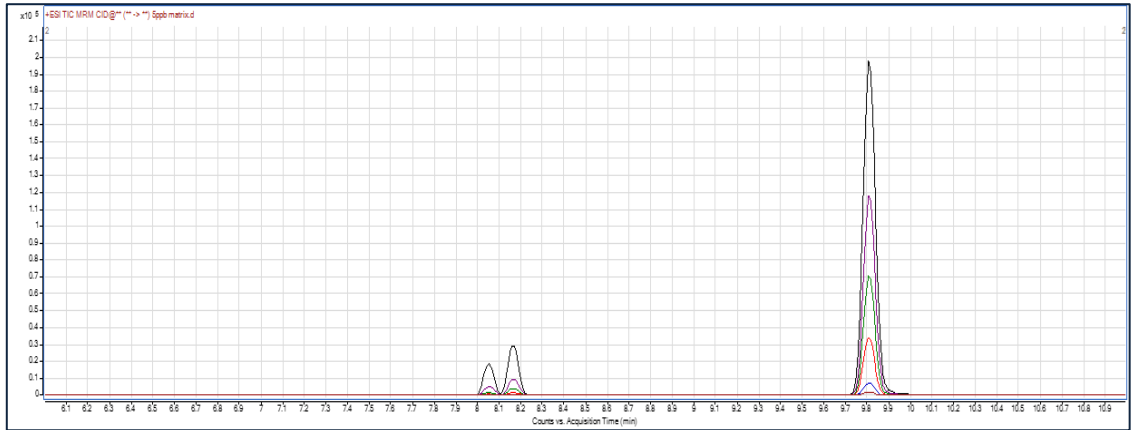
Şekil 4.27. 50 ng/mL konsantrasyonlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ karışımını içeren plazma çözeltisinin LC-MS/MS kromatogramı



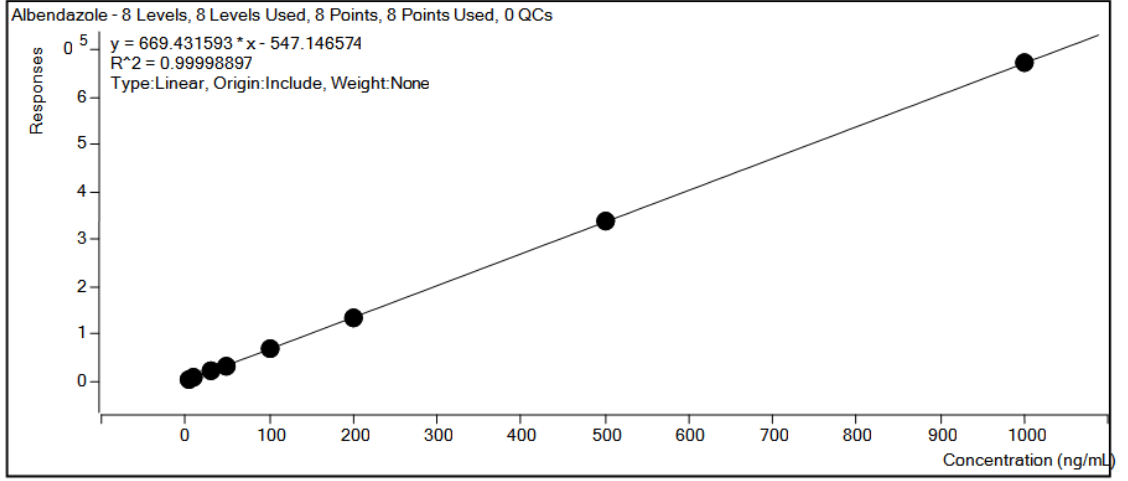
Şekil 4.28. Boş insan plazmasının LC-MS/MS kromatogramı

4.2.2.2. Doğrusalık/ Çalışma Aralığı

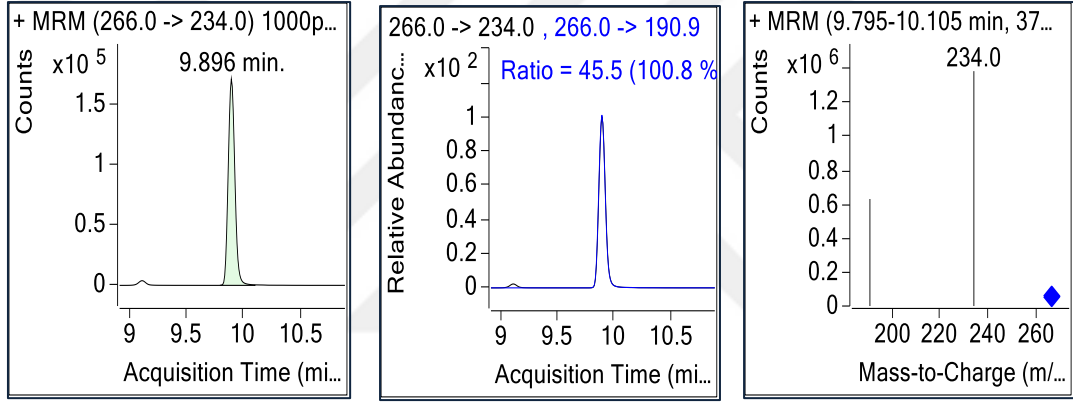
Belli konsantrasyonlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ çözeltileri boş insan plazmasına spike edilip karıştırıldıktan sonra Bölüm 3.2.3’de verildiği şekilde ekstrakte edildi ve edilen 8 farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 30, 50, 100, 200, 500 ve 1000 ng/mL) ABZ, ABZSO ve ABZSO₂’nin plazma çalışma çözeltileri elde edildi. LC-MS/MS spektrumları ve kromatogramları alındı (Şekil 4.29). ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ konsantrasyonlarına karşı respons grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.30, Şekil 4.32 ve Şekil 4.34). Ayrıca Şekil 4.31, Şekil 4.33 ve Şekil 4.35’de 1000 ng/mL plazma ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ çözeltilerine ait MRM spektrumları verildi. Her bir eğrinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.14’de verildi.



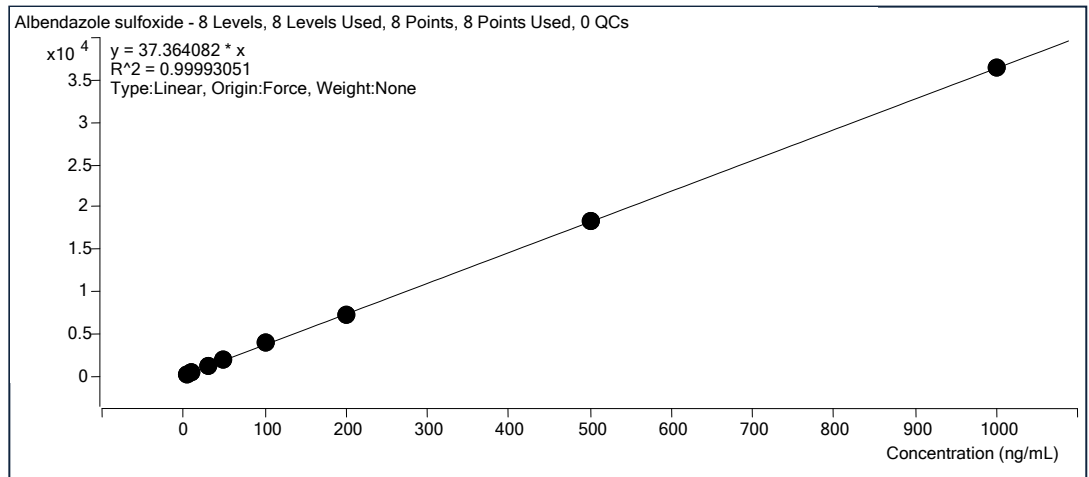
Şekil 4.29. Farklı konsantrasyonlarda insan plazma çözeltilerinin LC-MS/MS pikleri



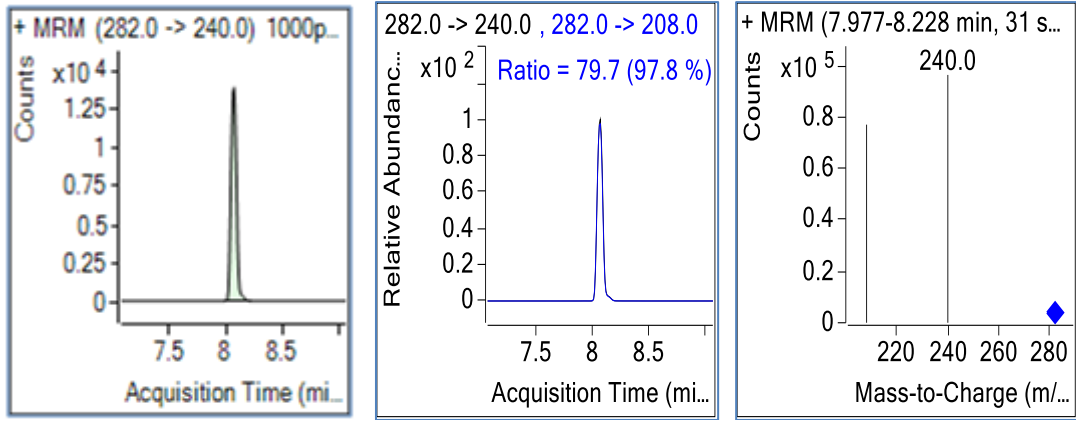
Şekil 4.30. ABZ'nin insan plazması çözeltisi kalibrasyon eğrisi



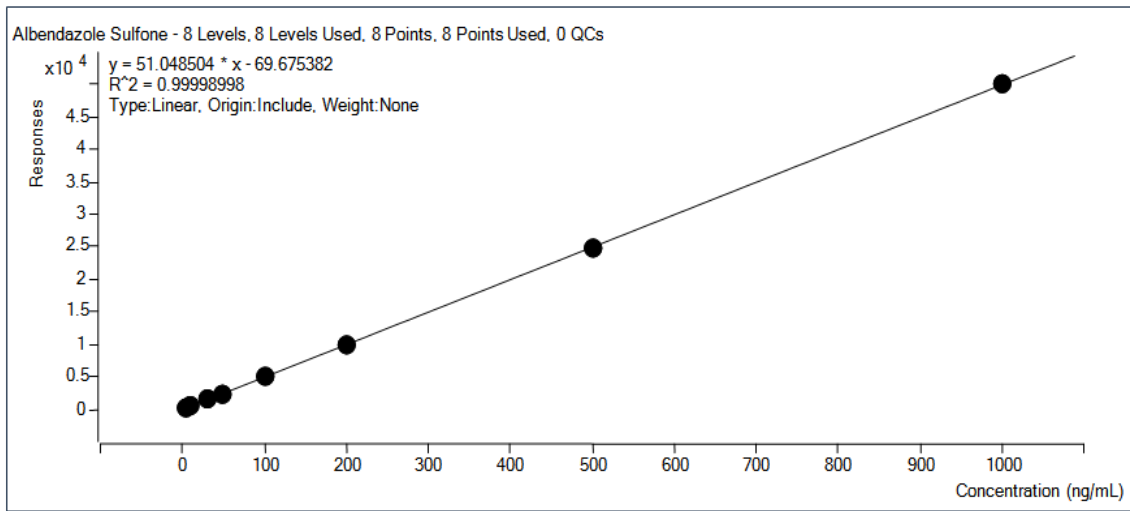
Şekil 4.31. 1000 ng/mL insan plazması çözeltisinde ABZ'nin MRM spektrumları



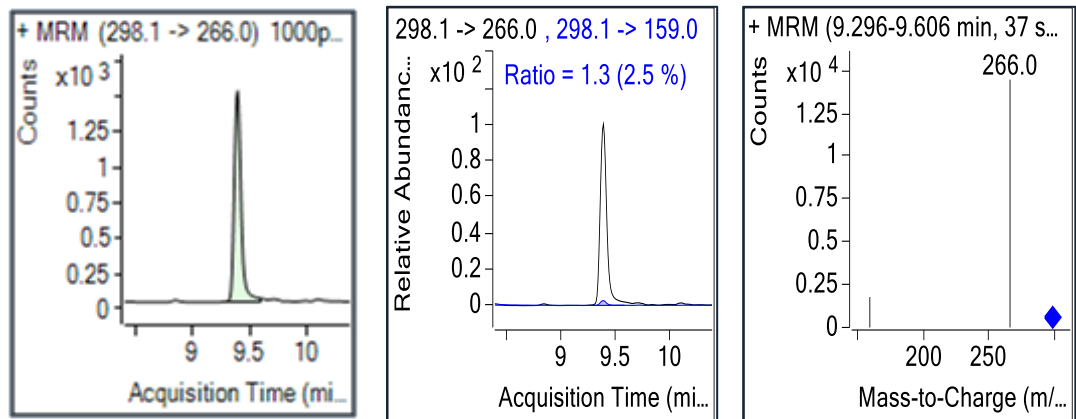
Şekil 4.32. ABZSO'nun insan plazma çözeltisi kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.33. 1000 ng/mL insan plazması çözeltisinde ABZSO'nun MRM spektrumları



Şekil 4.34. ABZSO₂'nin insan plazma çözeltisi kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.35. 1000 ng/mL insan plazması çözeltisinde ABZSO₂'nin MRM spektrumları

Tablo 4.14. ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

Çözelti Türü		ÇA (ng/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R
Plazma	ABZ	5-1000	Y=669.432x-547.15	0.530	0.800	0.999
Plazma	ABZSO	5-1000	Y=37.364x	0.481	0.762	0.999
Plazma	ABZSO ₂	5-1000	Y=51.049x-69.675	0.600	0.978	0.999

ÇA: çalışma aralığı, a:6 kalibrasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması,R: korelasyon katsayısı

4.2.2.3. Doğruluk/ Kesinlik

İnsan plazmasına spike edilip ve plazmadan Bölüm 3.2.3’de verilen ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen yüksek, orta ve düşük konsantrasyonları temsil eden 7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO₂’den oluşan karışım plazma çözeltileri hazırlandı. LC-MS/MS cihazında analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hataları belirlendi. Doğruluk; bağıl hatayla [(bulunan değer-eklenendeğer/eklenen değer) x100] ve kesinlik; bağıl standart sapma [%BSS= (standart sapma/ortalama değer) x100]] ile verildi. ABZ, ABZSO₂ ve ABZSO için standart çözeltilerinden LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.15, 4.16 ve 4.17’de verildi.

Tablo 4.15. ABZ plazma çözeltilerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Ortam	Eklenen (ng/mL)	Günüçi			Günler Arası		
		Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)	Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)
Plazma	7.5	7.48 ± 0.06	3.29	0.80	7.48 ± 0.06	3.37	0.80
	150	151.29 ± 0.97	5.33	0.64	149.60 ± 0.90	-3.50	0.60
	750	750.15 ± 0.99	4.59	0.13	749.83 ± 0.92	4.59	0.12

SS: Standart sapma, BH: Bağıl Hata,% BSS: Bağıl standart sapma

Tablo 4.16. ABZSO plazma çözeltilerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Ortam	Eklenen (ng/mL)	Günüçi			Günler Arası		
		Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)	Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)
Plazma	7.5	7.49 ± 0.05	3.30	0.67	7.49 ± 0.06	3.40	0.80
	150	152.11 ± 0.97	5.28	0.64	149.58 ± 0.92	3.48	0.62
	750	751.02 ± 0.98	4.52	0.13	749.88 ± 0.94	4.57	0.13

SS: Standart sapma, BH: Bağıl Hata,% BSS: Bağıl standart sapma

Tablo 4.17. ABZSO₂ plazma çözeltilerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Ortam	Eklenen (ng/mL)	Günüçi			Günler Arası		
		Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)	Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)
Plazma	7.5	7.47 ± 0.08	3.68	1.07	7.49 ± 0.04	3.45	0.53
	150	150.89 ± 0.98	5.46	0.65	149.80 ± 0.93	3.60	0.62
	750	750.35 ± 0.98	4.61	0.13	750.21 ± 0.95	4.61	0.13

SS: Standart sapma, BH: Bağıl Hata,% BSS: Bağıl standart sapma

4.2.2.4. LOD ve LOQ

ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin standart ve plazma çözeltileri (insan ve tavşan) ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük konsantrasyon değerinden daha küçük konsantrasyon değerlerine (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8 ve 1 ng/mL) inilerek bir seri standart çözeltileri hazırlandı ve LC-MS/MS cihazında okutuldu. Kromatogramlarda sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon LOD ve 10 olduğu konsantrasyon ise LOQ değerleri olarak belirlendi.

LC-MS/MS yöntemine göre ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin hem standart ve hem de plazma çözeltilerinde LOD değerleri sırasıyla 0.1 ng/mL, 0. 2 ng/mL, 0.4 ng/mL LOQ değerleri sırasıyla 0.3 ng/mL, 0.6 ng/mL ve 1.2 ng/mL olarak tespit edildi.

4.2.2.5. Geri Kazanım

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, ABZ, ABZSO₂ ve ABZSO'nun

kalibrasyon standart çözeltileri plazmaya eklendi, vortekslendi ve sırasıyla Bölüm 3.2.3’de verilen ekstraksiyon işlemi ile ekstrakte edildi. Elde edilen ekstratların LC-MS/MS cihazında analizleri yapıldı. Aynı zamanda standart çözeltilerin de LC-MS/MS cihazında analizleri yapıldı. Plazma çözeltilerinin konsantrasyonları standart çözeltilerden elde edilen konsantrasyonlar ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.18, 4.19, 4.20’de verildi.

Tablo 4.18. İnsan plazmasına katım yapılan ABZ çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri

Eklenen (ng/mL)	Geri Kazanım±SS	% BSS
5	98.79±3.06	3.09
10	99.67±1.08	1.08
30	98.71±1.48	1.50
50	99.76±1.03	1.03
100	98.82±0.78	0.79
200	99.95±0.79	0.79
500	99.01±0.73	0.74
1000	99.80±0.79	0.79

Tablo 4.19. İnsan plazmasına katım yapılan ABZSO çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri

Eklenen (ng/mL)	Geri Kazanım±SS	% BSS
5	98.20±3.07	3.13
10	99.88±1.08	1.08
30	99.55±1.51	1.52
50	98.78±0.87	0.88
100	99.87±0.83	0.83
200	99.78±0.87	0.87
500	98.94±0.93	0.93
1000	99.96±0.72	0.72

Tablo 4.20. İnsan plazmasına katım yapılan ABZSO₂ çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri

Eklenen (ng/mL)	Geri Kazanım±SS	% BSS
5	98.94±2.74	2.76
10	99.77±1.16	1.16
30	99.88±1.32	1.32
50	98.93±0.54	0.55
100	99.91±0.87	0.87
200	99.89±0.80	0.80
500	98.98±0.62	0.63
1000	99.89±0.38	0.38

4.2.2.6. ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun İnsan Plazma Çözeltilerinin Stabilitesi

1) ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun Kısa Dönem Stabilitesi

7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun standart çözeltileri boş plazmaya eklenerek vortekslendi. Ekstraksiyon işlemi sonrası oda sıcaklığında 6, 24 ve 48 saat bekletildikten sonra LC-MS/MS analizi yapıldı. Elde edilen değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin LC-MS/MS analiz sonuçları ile mukayese edilerek % geri kazanım olarak ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için sırasıyla Tablo 4.22, Tablo 4.23 ve Tablo 4.24'de verildi

2) ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun Uzun Dönem Stabilitesi

7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanan edilen ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun standart çözeltileri boş insan plazmasına eklenerek vortekslendi. Ekstraksiyon işlemi sonrası -20°C ve -70°C'de 24, 48 ve 60 saat bekletildikten sonra LC-MS/MS analizi yapıldı. Elde edilen değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin LC-MS/MS analiz sonuçları ile mukayese edilerek % geri kazanım olarak ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için sırasıyla Tablo 4.22, Tablo 4.23 ve Tablo 4.24'de verildi.

3) ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun Donma ve Erime Stabilitesi

7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanan edilen ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun standart çözeltileri boş insan plazmasına eklenerek vortekslendi. Ekstraksiyon işlemi sonrası -70°C'de 24 saat bekletildi ve oda sıcaklığında erimeye bırakıldı. Bu işlem aralıklarla 3 kez tekrarlandı. Her donma-erime turu sonrası LC-MS/MS analizi yapıldı. Elde edilen değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin LC-MS/MS analiz sonuçları ile mukayese edilerek % geri kazanım olarak ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için sırasıyla Tablo 4.22, Tablo 4.23 ve Tablo 4.24'de verildi.

4) ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun Hazırlama Sonrası Stabilitesi

7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanan edilen ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun standart çözeltileri boş insan plazmasına eklenerek vortekslendi. Ekstraksiyon işlemi sonrası viallere koyularak, otosampler üzerinde 6 ve 24 saat bekletildikten sonra LC-MS/MS analizleri yapıldı. Elde edilen değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin LC-MS/MS analiz sonuçları ile mukayese edilerek % geri kazanım olarak ABZ, ABZSO₂ ve ABZSO için sırasıyla Tablo 4.21, Tablo 4.22 ve Tablo 4.23'de verildi.

Tablo 4.21. ABZ plazma çözeltilerin stabilitesi

Zaman (saat)	Eklenen (ng/mL)	Donma Erime Stabilitesi (%GK±SS)	Kısa Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Uzun Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Hazırlama Sonrası Stabilitesi (%GK±SS)
6	7.5	-	89.11 ± 2.211	-	100.38 ± 1.028
	150	-	85.34 ± 1.548	-	99.77 ± 0.462
	750	-	109.72 ± 1.437	-	99.80 ± 0.129
24	7.5	108.57 ± 1.390	93.36 ± 1.530	99.35 ± 0.562	110.13 ± 1.421
	150	104.70 ± 1.061	93.36 ± 1.530	98.80 ± 0.476	109.31 ± 1.319
	750	105.22 ± 1.073	109.94 ± 1.576	101.83 ± 0.500	102.95 ± 0.920
48	7.5	114.06 ± 1.322	91.90 ± 1.374	97.91 ± 0.990	-
	150	113.02 ± 1.121	120.83 ± 2.543	91.37 ± 1.145	-
	750	118.00 ± 1.670	122.00 ± 1.983	113.32 ± 1.891	-
60	7.5	99.04 ± 0.416	-	89.23 ± 2.440	-
	150	99.03 ± 0.356	-	104.56 ± 0.952	-
	750	101.18 ± 0.598	-	103.42 ± 1.002	-

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): analiz yapılmadı

Tablo 4.22. ABZSO plazma çözeltilerin stabilitesi

Zaman (saat)	Eklenen (ng/mL)	Donma Erime Stabilitesi (%GK±SS)	Kısa Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Uzun Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Hazırlama Sonrası Stabilitesi (%GK±SS)
6	7.5	-	89.68 ± 2.421	-	100.52 ± 0.29
	150	-	89.14 ± 2.638	-	99.89 ± 0.112
	750	-	105.32 ± 1.107	-	99.38 ± 0.312
24	7.5	104.86 ± 1.027	91.32 ± 1.416	99.45 ± 0.504	102.81 ± 0.897
	150	103.89 ± 1.057	92.65 ± 1.620	98.96 ± 0.631	104.27 ± 1.251
	750	106.20 ± 1.076	107.35 ± 1.176	101.23 ± 0.502	107.30 ± 1.165
48	7.5	103.86 ± 1.041	94.53 ± 1.4234	99.41 ± 0.506	-
	150	102.99 ± 0.910	93.76 ± 1.571	103.57 ± 0.987	-
	750	103.50 ± 1.015	92.22 ± 1.731	104.00 ± 1.205	-
60	7.5	98.89 ± 0.812	-	89.54 ± 2.535	-
	150	99.14 ± 0.356	-	105.87 ± 1.092	-
	750	102.75 ± 0.817	-	105.35 ± 1.078	-

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): analiz yapılmadı

Tablo 4.23. ABZSO₂ plazma çözeltilerin stabilitesi

Zaman (saat)	Eklenen (ng/mL)	Donma Erime Stabilitesi (%GK±SS)	Kısa Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Uzun Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Hazırlama Sonrası Stabilitesi (%GK±SS)
6	7.5	-	89.90 ± 1.810	-	100.28 ± 0.241
	150	-	97.84 ± 0.718	-	99.86 ± 0.114
	750	-	101.52 ± 0.509	-	100.67 ± 0.211
24	7.5	99.16 ± 0.360	93.78 ± 1.514	99.75 ± 0.185	103.77 ± 0.785
	150	98.95 ± 0.667	91.06 ± 1.830	99.68 ± 0.192	104.86 ± 1.029
	750	101.12 ± 0.621	109.24 ± 2.186	101.74 ± 0.680	107.95 ± 2.220
48	7.5	104.77 ± 1.068	93.90 ± 1.574	98.89 ± 0.568	-
	150	103.50 ± 1.016	92.37 ± 1.785	102.93 ± 1.843	-
	750	103.60 ± 1.065	113.32 ± 2.891	104.64 ± 1.413	-
60	7.5	97.87 ± 0.738	-	89.93 ± 1.740	-
	150	96.03 ± 0.856	-	106.25 ± 1.172	-
	750	103.64 ± 0.762	-	108.42 ± 2.112	-

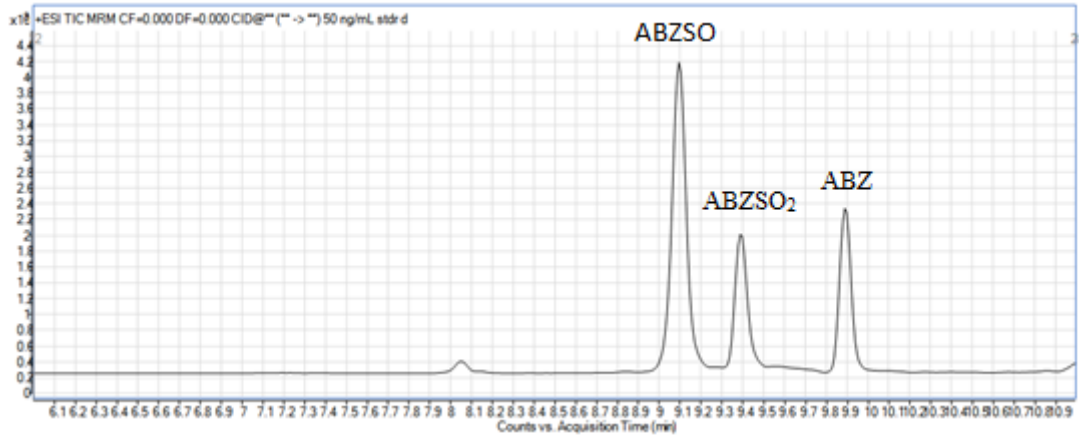
SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): analiz yapılmadı

4.2.3. Tavşan Plazmasında ABZ ve Metabolitlerinin (ABZSO, ABZSO₂)

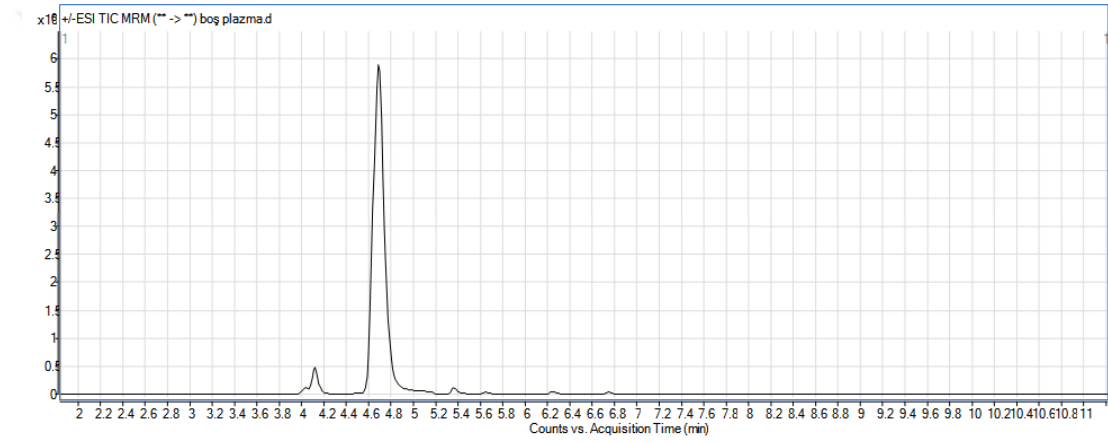
Miktar Tayini ve Geçerlilik Testleri (Validasyon)

4.2.3.1. Özgünlük (Belirleyicilik)

Cihazın çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu kullanılarak ekstraksiyon öncesi kör kan numunesine katım yapılan ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ içeren ve bu maddeleri içermeyen kör tavşan kan örneği (sinyal, gürültü düzeyindedir) analiz edildi. Analiz sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 4.36 ve 4.37’de verildi. Kromatogramlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için belirlenen alıkonma zamanlarında matriksten ve ekstraksiyon işleminden kaynaklanan herhangi bir girişim olmadığı gözlemlendi.



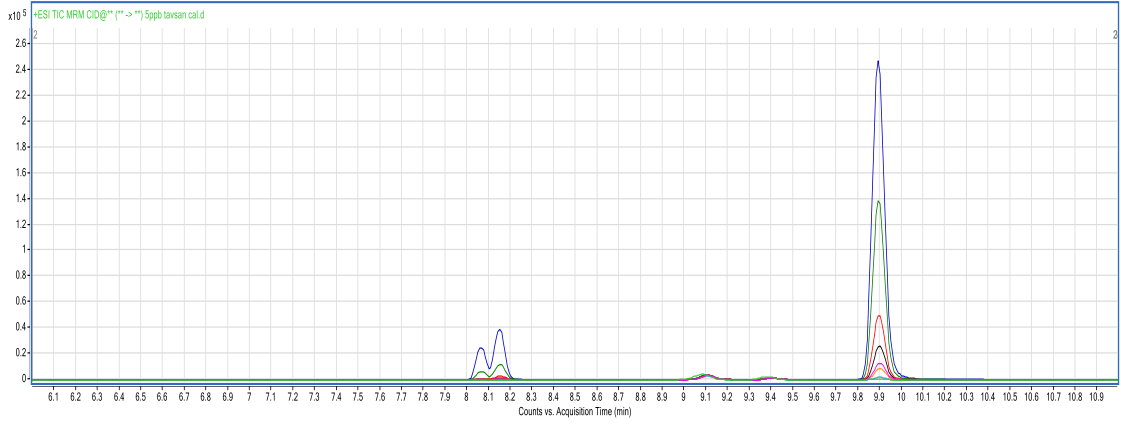
Şekil 4.36. 50 ng/mL konsantrasyonlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ karışımını içeren tavşan plazma çözeltisinin LC-MS/MS kromatogramı



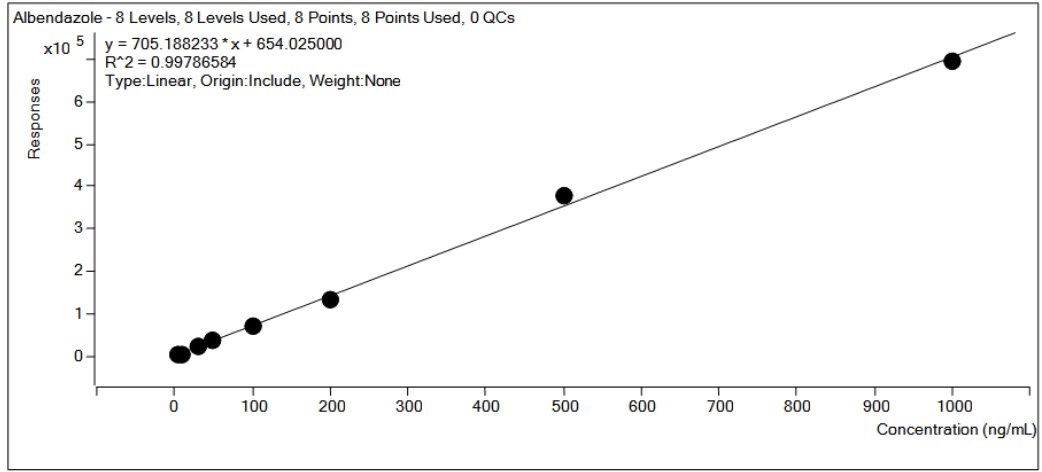
Şekil 4.37. Boş tavşan plazmasının LC-MS/MS kromatogramı

4.2.3.2. Doğrusalık/ Çalışma Aralığı

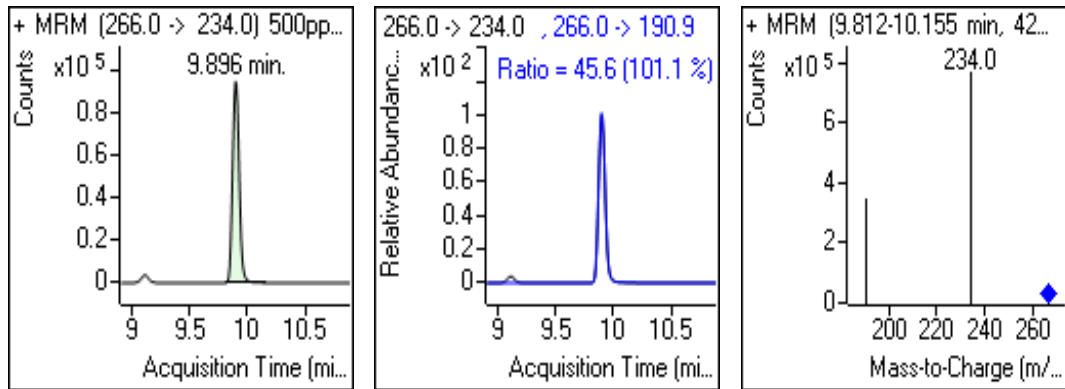
Belli konsantrasyonlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ çözeltileri boş tavşan plazmasına spike edilip karıştırıldıktan sonra Bölüm 3.2.3’de verildiği şekilde ekstrakte edildi ve edilen 8 farklı konsantrasyonda (5, 10, 30, 50, 100, 200, 500 ve 1000 ng/mL) ABZ, ABZSO ve ABZSO₂’nin tavşan plazma çalışma çözeltileri elde edildi. LC-MS/MS spektrumları ve kromatogramları alındı (Şekil 4.38). ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ konsantrasyonlarına karşı respons grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.39, Şekil 4.41 ve Şekil 4.43). Ayrıca Şekil 4.40, Şekil 4.42 ve Şekil 4.44’de 500 ng/mL plazma ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ çözeltilerine ait MRM spektrumları verildi. Her bir eğrinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.24’de verildi.



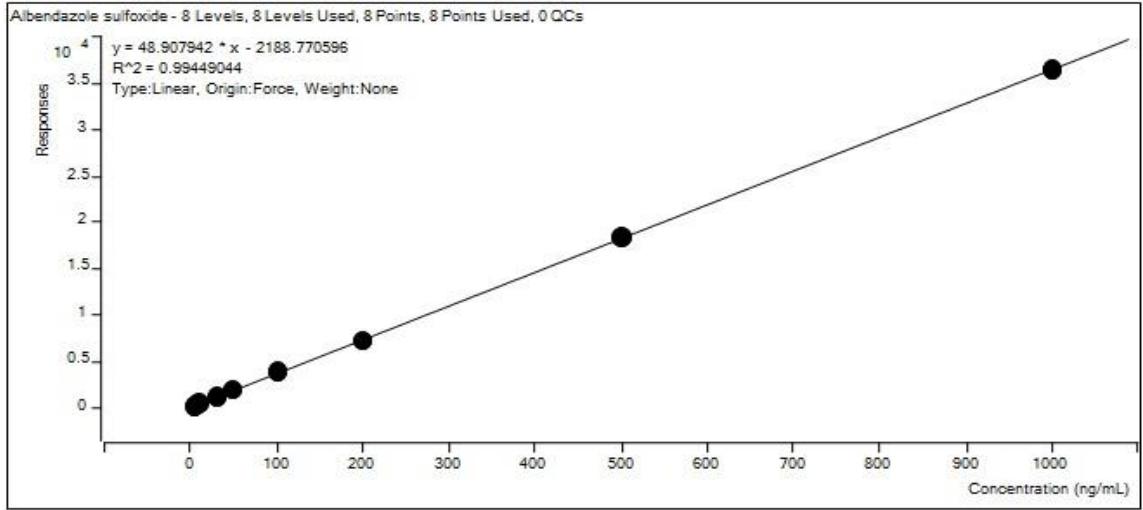
Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlarda tavşan plazması çözeltilerinin LC-MS/MS kromatogramı



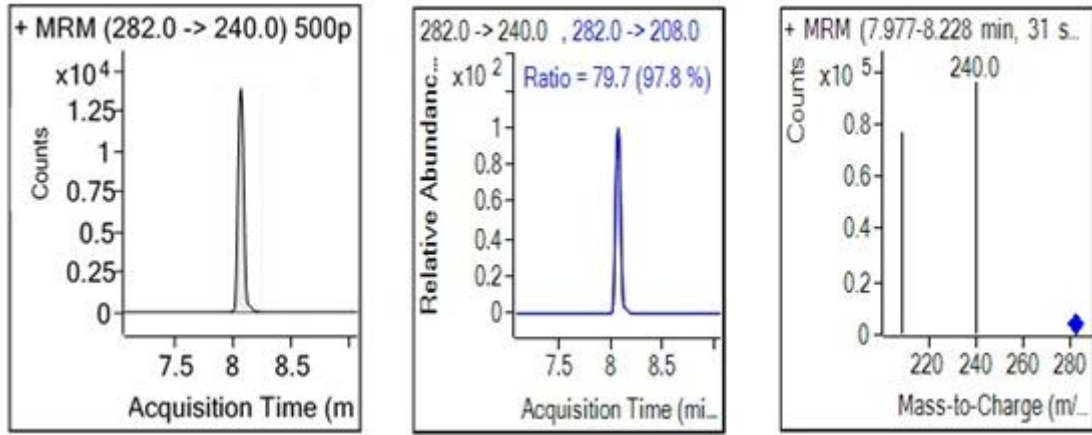
Şekil 4.39. ABZ'nin tavşan plazması çözeltisi kalibrasyon eğrisi



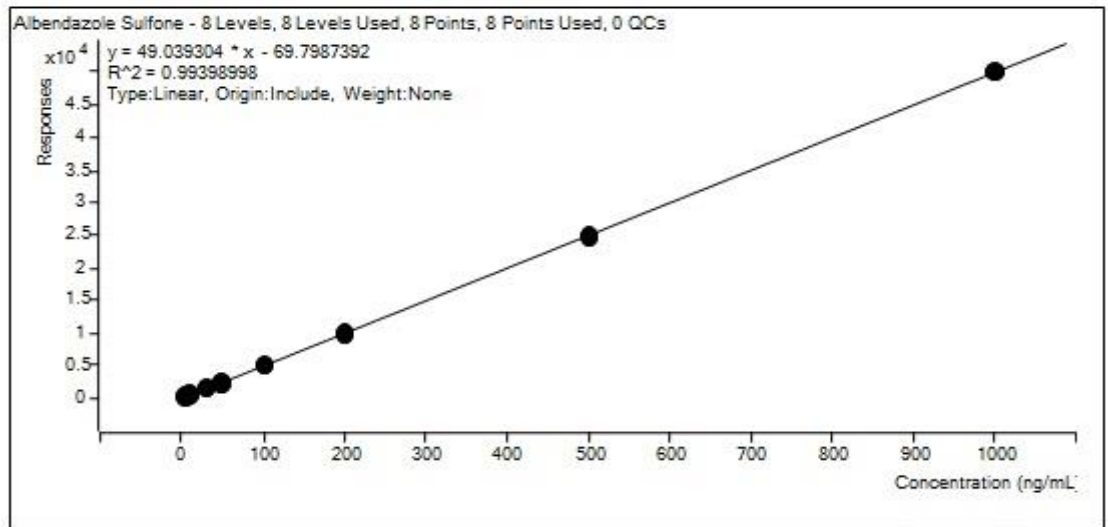
Şekil 4.40. Tavşan plazması çözeltisinde 500 ng/mL konsantrasyonda ABZ'nin MRM spektrumları



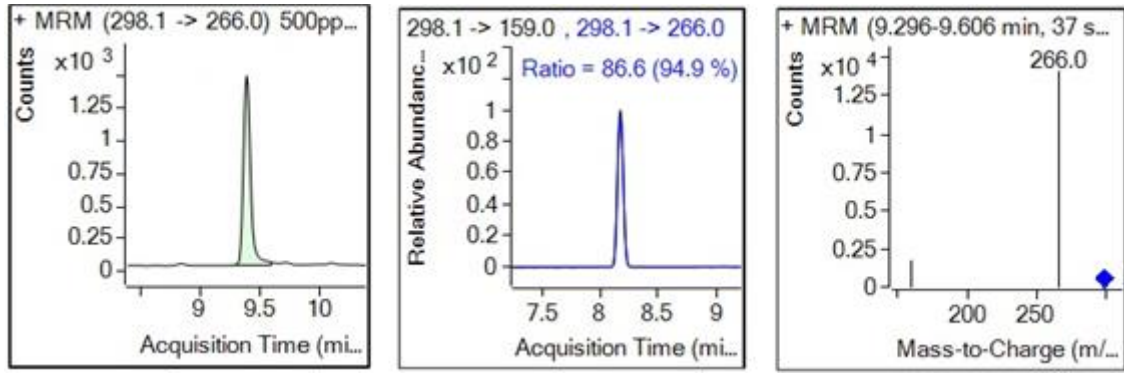
Şekil 4.41. ABZSO'nun tavşan plazması çözeltisi kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.42. Tavşan plazması çözeltisinde 500 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO'nun MRM spektrumları



Şekil 4.43. ABZSO₂'nin tavşan plazması çözeltisi kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.44. Tavşan plazması çözeltisinde 500 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO₂'nin MRM spektrumları

Tablo 4.24. ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

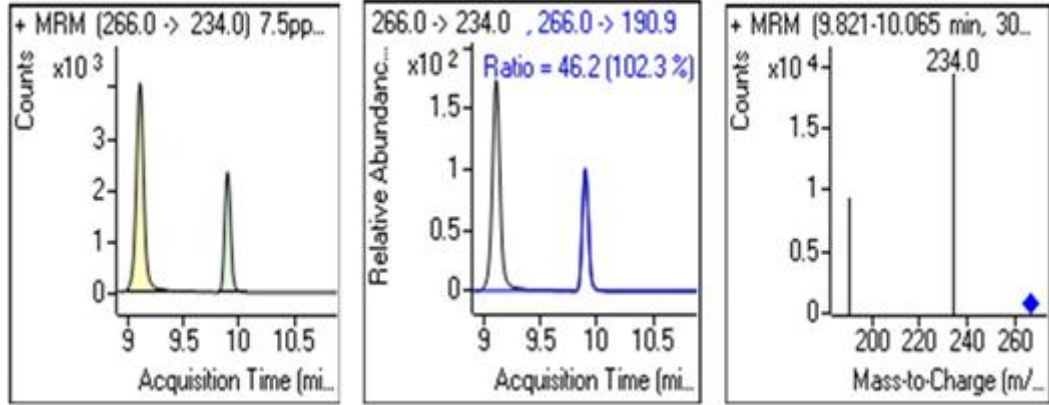
Çözelti Türü		ÇA (ng/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R
Tavşan Plz.	ABZ	5-1000	$y=705.188x + 654.025$	0.520	0.790	0.9979
Tavşan Plz.	ABZSO	5-1000	$y=48.908x-2188.771$	0.401	0.751	0.9945
Tavşan Plz.	ABZSO ₂	5-1000	$y=49.039x- 69.799$	0.602	0.980	0.9939

ÇA: çalışma aralığı, a:6 kalibrasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı, Plz:plazma

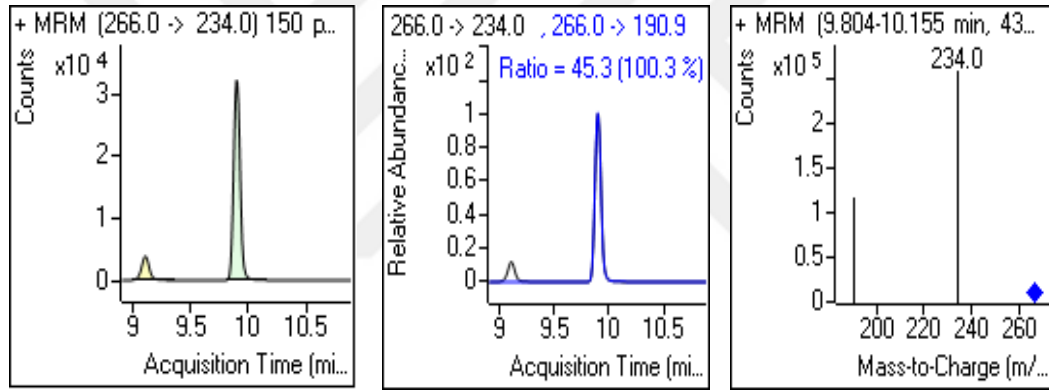
4.2.3.3. Doğruluk/ Kesinlik

Tavşan plazmasına spike edilip ve plazmadan Bölüm 3.2.3'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen yüksek, orta ve düşük konsantrasyonlarda (7.5, 150 ve 750 ng/mL) ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin plazma kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. LC-MS/MS cihazında analizleri yapıldı. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hataları belirlendi. Doğruluk; bağıl hatayla [%BH: (bulunan değer-eklenendeğer/eklenen değer) x100] ve kesinlik; bağıl standart sapma [% BSS= (standart sapma/ortalama değer) x100]] ile verildi. ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için standart çözeltilerinden LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.25, Tablo 4.26 ve Tablo 4.27'de verildi. Ayrıca 7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda ki plazma çözeltilerinde ABZ'nin MRM spektrumları sırasıyla Şekil 4.45, Şekil 4.46 ve Şekil 4.47'de, ABZSO'nun MRM

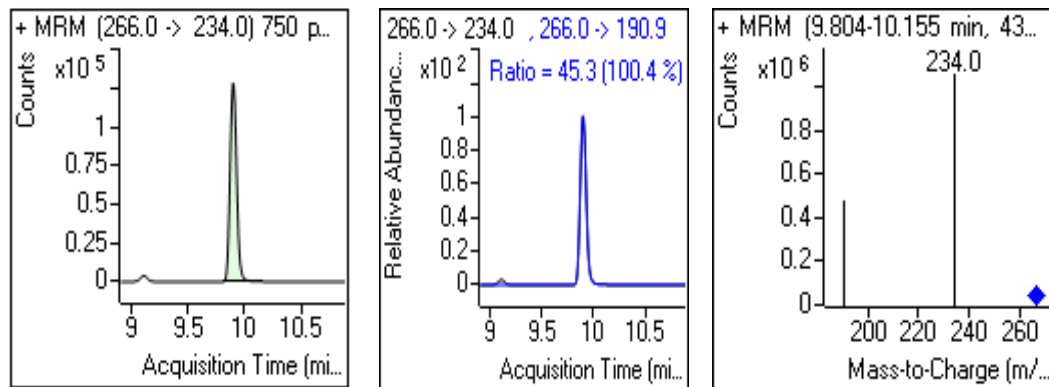
spektrumları sırasıyla Şekil 4.48, Şekil 4.49 ve Şekil 4.50’de ve ABZSO₂’nin MRM spektrumları sırasıyla Şekil 4.51, Şekil 4.52, Şekil 4.53’de verildi.



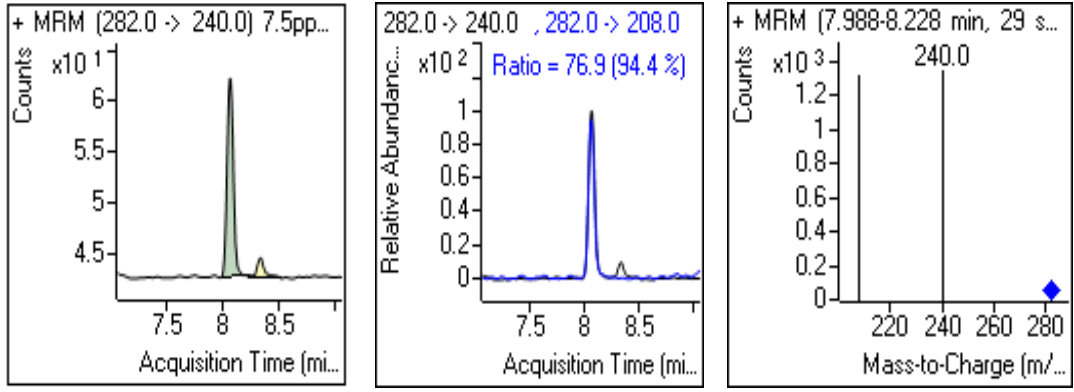
Şekil 4.45. Tavşan plazma çözeltisinde 7.5 ng/mL konsantrasyondaki ABZ’nin MRM spektrumları



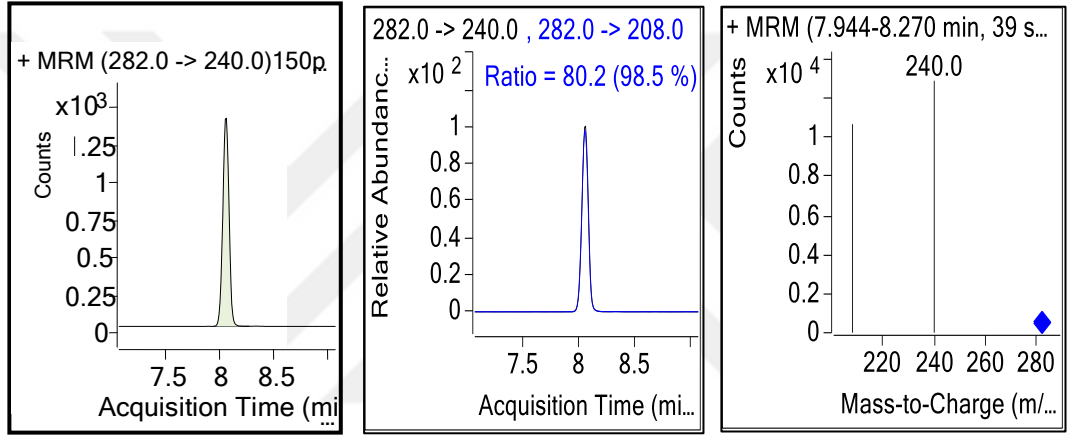
Şekil 4.46. Tavşan plazma çözeltisinde 150 ng/mL konsantrasyondaki ABZ’nin MRM spektrumları



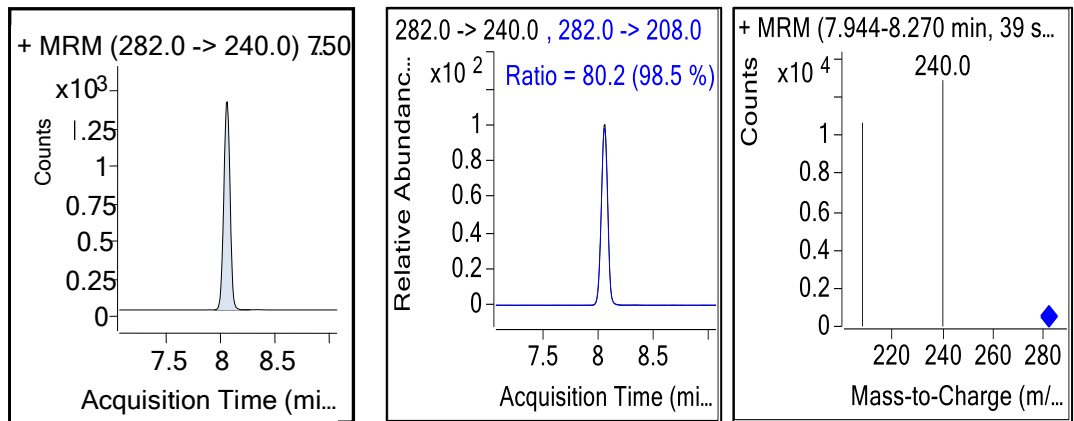
Şekil 4.47. Tavşan plazma çözeltisinde 750 ng/mL konsantrasyondaki ABZ’nin MRM spektrumları



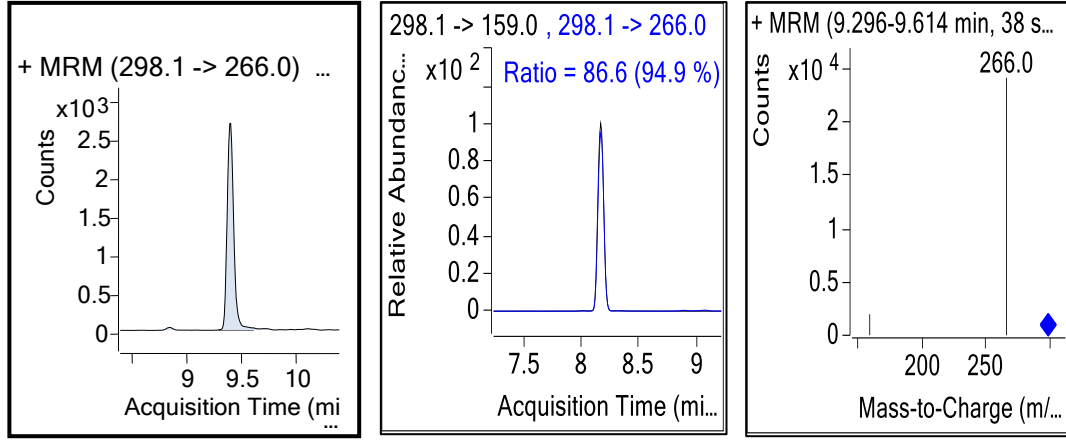
Şekil 4.48. Tavşan plazma çözeltisinde 7.5 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO'nun MRM spektrumları



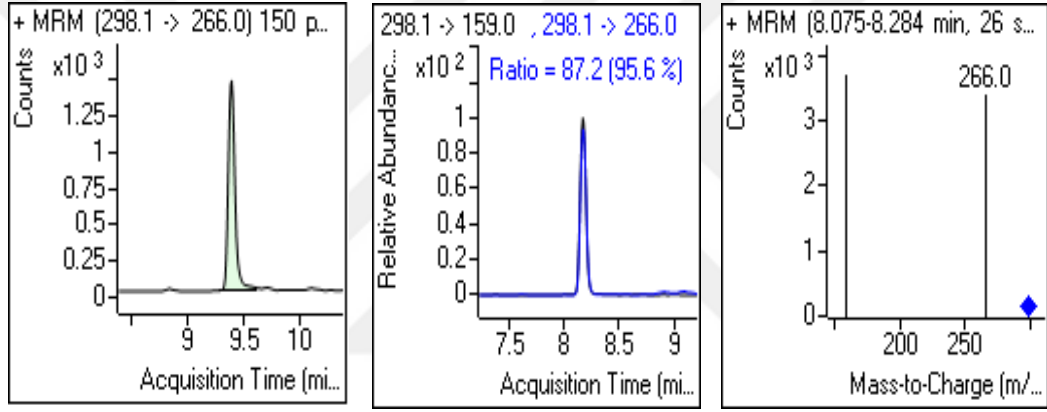
Şekil 4.49. Tavşan plazma çözeltisinde 150 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO'nun MRM spektrumları



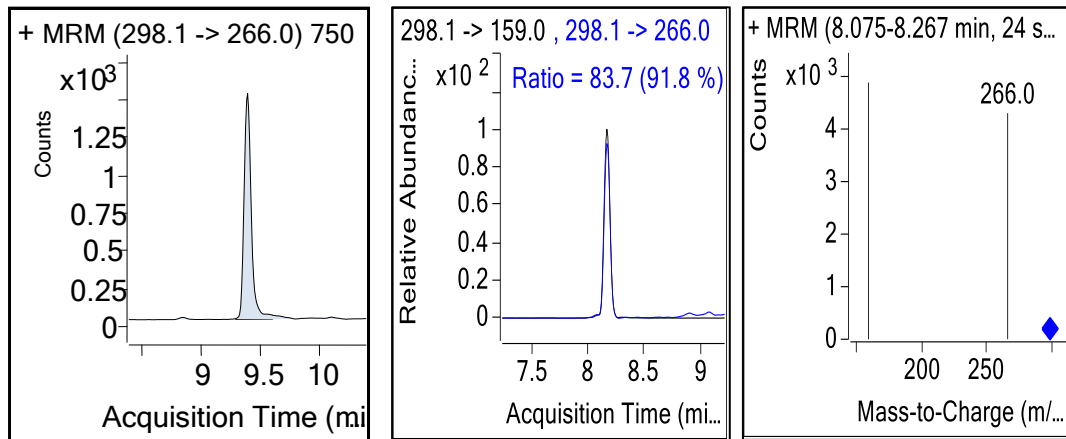
Şekil 4.50. Tavşan plazma çözeltisinde 750 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO'nun MRM spektrumları



Şekil 4.51. Tavşan plazma çözeltisinde 7.5 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO₂'nin MRM spektrumları



Şekil 4.52. Tavşan plazma çözeltisinde 150 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO₂'nin MRM spektrumları



Şekil 4.53. Tavşan plazma çözeltisinde 750 ng/mL konsantrasyondaki ABZSO₂'nin MRM spektrumları

Tablo 4.25. ABZ tavşan plazma çözeltilerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Ortam	Eklenen (ng/mL)	Günüçi			Günler Arası		
		Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)	Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)
Plazma	7.5	7.49 ± 0.04	3.26	0.53	7.49 ± 0.04	3.24	0.53
	150	151.31 ± 0.98	5.32	0.65	149.67 ± 0.89	3.52	0.59
	750	751.12 ± 0.96	4.67	0.13	749.76 ± 0.91	4.60	0.12

SS: Standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

Tablo 4.26. ABZSO tavşan plazma çözeltilerin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Ortam	Eklenen (ng/mL)	Günüçi			Günler Arası		
		Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)	Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)
Plazma	7.5	7.49 ± 0.02	1.26	0.28	7.49± 0.02	2.89	0.27
	150	151.2 ± 0.49	3.29	0.32	150.34± 0.80	4.56	0.53
	750	750.79 ± 0.79	4.76	0.11	751.10 ± 0.95	3.85	0.13

SS: Standart sapma, BH:Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

Tablo 4.27. ABZSO₂ tavşan plazma çözeltilerin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Ortam	Eklenen (ng/mL)	Güniçi	Güniçi	Günler Arası			
		Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)	Ortalama±SS (ng/mL)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)
Plazma	7.5	7.51 ± 0.03	5.29	0.40	7.49 ± 0.03	1.69	0.40
	150	149.87 ± 0.35	3.26	0.23	151.31 ± 0.38	3.83	0.25
	750	750.69 ± 0.76	4.83	0.10	750.45 ± 0.38	5.68	0.05

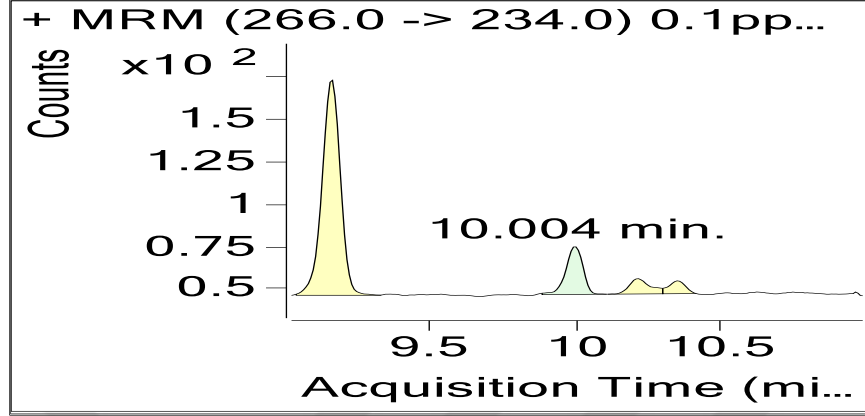
SS: Standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

4.2.3.4. LOD ve LOQ

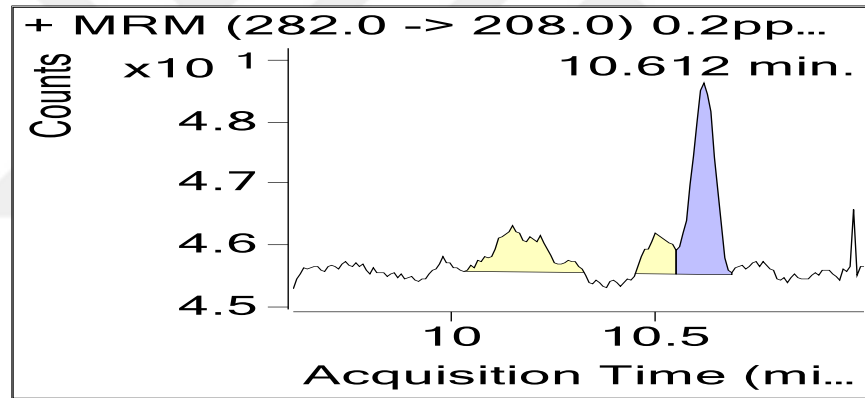
ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin standart ve plazma çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük konsantrasyon değerinden daha küçük konsantrasyonlara (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8 ve 1 ng/mL) inilerek bir seri standart çözeltileri hazırlandı ve LC-MS/MS cihazında okutuldu. Kromatogramlarda sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon LOD ve 10 olduğu konsantrasyon ise LOQ değerleri olarak belirlendi.

LC-MS/MS yöntemine göre ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin hem standart ve hem

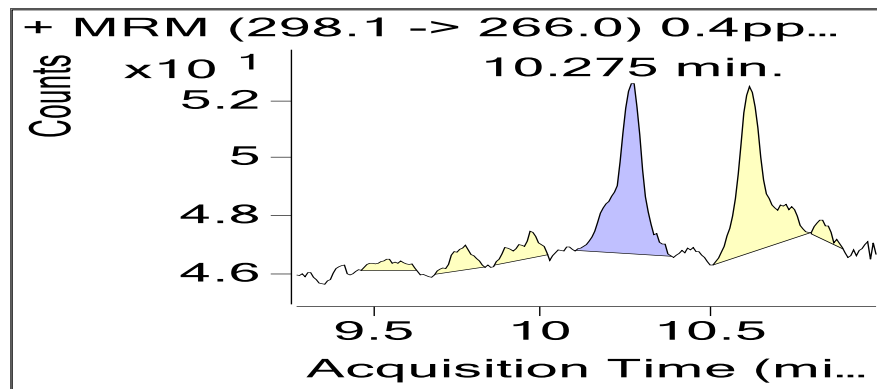
de plazma çözeltilerinde LOD değerleri sırasıyla 0.1 ng/mL, 0.2 ng/mL, 0.4 ng/mL LOQ değerleri sırasıyla 0.3 ng/mL, 0.6 ng/mL ve 1.2 ng/mL olarak tespit edildi. Her birinin LC-MS/MS kromatogramları Şekil 4.54, Şekil 4.55 ve Şekil 4.56'de verildi.



Şekil 4.54. 0.1 ng/mL ABZ kromatografisi



Şekil 4.55. 0.2 ng/mL ABZSO kromatografisi



Şekil 4.56. 0.4 ng/mL ABZSO₂ kromatografisi

4.2.3.5. Geri Kazanım

Tavşan plazmasından geri kazanım çalışmasında, ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin kalibrasyon standart çözeltileri plazmaya eklendi, vortekslendi ve Bölüm 3.2.3'de verilen ekstraksiyon işlemi ile ekstrakte edildi. Elde edilen plazma çözeltileri LC-MS/MS cihazında analizleri yapıldı. Aynı zamanda aynı konsantrasyondaki standart çözeltilerin de LC-MS/MS cihazında analizleri yapıldı. Plazma çözeltilerinin konsantrasyon değerleri standart çözeltilerden elde edilen konsantrasyon değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.28, Tablo 4.29 ve Tablo 4.30'de verildi.

Tablo 4.28. Tavşan plazmasına katım yapılan ABZ çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri

Eklenen (ng/mL)	Geri Kazanım±SS	% BSS
5	98.81±2.05	2.07
10	99.56±1.03	1.03
30	99.75±1.49	1.46
50	98.92±1.04	1.05
100	98.95±0.65	0.66
200	99.65±0.67	0.67
500	99.13±0.71	0.72
1000	99.67±0.66	0.66

Tablo 4.29. Tavşan plazmasına katım yapılan ABZSO çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri

Eklenen (ng/mL)	Geri Kazanım±SS	% BSS
5	99.22±2.05	2.07
10	98.85±1.01	1.02
30	98.55±1.51	1.53
50	99.75±0.84	0.84
100	99.89±0.86	0.86
200	98.94±0.89	0.90
500	98.98±0.51	0.52
1000	99.76±0.32	0.32

Tablo 4.30. Tavşan plazmasına katım yapılan ABZSO₂ çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri

Eklenen (ng/mL)	Geri Kazanım±SS	% BSS
5	98.92±2.75	2.78
10	99.12±1.85	1.87
30	98.88±1.27	1.28
50	98.92±0.53	0.54
100	98.90±0.56	0.57
200	99.56±0.88	0.88
500	99.95±0.48	0.48
1000	99.87±0.45	0.45

4.2.3.6. ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun Plazma Çözeltilerinin Stabilitesi

1) ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun Kısa Dönem Stabilitesi

7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun standart çözeltileri boş plazmaya eklenerek vortekslendi. Ekstraksiyon işlemi sonrası oda sıcaklığında 6, 24 ve 48 saat bekletildikten sonra LC-MS/MS analizi yapıldı. Elde edilen değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin LC-MS/MS analiz sonuçları ile mukayese edilerek % geri kazanım olarak ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için sırasıyla Tablo 4.31, Tablo 4.32 ve Tablo 4.33'de verildi.

2) ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun Uzun Dönem Stabilitesi

7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanan edilen ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun standart çözeltileri boş plazmaya eklenerek vortekslendi. Plazmalar -20°C ve -70°C'de 24, 48 ve 60 saat bekletildikten sonra ekstraksiyonları yapıldı ve LC-MS/MS de analiz edildiler. Elde edilen değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin LC-MS/MS analiz sonuçları ile mukayese edilerek % geri kazanım olarak ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için sırasıyla Tablo 4.32, Tablo 4.33 ve Tablo 4.34'de verildi.

3) ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun Donma ve Erime Stabilitesi

7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanan edilen ABZ, ABZSO ve

ABZSO₂'nun standart çözeltileri boş plazmaya eklenerek vortekslendi. Ekstraksiyon işlemi sonrası -70°C'de 24 saat bekletildi ve oda sıcaklığında erimeye bırakıldı. Bu işlem aralıklarla 3 kez tekrarlandı. Her donma-erime turu sonrası LC-MS/MS analizi yapıldı. Elde edilen değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin LC-MS/MS analiz sonuçları ile mukayese edilerek % geri kazanım olarak ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için sırasıyla Tablo 4.32, Tablo 4.33 ve Tablo 4.34'de verildi.

4) ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun Hazırlama Sonrası Stabilitesi

7.5, 150 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanan edilen ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nun standart çözeltileri boş plazmaya eklenerek vortekslendi. Ekstraksiyon işlemi sonrası viallere koyularak, banko üzerinde 6, 24 saat bekletildi ve LC-MS/MS analizleri yapıldı. Elde edilen değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin LC-MS/MS analiz sonuçları ile mukayese edilerek % geri kazanım olarak ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için sırasıyla Tablo 4.32, Tablo 4.33 ve Tablo 4.34'de verildi. Ayrıca Şekil 4.57' de oda sıcaklığında 24 saat bekletilen ABZ standart çözeltinin kromatogramı ve Şekil 4.58'de oda sıcaklığında 24 saat bekletilen ABZ tavşan plazma çözeltisinin kromatogramı verildi.

Tablo 4.31. ABZ plazma çözeltilerin stabilitesi

Zaman (saat)	Eklenen (ng/mL)	Donma Erime Stabilitesi (%GK±SS)	Kısa Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Uzun Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Hazırlama Sonrası Stabilitesi (%GK±SS)
6	7.5	-	89.11 ± 2.211	-	100.38 ± 1.028
	150	-	85.22 ± 1.548	-	99.77 ± 0.462
	750	-	109.72 ± 1.437	-	99.80 ± 0.129
24	7.5	109.68 ± 1.387	93.36 ± 1.530	99.35 ± 0.562	110.13 ± 1.421
	150	105.68 ± 1.057	93.36 ± 1.530	98.80 ± 0.476	109.31 ± 1.319
	750	106.20 ± 1.076	109.94 ± 1.576	101.83 ± 0.500	102.95 ± 0.920
48	7.5	113.86 ± 1.321	91.90 ± 1.374	97.91 ± 0.990	-
	150	112.99 ± 1.111	120.84 ± 2.543	91.37 ± 1.145	-
	750	117.50 ± 1.665	120.05 ± 1.983	113.32 ± 1.891	-
60	7.5	98.95 ± 0.412	-	89.23 ± 2.440	-
	150	99.03 ± 0.356	-	104.56 ± 0.952	-
	750	101.15 ± 0.617	-	103.42 ± 1.002	-

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): analiz yapılmadı

Tablo 4.32. ABZSO plazma çözeltilerin stabilitesi

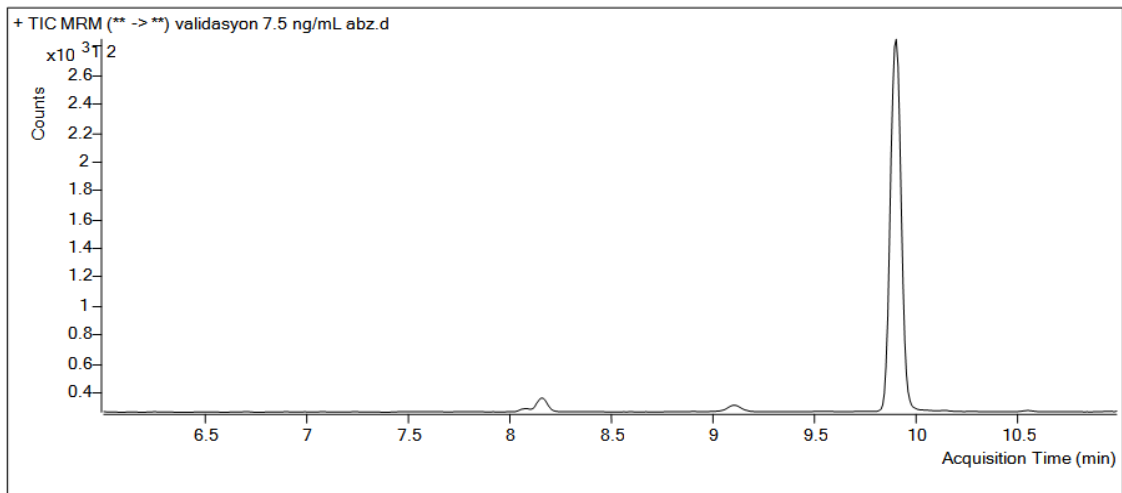
Zaman (saat)	Eklenen (ng/mL)	Donma Erime Stabilitesi (%GK±SS)	Kısa Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Uzun Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Hazırlama Sonrası Stabilitesi (%GK±SS)
6	7.5	-	88.73 ± 2.311	-	100.49 ± 0.19
	150	-	89.14 ± 1.778	-	99.87 ± 0.131
	750	-	106.12 ± 1.409	-	99.38 ± 0.662
24	7.5	104.86 ± 1.577	91.29 ± 0.414	99.13 ± 0.522	106.31 ± 1.019
	150	103.89 ± 0.057	93.36 ± 1.530	98.97 ± 0.683	109.57 ± 1.251
	750	106.20 ± 0.076	108.85 ± 0.576	101.83 ± 0.500	107.29 ± 1.160
48	7.5	103.86 ± 0.321	93.89 ± 1.534	98.91 ± 0.490	-
	150	102.99 ± 0.111	92.69 ± 1.745	103.83 ± 0.543	-
	750	103.50 ± 0.665	91.82 ± 1.831	104.00 ± 0.413	-
60	7.5	98.89 ± 0.412	-	89.11 ± 2.530	-
	150	99.14 ± 0.356	-	105.13 ± 1.252	-
	750	102.75 ± 0.617	-	104.35 ± 1.042	-

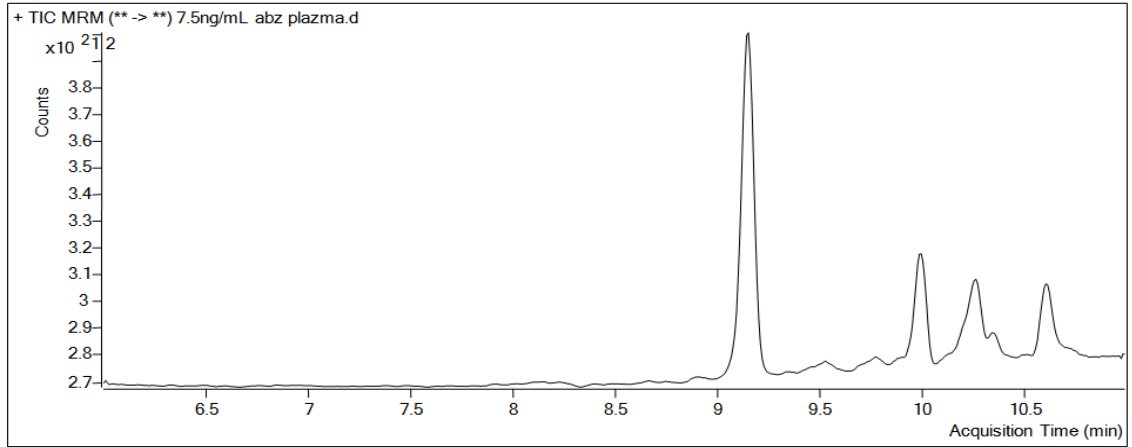
SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): analiz yapılmadı

Tablo 4.33. ABZSO₂ plazma çözeltilerin stabilitesi

Zaman (saat)	Eklenen (ng/mL)	Donma Erime Stabilitesi (%GK±SS)	Kısa Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Uzun Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Hazırlama Sonrası Stabilitesi (%GK±SS)
6	7.5	-	89.31 ± 1.811	-	100.38 ± 0.341
	150	-	95.34 ± 1.048	-	99.76 ± 0.312
	750	-	101.72 ± 0.909	-	100.67 ± 0.851
24	7.5	102.76 ± 1.577	91.65 ± 1.414	99.75 ± 0.362	103.77 ± 1.162
	150	101.34 ± 0.667	91.36 ± 1.830	99.68 ± 0.476	104.54 ± 1.229
	750	101.20 ± 0.716	109.94 ± 2.576	101.74 ± 0.980	106.95 ± 1.920
48	7.5	103.37 ± 1.221	93.90 ± 1.374	98.89 ± 0.570	-
	150	102.48 ± 1.120	95.37 ± 1.895	102.93 ± 1.843	-
	750	103.60 ± 1.265	113.32 ± 0.891	104.64 ± 1.413	-
60	7.5	98.87 ± 0.412	-	89.93 ± 1.740	-
	150	99.03 ± 0.356	-	103.63 ± 1.272	-
	750	103.55 ± 0.762	-	102.42 ± 1.212	-

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): analiz yapılmadı

**Şekil 4.57.** Oda sıcaklığında 24 saat bekletilen standart çözeltinin ABZ kromatogramı



Şekil 4.58. Oda sıcaklığında 24 saat bekletilen plazma ABZ çözeltisinin kromatogramı

4.2.4. İnsan ve Tavşan Plazması İçin Matriks Etkisi

ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ içeren karışım çözeltisinin düşük orta ve yüksek konsantrasyonlarda (7.5, 150 ve 750 ng/mL) kalite kontrol çözeltileri hazırlanarak LC-MS/MS cihazında okutuldu. Aynı konsantrasyondaki çözeltiler bir de 3 ayrı insan plazması ve 3 ayrı tavşan plazması için hazırlandı, okutuldu ve aşağıdaki formül ile insan plazması ve tavşan plazması matriks etkisi ayrı ayrı hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4.34, Tablo 4.35 ve Tablo 4.36’da verildi.

$$\% \text{Matriks Etkisi} = [(A/B) - 1] \times 100$$

A: Cevap_{post-ekstrakte numune piki}

B: Cevap_{non-ekstrakte matriks içermeyen numune piki}

Tablo 4.34. ABZ için matriks etkisi hesaplama

	Pik Alanı (counts)	Hesaplama	%Matriks Etkisi
7.5 ng/mL’lik standart ABZ çözeltisi	6747 (A _{7.5})	[(A _{7.5}) / (B _{7.5}) - 1] × 100	-4.28
insan plazması ile hazırlanan 7.5 ng/mL’lik çözelti (ortalama)	6776 (B _{7.5})		
150 ng/mL’lik standart ABZ çözeltisi	202186 (A ₁₅₀)	[(A ₁₅₀) / (B ₁₅₀) - 1] × 100	-2.69
insan plazması ile hazırlanan 150 ng/mL’lik çözelti (ortalama)	207774 (B ₁₅₀)		
750 ng/mL’lik standart ABZ çözeltisi	335526 (A ₇₅₀)	[(A ₇₅₀) / (B ₇₅₀) - 1] × 100	-0.59
insan plazması ile hazırlanan 750 ng/mL’lik çözelti (ortalama)	337519 (B ₇₅₀)		

Diğer parametrelere ait hesaplamalar yukarıda ki tabloda gösterildiği gibi hesaplandı ve veriler Tablo 4.36 ve Tablo 4.37'de verildi.

Tablo 4.35. İnsan plazmasında ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için matriks etkisi (n=3)

Konsantrasyon (ng/mL)	ABZ %matriks etkisi	ABZSO %matriks etkisi	ABZSO₂ %matriks etkisi
7.5	-4.28	1.83	-0.95
150	-2.69	0.11	-0.88
750	-0.59	0.95	-0.32

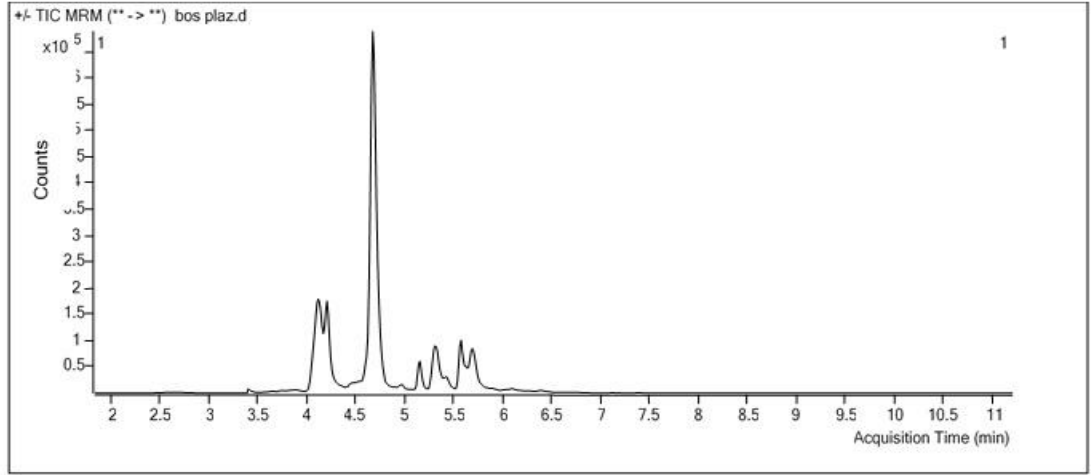
Tablo 4.36. Tavşan plazmasında ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için matriks etkisi (n=3)

Konsantrasyon (ng/mL)	ABZ %matriks etkisi	ABZSO %matriks etkisi	ABZSO₂ %matriks etkisi
7.5	1.69	-1.65	-3.87
150	0.91	-2.87	-2.62
750	1.84	-1.73	-1.83

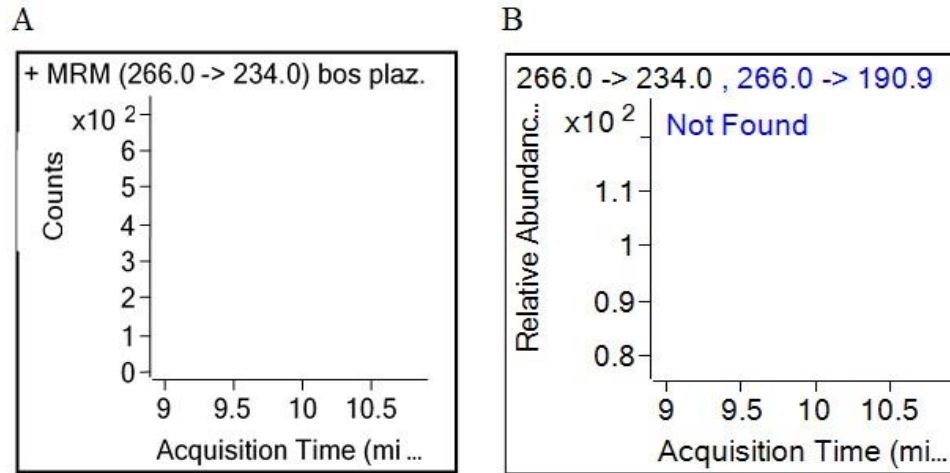
4.3. Tavşanlarda ABZ'nin Farmakokinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Tavşan plazma çalışmasında geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan LC-MS/MS yönteminin gerçek numunelerde uygulanabilir olduğunu görmek amacı ile ABZ etkin maddesini içeren farmasötik preparat (Andazol Tablet ve Andazol Süspansiyon) New Zealand cinsi beyaz sağlıklı üç adet tavşana Bölüm 3.2.5'de belirtildiği gibi uygulandı. Belirli sürelerde alınan kan örnekleri saklama tüplerine konuldu. Bu tavşan kan örnekleri analiz edilinceye kadar -20°C'de saklandı ve plazma örnekleri Bölüm 3.2.3'de belirtildiği şekilde ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktlar LC-MS/MS cihazında kromatogramları ve spektrumları alındı. Şekil 4.59'da andazol ilacı verilmeyen tavşan plazmasının LC-MS/MS kromatogramı ve Şekil 4.60, Şekil 4.61 ve Şekil 4.62'de ise ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için sırası ile MRM spektrumları verildi. Andazol ilacı verilen tavşan plazmasının LC-MS/MS kromatogramı Şekil 4.63 ve Şekil 4.64'de, ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'in MRM spektrumları ise sırasıyla Şekil 4.65, Şekil 4.66 ve Şekil 4.67'de verildi. ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'in konsantrasyonları belirlendi,

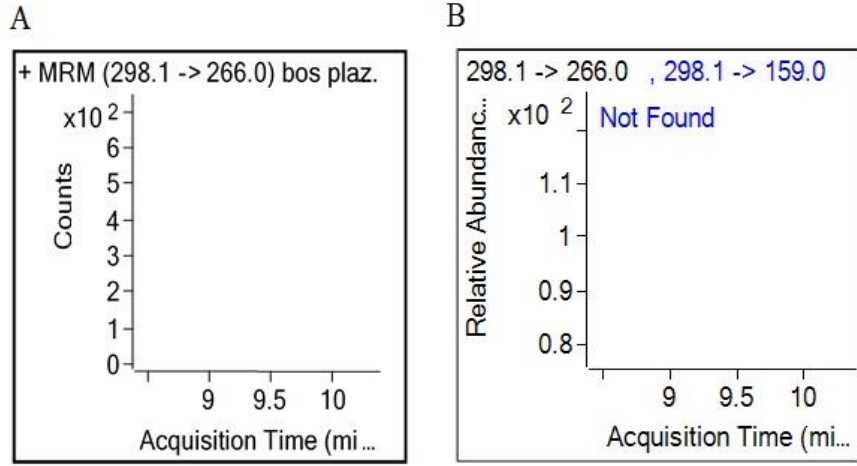
konsantrasyon-zaman ve plazma logaritma eğrileri elde edildi (Şekil 4.68, Şekil 4.69, Şekil 4.70, Şekil 4.71, Şekil 4.72 ve Şekil 4.73). Elde edilen konsantrasyon-zaman eğrilerinden ilacın farmakokinetik parametreleri belirlendi (Tablo 4.37, Tablo 4.38).



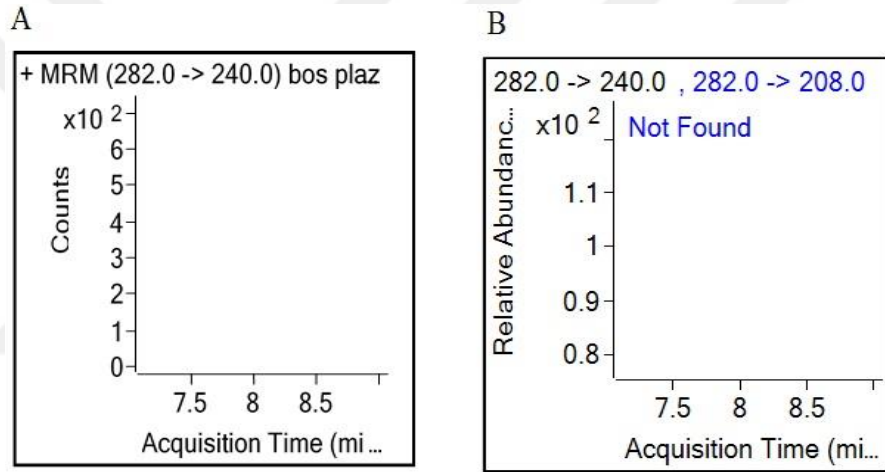
Şekil 4.59. Andazol ilacı verilmeyen tavşan plazmasının LC-MS/MS kromatogramı



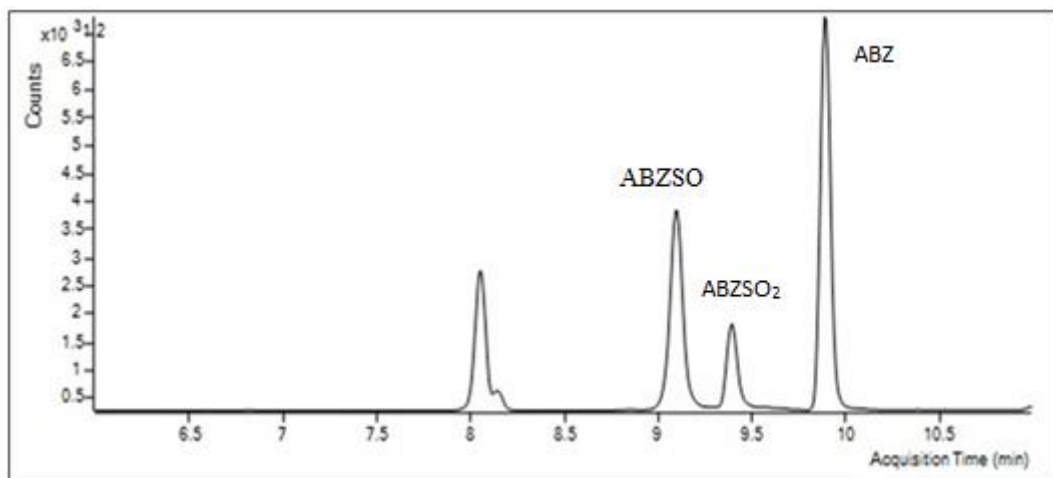
Şekil 4.60. Andazol ilacı verilmeyen tavşan plazmasında ABZ'nin A) LC-MS/MS kromatogramı B)MS/MS spektrumu



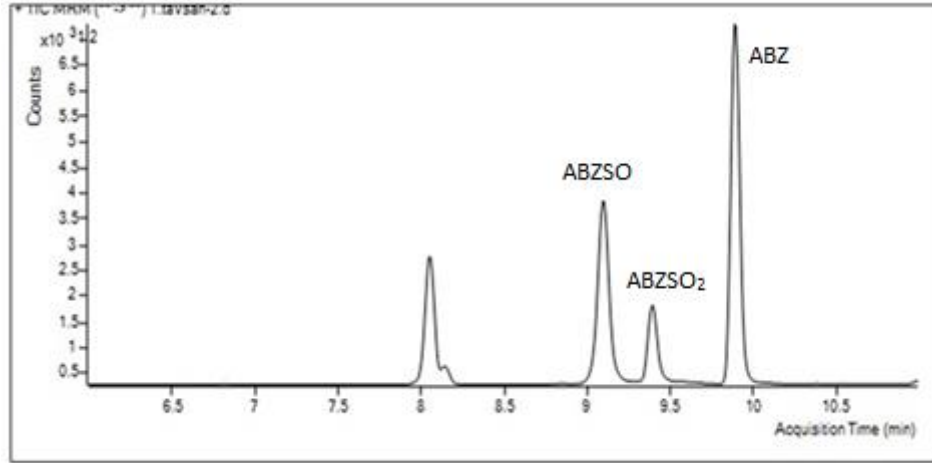
Şekil 4.61. Andazol ilacı verilmeyen tavşan plazmasında ABZSO'nun A) LC-MS/MS kromatogramı B)MS/MS spektrumu



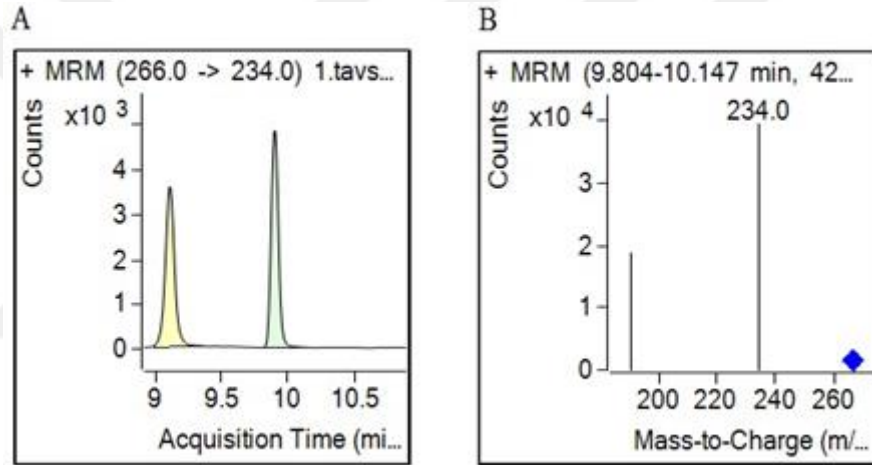
Şekil 4.62. Andazol ilacı verilmeyen tavşan plazmasında ABZSO₂'nin; A) LC-MS/MS kromatogramı B) MS/MS spektrumu



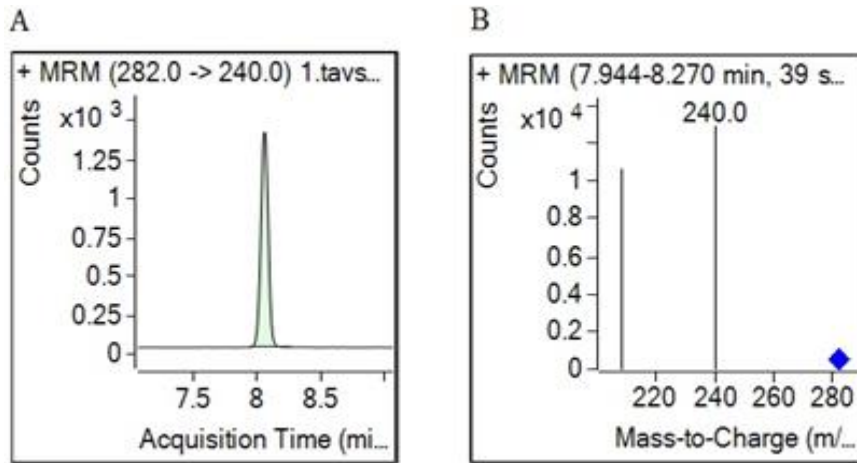
Şekil 4.63. Andazol tabletin oral (35 mg/kg) uygulaması sonucu tavşan plazmasının LC-MS/MS kromatogramı



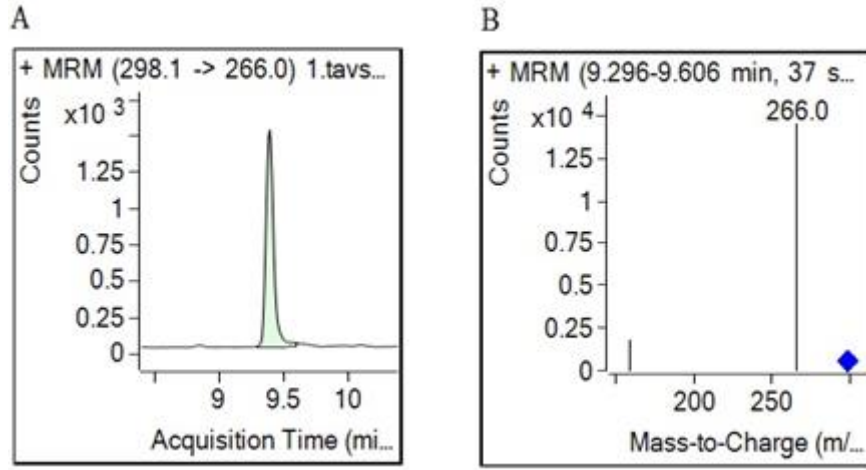
Şekil 4.64. Andazol süspansiyon oral (35 mg/kg) uygulaması sonucu tavşan plazmasının LC-MS/MS kromatogramı



Şekil 4.65. Andazol oral (35 mg/kg) uygulaması sonucunda tavşan plazmasında ABZ'nin; A) LC-MS/MS kromatogramı B) MS/MS spektrumu



Şekil 4.66. Andazolün oral (35mg/kg) uygulaması sonucunda tavşan plazmasında ABZSO'nun; A) LC-MS/MS kromatogramı B)MS/MS spektrumu

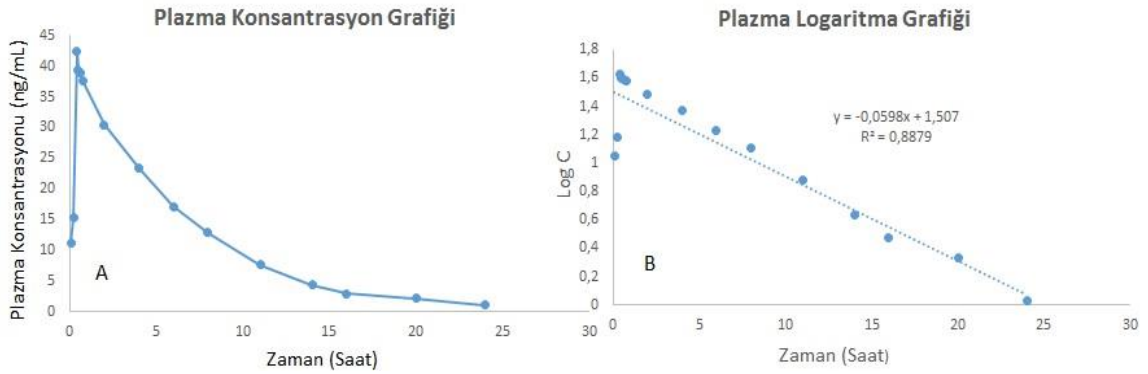


Şekil 4.67. Andazolün oral (35mg/kg) uygulaması sonucunda tavşan plazmasında ABZSO₂'nin; A) LC-MS/MS kromatogramı B)MS/MS spektrumu

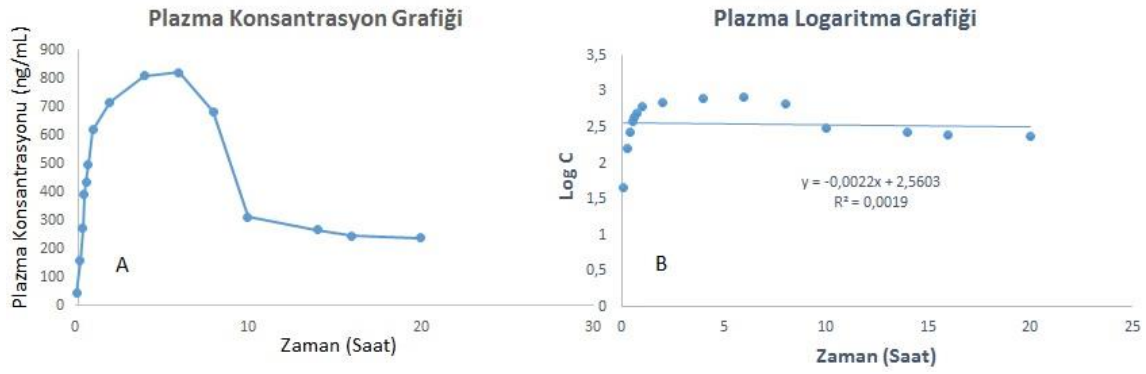
Tablo 4.37. Andazol tabletin (35mg/kg) oral olarak verilen tavşan plazmasında ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin farmakokinetik parametreleri

Parametreler	Albendazol (ABZ)	Albendazol Sülfoksit (ABZSO)	Albendazol Sülfon (ABZSO ₂)
AUC (Area Last of Part)	7.837	47168.544	1740.557
AUC ng.saat/mL	267.682	56474.383	6868.501
Doz (mg)	35	35	35
C ₀ (ng/mL)	31.783	363.174	15.927
k (saat ⁻¹)	0.1378	0.00508	0.1701
V _D (L)	948.798	12.1955	29.9490
Cl (L/saat)	130.752	0.6198	5.0957
T _{1/2} (saat)	5.03	13.529	4.07
C _{Max} (ng/mL)	42.33	821.62	319.62
T _{Max} (saat)	25.2	6	20

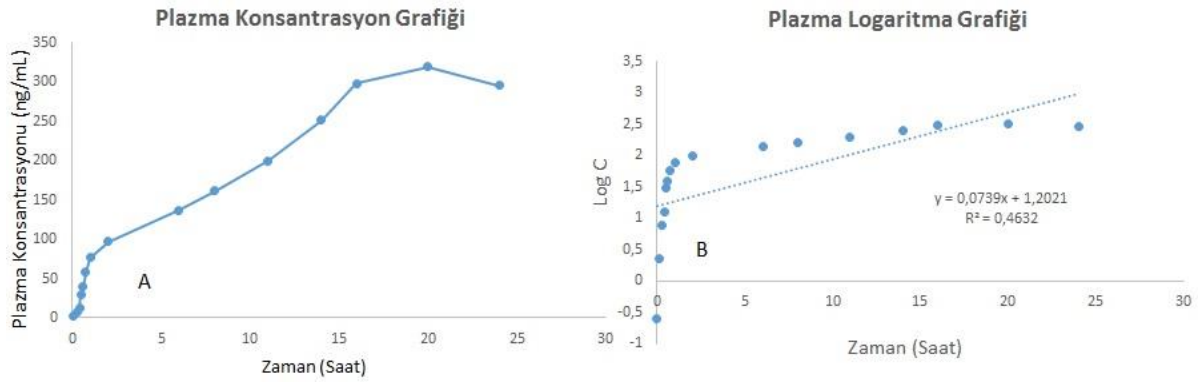
t_{max}: maksimum zaman, C_{max}: maksimum konsantrasyon, AUC: eğri altındaki alan (0-8 saat arası), AUC: Area Last of Part t_{1/2}: yarı ömür, Cl: klerens, VD: eliminasyon hacmi



Şekil 4.68. Andazol tabletin oral verilmesi sonucunda tavşan plazmasında ABZ'nin: A- Plazma konsantrasyon-zaman grafiği, B- Plazma logaritma grafiği



Şekil 4.69. Andazol tabletin oral verilmesi sonucunda tavşan plazmasında ABZSO'nun: A- Plazma konsantrasyon-zaman grafiği, B- Plazma logaritma grafiği

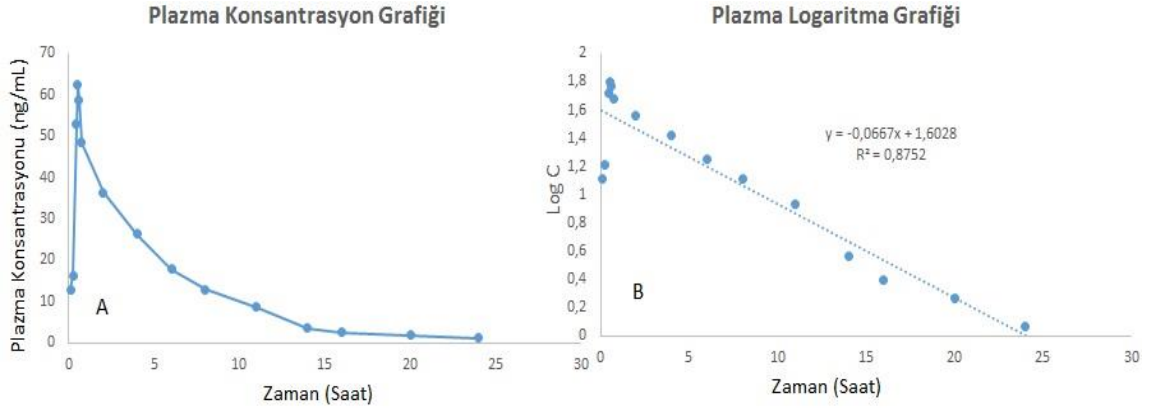


Şekil 4.70. Andazol tabletin oral verilmesi sonucunda tavşan plazmasında ABZSO₂'nin: A- Plazma konsantrasyon-zaman grafiği, B- Plazma logaritma grafiği

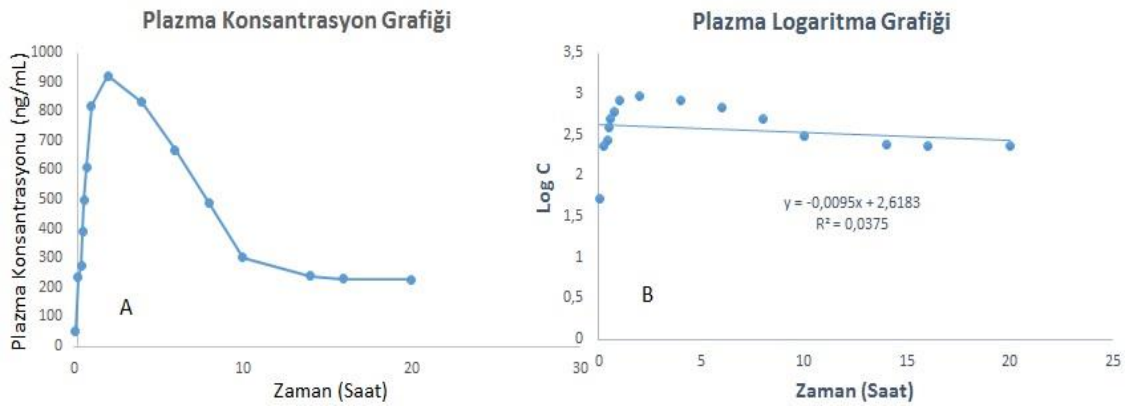
Tablo 4.38. Andazol süspansiyonun (35mg/kg) oral olarak verilen tavşan plazmasında ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin farmakokinetik parametreleri

Parametreler	Albendazol (ABZ)	Albendazol Sülfoksit (ABZSO)	Albendazol Sülfon (ABZSO ₂)
AUC (Area Last of Part)	7.682	10359.696	1757.782
AUC ng.saát/mL	297.311	19297.488	7128.971
Doz (mg)	35	35	35
C ₀ (ng/mL)	39.580	414.523	15.119
k (saat ⁻¹)	0.1536	0.0218	0.1759
V _D (L)	766.379	8.3099	27.911
Cl (L/saat)	117.722	1.8137	4.9095
T _{1/2} (saat)	4.511	3.1955	3.939
C _{Max} (ng/mL)	62.44	920.61	322.82
T _{Max} (saat)	0.5	2	20

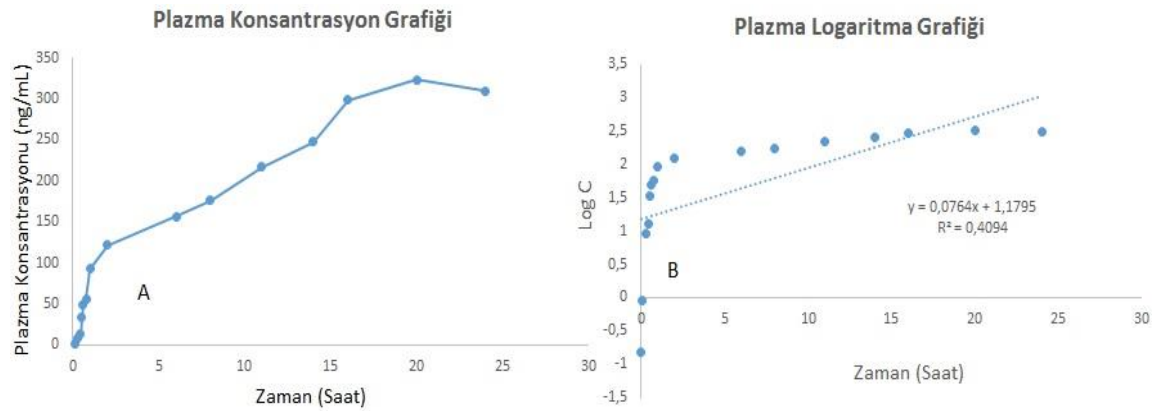
t_{max}: maksimum zaman, C_{max}: maksimum konsantrasyon, AUC: eğri altındaki alan (0-8 saat arası), AUC: Area Last of Part t_{1/2}: yarı ömür, Cl: klerens, VD: eliminasyon hacmi



Şekil 4.71. Andazol süspansiyonun oral verilmesi sonucunda tavşan plazmasında ABZ'nin: A- Plazma konsantrasyon-zaman grafiği, B- Plazma logaritma grafiği



Şekil 4.72. Andazol süspansiyonun oral verilmesi sonucunda tavşan plazmasında ABZSO'nun: A- Plazma konsantrasyon-zaman grafiği, B- Plazma logaritma grafiği



Şekil 4.73. Andazol süspansiyonun oral verilmesi sonucunda tavşan plazmasında ABZSO₂'nin: A- Plazma konsantrasyon-zaman grafiği, B- Plazma logaritma grafiği

5. TARTIŞMA

İlaçların etkili olan kısımları ilaçların etkin maddeleridir. Bir farmasötik preparat her türlü kalite kontrolünden geçmesine rağmen yine de hastaya verildiğinde etkisi yetersiz olabilir. İlaçların biyolojik sıvılarda analizi ile ilacın vücut içerisindeki davranışı incelenebilir ve elde edilen profillerden ilacın biyolojik etkisiyle ilişkisi saptanabilir ve daha tutarlı, verimli tedavilere gidilmesine olanak sağlanabilir. Bu yüzden biyolojik ortamlarda ilaç veya diğer maddelerin miktar analizi, teşhisi, belirlenmesi, ilaç imalat ve piyasa kontrolleri sırasında ilaç etkin maddelerinin analizi bilimsel açıdan önemli çalışmalardandır⁵⁹.

Albendazol sülfoksit (ABZSO₂) ve albendazol sülfon (ABZSO) albendazolün iki önemli metabolitidir ve antihelmintik olarak görev yaparlar. Albendazol ağız yoluyla alındıktan sonra absorbe olan miktar sistemik dolaşıma girmeden önce karaciğerde büyük bir hızla ve geniş ölçüde metabolize olarak ABZSO₂'e dönüşür. İlacın antihelmintik etkisini bu madde yoluyla gösterdiği kabul edilmektedir.

Bu bilgilere göre, plazma da ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ derişiminin belirlenebilmesi, kist hidatik tedavisinde yardımcı bir faktör olabilir. Ayrıca gerek ilaç imalatında ve gerekse piyasa da var olan ticari preparatların kontrolleri sırasında ilaç etken maddelerinin miktarlarının doğru olarak belirlenmesi ilacın kullanımı açısından çok önemlidir. Eksik etken madde içeren ticari preparatlar gerekli terepotik etkiyi göstermemekte, ilaçların yan etkileri dikkate alındığıdaysa fazla ilaç etkin maddesi içeren ticari preparatlar pek çok zararlı etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, ilaç etken maddelerinin farklı ticari preparatlarda ve farklı biyolojik matrikslerde belirlenebilmesi önemlidir⁶⁰.

Değişik numune ortamlarda maddelerin teşhisi, tanınması, miktarının belirlenmesi gibi kalitatif ve kantitatif analizlerde çeşitli analitik yöntemler

kullanılmaktadır. Kimyasal analizlerde kullanılabilecek iyi bir yöntem seçimini yapabilmek için analitik yöntemler hakkında yeterli bir bilgi ve donanıma sahip olmak ve ayrıca çalışılacak konu hakkında iyi bir literatür bilgisine de sahip olmak gerekmektedir. Tabi ki uygulanacak analitik tekniğin nasıl seçilmesi gerektiği hususunda net bir şey söylemek mümkün değildir, çünkü her türlü koşullar altında en iyi yol sadece bir tane değildir. Genel olarak yöntem seçiminde ilk adım analiz sırasında ölçülmek istenen değerlerin belirlenmesi ve buna ulaşmak için en hızlı ve güvenli yolun araştırılmasıdır⁶¹.

Bu tez çalışmasında ilk olarak eczanelerde satılan tablet formundaki farmasötik preparatlarda albendazol miktar tayini için bir UV-Görünür Bölge Spektrofotometre yöntemi geliştirildi ve yöntem geçerlilik testleri yapıldı. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre yönteminin 295 nm dalga boyunda maksimum absorbans verdiği ve 2-10 µg/mL ABZ konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu tespit edildi. Bu aralıkta elde ettiğimiz kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısını 0.9996 ve eğrinin regresyon denkleminin de $A=0.1345x + 0.00$ belirlendi. Korelasyon katsayısının 1'e çok yakın olması yöntemin doğrusallığını göstermektedir. ABZ için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.25 ve 0.5 µg/mL olarak tespit edildi. Bu değerlerden yola çıkarak yöntemin düşük miktarlarda ABZ tayinine olanak verdiğini göstermektedir. Yöntemin doğruluğu Bağlı hata (%BH) kesinlik ise Bağlı standart sapma (%BSS) ile verildi. Bağlı hatanın %7'den küçük, bağlı standart sapmanın ise %0.9'dan küçük ve analitik geri kazanım değerinin de ortalama %100.53 olduğu belirlendi.

Yapılan literatür taramasında standart ve farmasötik preparatlarda ABZ'nin belirlenmesine yönelik, UV-Görünür Bölge Spektrofotometri^{24,25,26,35} yöntemlerine ulaşılmıştır.

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemiyle yapılan çalışmalarda, Oswal ve

ark.²⁵ tabletlerde ABZ'ün 298 nm dalga boyunda, Marlene ve ark.²⁶ ilaç preparatlarında (oral süspansiyon) %2 lik sülfürik asit içeren metanol içerisinde ABZ'ün 230 nm dalga boyunda, Tella ve ark.²⁷ standart, tablet ve süspansiyon dozaj formlarında ABZ'nin 235 nm dalga boyunda, Sajid ve ark.⁶⁵ ise ABZ'ün 308 nm dalga boyunda maksimum absorbands gösterdiği tespit edilmiş ve çalışmalar bu dalga boylarında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmalarda 2-10 µg/mL²⁵, 2.5-20 µg/mL²⁷ ve 4-10 µg/mL⁶⁵ konsantrasyon aralığında UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin doğrusal olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma 295 nm dalga boyunda gerçekleştirildi ve yöntemin 2-10 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu belirlendi. Çalışmada kullanılan dalga boyu literatürdeki değerlerden farklıdır. Çalışma aralığı ise literatürdeki değerlere yakındır.

Son dönemlerde biyolojik ortamlarda (plazma, serum, idrar ve doku) seçiciliği yüksek ve daha hassas yöntemlere ihtiyaç bulunmaktadır. Bundan dolayı mevcut analitik yöntemler içerisinde LC-MS/MS yöntemi daha çok tercih edilmektedir³. LC-MS/MS yönteminde karışım içerisinde bulunan maddeler yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kısmında fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılmakta ve ayrılan maddeler ise moleküller kütle detektörü ile analiz edilmektedir. İyonlaşma odasında maddeler iyonlaştırılmakta, birincil parçalanmaya uğratılmakta ve birinci kuadrupol filtrede m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılmaktadır. Tayin yapılacak iyonlar filtreden geçtikten sonra iyon moleküller collision gaz adı verilen yüksek saflıkta argon gazı ile parçalanmaya tabi tutulmaktadır. İkinci kuadrupol filtrede parçalanma sonucu oluşan iyonlar arasından seçilen ikincil iyon detektöre ulaşır ve bu iyon üzerinden teşhis ve miktar tayini yapılmaktadır. Sıvı kromatografi kısmında örnek tipine uygun kolon ve MS'e zarar vermeyecek çözücüler kullanılmaktadır. Kullanılan kolonlar ve çözücüler

kontaminasyona karşı kararlıdır, bundan dolayı da değişik örneklerle çalışabilme avantajına sahiptir⁴⁹.

Kütle/iyon (m/z) oranları aynı olan çok sayıda molekül olmasına rağmen doğada aynı parçalanma iyonuna sahip molekül oranı onbinde birdir. Bu nedenle LC-MS/MS analiz edilen maddeye özgü özel bir test tekniğidir. Ayrıca çok düşük konsantrasyonlarda maddeyi analiz etmekte mümkündür⁵¹. Standart HPLC yöntemiyle karşılaştırarak olursak HPLC yönteminde maddeler alıkonma süresine (t_R) göre teşhis edilirken LC-MS/MS yönteminde alıkonma süresine (t_R) ek olarak moleküler iyon ve ürün iyonu gibi “1.cil ve 2.cil” iyonlarla teşhis edilmektedir. Bu işlemde yöntemin spesifikliğini güçlendirmektedir⁵¹.

Bu bahsedilen özelliklerden dolayı çalışmamızda insan ve tavşan plazmasında ABZ ve metabolitlerinin (ABZSO ve ABZSO₂) miktar tayinleri için LC-MS/MS yöntemi geliştirildi ve yöntem geçerlilik testleri yapıldı.

Bir çalışmada uygulanacak analitik yöntemin seçimi yapıldıktan sonra bu yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, spesifiklik ve hassaslık gibi parametreleri içeren geçerlilik testlerinin yapılması gerekmektedir. Geçerlilik testlerinde belirli otoriteler tarafından kabul edilen kriterlerde üretilmiş olan saflık derecesi tam olarak bilinen standart maddeler kullanılır⁶². Geliştirilip geçerlilik testleri yapılmış yöntemlerin uygulanabilir olduğunu göstermek içinde gerçek numunelerde (farmasötik preparat, plazma, serum vb. gibi) mevcut maddenin miktar tayinlerini yaparak gösterilir⁶³.

Bu çalışma da, standart çözeltilerde, insan plazmasında ve tavşan plazmasında ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin miktar tayinleri için LC-MS/MS yöntemi geliştirildi ve yöntemin geçerlilik testleri yapıldı. Yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için albendazol etkin maddesine sahip ticari olarak satılan andazol tablet ve andazol

süspansiyon da ABZ miktar tayini yapıldı. Ayrıca andazol tablet ve andazol süspansiyon oral olarak verilmiş tavşanların plazmasında ABZ ve metabolitlerinin miktar tayinleri gerçekleştirildi. Bu işlem sonucunda tavşanlarda ABZ ve metabolitlerinin farmakokinetik parametreleri belirlendi.

LC-MS/MS yöntemi ilk önce standart çözeltilerde ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin miktar tayini için yöntem parametreleri belirlendi (Bölüm 3.2.2). Standart çözeltilerin kromatogramları alındı (Şekil 4.6). Sonra ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ içeren farklı derişimlerde karışım çözeltileri hazırlandı ve LC-MS/MS kromatogramları alındı (Şekil 4.7). ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ piklerinin geldiği alıkonma zamanlarında çözücünden kaynaklanan herhangi bir girişimin olmadığı tespit edildi. İnsan ve tavşan plazma çözeltileri içinde aynı tür çalışmalar yapıldı. Kromatogramlarda ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için belirlenen alıkonma zamanlarında matriksten ve ekstraksiyon işlemlerinden kaynaklanan herhangi bir girişim olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.36 ve Şekil 4.37). Geliştirilen yöntem her üç madde için spesifiktir.

Hem standart çözeltiler hem de plazma çözeltileri için ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ 5-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal ve korelasyon katsayısının 0.999 olduğu tespit edildi. Korelasyon katsayısının bire çok yakın olması yöntemin doğrusallığının yüksek olduğunu gösterir. ABZ, ABZSO ve ABZSO₂'nin hem standart çözeltilerde hem de plazma çözeltilerinde LOD değeri sırasıyla 0.1 ng/mL, 0.2 ng/mL ve 0.4 ng/mL; LOQ değerleri ise sırasıyla 0.3 ng/mL, 0.6 ng/mL ve 1.2 ng/mL olarak belirlendi. Bu değerler yöntemin hassasiyetinin yüksek olduğunu gösterir. Yöntemin doğruluğu bağıl hatayla kesinliği bağıl standart sapma ile verildi. Yöntemin standart çözeltiler ve plazma (insan ve tavşan) için bağıl hatanın %6.0'dan ve bağıl standart sapmanın ise %0.95'den küçük olduğu tespit edildi. Plazmadan geri kazanım değerinin ise ortalama olarak %99.5 olduğu belirlendi.

7.5, 150 ve 750 ng/mL derişimlerde hazırlanan ABZ, ABZSO₂ ve ABZSO'nun standart çözeltilerinin analiz boyunca hangi ortamlarda ne kadar süre ile bozulmadan kaldığını belirlemek amacı ile hem standart çözeltiler hem de plazma çözeltileri için stabilite deneyleri deneysel kısımda anlatıldığı şekilde yapıldı. Standart çözeltiler ve plazma ortamındaki maddelerin 48 saat stabil olduğu bulundu.

Yöntemimizde, 7.5, 150 ve 750 ng/mL'lik konsantrasyondaki standart çözeltiler farklı insan ve tavşan plazmalarına eklenerek matriks etkisi incelendi ve matriks etkisinin olmadığı gözlemlendi. Plazmadaki % matriks etkisi sırasıyla (-0.95), (-0.88) ve (-0.32) olduğu ve aynı konsantrasyonlarda tavşan plazmasında ki % matriks etkisi sırasıyla (-3.87), (-2.67) ve (-1.83) olarak belirlendi. İnsan ve tavşan plazmasında ekstraksiyon aşaması ile matriks uzaklaştırıldığından bu etkinin oldukça zayıf olduğunu gözlemlendi.

Yapılan literatür taramasında, farmasötik preparatlarda ABZ ve onun metabolitlerinin belirlenmesine yönelik, LC-MS/MS^{28-30,38,40,44}, HPLC^{32-35,37-39,41-43}, spektrofotometre^{25-27,36} ve spektrofotometri^{25-27,42} yöntemleri ile ilgili yapılan çalışmalara ulaşıldı.

LC-MS/MS yöntemi ile farmasötik preparatlarda ABZ ve metabolitlerini, Ana Ruiz-Nuno ve ark²⁹. Zorbax XDB-CN kolonda, su- %1 asetik asit (%40, A) ve metanol (%60, B) mobil faz karışımı kullanılarak analiz ettiler. Yöntemin ABZ için 5-1000 ng/mL ve ABZSO için 10-1500 ng/mL aralığında doğrusal olduğu ayrıca ABZ ve ABZSO için LOQ değerleri sırasıyla 5ng/mL ve 10ng/mL olarak belirlediler. Ramesh Mullangi ve ark²⁹. Chromolith RP-C18 kolonda, 1mL/dk akış hızında 5mM amonyum asetat (pH 6) ve asetonitril (20:80, v/v) içeren bir mobil faz kullanarak ayırımı sağladılar. ABZ için 2.01-2007ng/mL ve RBZ için 6.02-6020 ng/mL konsantrasyon aralığında yöntemin doğrusal olduğunu belirlediler. Bonato ve ark³⁸. sabit faz olarak siyanopropil

kolon ve mobil faz olarak %0.5 asetik asit içeren metanol:su (3:7, h/h) karışımını, 1mL/dk akış hızını kullandılar. Bonato ve ark⁴⁰. CN kolon kullanılarak yapılan ayırmada %1 asetik asit ile asitleştirilmiş metanol:su (4:6,h/h) mobil fazını kullandılar. Yöntemin ABZSO için 2500 ng/mL ve ABZSO₂ için 250 ng/mL'ye kadar doğrusal olduğunu ve ortalama geri kazanımın %85'den fazla olduğunu tespit ettiler. Cook ve ark⁴⁴. kromatografik ayırma işlemini, mobil faz olarak metanol-formik asit 20 mmol/L (70:30) kullanarak ters faz C-18 kolon ile gerçekleştirdiler. Yöntemin ABZSO için 20-5000 ng/mL ve ABZSO₂ için 10-1500 ng/mL aralığında doğrusal olduğunu tespit ettiler.

Bu çalışmada C18 kolon, su-amonyum asetat ve metanolden oluşan mobil faza, 0.5 mL/dk akış hızı, 5 µL enjeksiyon hacmi kullanıldı. Literatürdeki mevcut yöntemlerde ABZ için 4-2000 ng/mL ve ABZSO için 4-2000 ng/mL²⁸, ABZ için 5-1000 ng/mL ve ABZSO için 10-1500 ng/mL²⁹, 2.01-2007 ng/mL³⁰ ve 5-2500 ng/mL³⁸ konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu ve belirtilen yöntemler arasında en yüksek LOQ değerinin ABZ için 5ng/mL ve ABZSO için 10 ng/mL olarak verilmiştir. Bizim geliştirdiğimiz yöntemin 5-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal ve LOQ değerinin ABZ, ABZSO ve ABZSO₂ için sırasıyla 0.1, 0.2 ve 0.4 ng/mL olduğu tespit edildi. Bu değerlere bakıldığında geliştirdiğimiz yöntemin hassasiyetinin yüksek olduğunu göstermektedir. Literatürde ABZ ve metabolitlerinin farmakokinetik verilerinin incelendiği çalışmalarda ABZ'nin ve aktif metabolitinin kanda nanogram seviyesinde ölçüldüğü gözlenmiştir^{29,38,40}. Bu nedenle farmakokinetik çalışmaların yapılabilmesi için tayin ve teşhis limitlerinin hassasiyeti son derece önemlidir.

Yöntemin uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla da seçilen tablet formundaki ticari farmasötik preparat Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı gibi hazırlanarak farklı derişimlerde LC-MS/MS ile miktar tayini gerçekleştirildi. Analiz bulguları etiketli miktarlarla uyumlu olarak bulundu. Sonuç olarak, geliştirilen LC-MS/MS yönteminin

ilaç endüstrisinde kalite kontrol çalışmalarında başarıyla uygulanabilir olduğu söylenebilir.

Yapılan literatür taramasında, insan^{28,29,34,35,37,40,44} ve rat plazmasında^{30,32}, koyun sperm hücresi ve koyun plazması^{31,33,42,43}, domuz plazmasında³⁸ ve balık kaslarında⁴¹ ABZ ve metabolitlerinin belirlenmesine yönelik HPLC ve LC/MS/MS ve spektrofotometri yöntemine rastlandı. Fakat tavşan plazmasında ABZ ve metabolitlerinin LC-MS/MS yöntemi ile belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmadı. Bu sebeple ABZ ve metabolitlerinin tavşan plazmasında miktar tayini için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirildi optimum çalışma koşulları belirlenen yöntem ile plazmadan Bölüm 3.2.3’de belirtildiği şekilde ekstrakte edilen ABZ ve metabolitlerinin LC-MS/MS spektrumları alındı ve yöntemin geçerlilik testleri yapıldı.

Plazmadan ABZ ve metabolitlerinin ekstraksiyon prosesinin araştırılması sırasında zaman alıcı işlemleri gerektirmeyen, ABZ ve metabolitlerinin plazmadan gelen kirliliklerden arınmış bir şekilde tayinine imkân veren duyarlı, seçici ve tekrarlanabilir bir yöntem seçilmesi amaçlandı. Bu amaçla Bölüm 3.2.3’de verilen ekstraksiyon yöntemi kullanılarak ABZ ve metabolitleri tavşan plazmasından ekstrakte edildi. Çalışmanın son kısmında geçerlilik testleri yapılan analiz yöntemi tavşan plazmasında ABZ ve metabolitlerinin farmakokinetik verileri araştırılması amacıyla kullanıldı. Farmakokinetik çalışma süresince normal diyetine devam ettirilen üçer adet tavşan kullanıldı. Literatürde insanlar ve ratlar üzerine yapılan çalışmalarda ABZ ve metabolitleri için maksimum derişim zamanı (t_{max}), değışilik gösterdiği gözlenmiştir. Verilerin birbirinden farklı olmasının nedeni vücut kitle indeksi, dağılma hacmi, yaş, kilo, diyet durumu gibi faktörler nedeniyle t_{max} değerinin değışken olması denekler arası varyansının yüksek olmasıdır⁶⁴. Bununla birlikte literatürde bulunan çalışmalarda t_{max} değeri ABZ için 1.75-2.3 saat ABZSO için 3.5-3.6 arasında değışmektedir^{28,29}. Bu

nedenle oral uygulama sonrası tavşanlardan kan örneğinin alınma zamanları 1.saat ve civarında yoğunlaştırılarak tasarlanmıştır. Yapılan çalışmada tavşanlara 35 mg/kg miktarında andazol tablet ve andazol süspansiyon oral olarak verildi. Tablet uygulamada; ABZ için eğri altı alan (AUC) 267.682 ng.saat/mL, maksimum konsantrasyon zamanı (T_{max}): 25.2 saat, maksimum derişim (C_{max}):42.33 ng/mL, klerens (Cl): 130.752 L/saat, yarılanma ömrü (T_{1/2}): 5.03 saat, eliminasyon hacmi (V_D): 948.798L; ABZSO için AUC: 47168.54 ng.saat/mL, t_{max}: 6 saat, C_{max}: 821.62 ng/mL, Cl: 0.62 L/saat, T_{1/2}: 136.37 saat, V_D: 12.20 L; ABZSO₂ için ise AUC: 6868.50 ng.saat/mL, t_{max}: 20 saat, C_{max}: 319.62 ng/mL, Cl: 5.09 L/saat, T_{1/2}: 4.07 saat, V_D: 29.95L olarak belirlendi (Tablo 4.37).

Andazol süspansiyon ile yapılan deneylerde, ABZ için; eğri altı alan (AUC): 297.31 ng.saat/mL, maksimum konsantrasyon zamanı (t_{max}): 0.5 saat, maksimum derişim (C_{max}): 62.44 ng/mL, klerens (Cl): 117.72 L/saat, yarılanma ömrü (T_{1/2}): 4.51 saat, eliminasyon hacmi (V_D): 766.38 L; ABZSO için AUC: 19297.49 ng.saat/mL, t_{max}: 2 saat, C_{max}: 920.61 ng/mL, Cl: 1.81 L/saat, T_{1/2}: 31.75 saat, V_D: 8.31 L; ABZSO₂ için ise AUC: 7128.97 ng.saat/mL, t_{max}: 20 saat, C_{max}: 322.82 ng/mL, Cl: 4.91 L/saat, T_{1/2}: 3.94 saat, V_D: 27.91 L olarak belirlendi (Tablo 4.38).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kist hidatik hastalığı halen dünyanın birçok bölgesinde endemik olarak görülmektedir. Bölgemiz ve ülkemizde yaygın bir sağlık sorunu olarak önemini korumaktadır. Toplumsal boyutlara ulaşan ölümcül sonuçlar doğurabilecek bir sağlık sorunu haline geldiği bilinmektedir. Son yıllarda kist hidatik tedavisinde ilaçla tedavide büyük atılımlar olmuş ve kist hidatik ilaçlarının belirtilen sistemik dolaşımdaki anlaşılma davranışlarının aydınlığa kavuşabilmesi için yeni hayvansal modeller ve analitiksel yöntemler geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma, farmasötik preparatlarda ve tavşan plazmasında antihelmintik bir ilaç olan albendazolün belirlenmesi için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmesi, geçerlilik testlerinin yapılması ve geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin uygulanabilir olduklarını göstermek amacıyla yapıldı.

Çalışma sonucunda ABZ ve metabolitlerinin analizinde geliştirilen yöntemlerin hızlı, hassas ve basit olduğu, farmasötik preparatların kalite kontrol ve farmakokinetik çalışmalarda uygulanabilir olduğu gösterildi. Ayrıca, elde edilen verilerin ABZ ve metabolitlerinin sistemik dolaşımdaki davranışlarının belirlenmesine yönelik yapılacak incelemelere yol göstereceği düşüncesindeyiz.

Aynı yöntemin ilaç kullanan kişilerden alınan insan plazmaları için de geliştirilmesi, hastalarda kullanılması gereken ilaç miktarının belirlenmesi açısından öneriyoruz.

KAYNAKLAR

1. Milicevic M, Saidi F, Sayek İ. Karaciğer Kist Hidatiği. İçinde: Sayek İ (editör). *Temel Cerrahi*, 3. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2004: 1317-1324.
2. Sözüer EM, Ok E, Arslan M. The perforation problem in hydatid disease. *Am J Trop Med Hyg*, 2002, 66:575-577.
3. Hernandez-Avila, CA, Burleson JA, Poling J, Tennen H, Rounsaville BJ, Kranzler HR. Personality and Substance Use Disorders as Predictors of Criminality. *Comprehensive Psychiatry*, 2000, 4: 276-283.
4. Morar R, Feldman C. Pulmonary echinococcosis. *Eur Respir Journal*, 2003, 21:1069-1077
5. Romig T. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch Surg*, 2003, 388:209-217.
6. Gottstein B, Reichen J. Hydatid lung disease (echinococcosis/hydatidosis). *Clin Chest Med*, 2002, 23:397-408.
7. Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17:107-135.
8. Özdemir A. Adana ve Çevresinde Yaşayan İnsanlarda Kistik Ekinokokkoz (Hidatidoz) Antikorlarının Serolojik Yöntemle Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2005.
9. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley P. Echinococcosis. *Lancet*, 2003, 362:1295-1304.
10. Kuzucu A, Soysal O, Ozgel M, Yoloğlu S. Complicated hydatid cysts of the lung: clinical and therapeutic issues. *Ann Thorac Surgery*, 2004, 77:1200-1204.

11. Çukurova Üniversitesi. Adana ve Çevresinde Yaşayan insanlarda Kistik Ekinokokkoz (Hidatidoz) Antikorlarının Serolojik Yöntemle Araştırılması. <http://library.cu.edu.tr/tezler>. 10 Kasım 2015
12. Altıntaş N, Yazar S. Kistik Ekinokokkoz'da Tanı. *Türkiye Parazitol Derg*, 1999, 23: 160-168.
13. Gemmel MA. Hydatidosis control, A global view. *Aust Vet J*, 1979, 55:118-25.
14. Yetim İ, Erzurumlu K. Current Approaches in Treatment of Hydatid Cysts of Liver. *J Clin and Anal Med*, 2013, 4: 64-71.
15. Feng JJ. Effects of mebendazole, albendazole and praziquantel on alkaline phosphatase, acid phosphatase and adenosine triphosphatase of echinococcus granulosus cysts harbored in mice, *Acta Pharmacologica Sinica*, 1992, 13:497-501.
16. Xiao SH, Feng JJ, Guo HF, Jiao PY, Yao MY, Jiao W. Effects of mebendazole, albendazole and praziquantel on fumarate hydratase, pyruvate kinase and phosphoenol-pyruvate phosphoenol-pyruvate carboxykinase of echinococcus granulosus cyst wall harbored in mice, *Acta Pharmacologica Sinica*, 1994, 15: 69-72.
17. Casado A. Phase II study of mitonafide in non; small cell lung cancer (NSCLC). *Invest New Drugs*, 1996, 14:415-417.
18. Aktan AO, Yalın R. Preoperative albendazole treatment for liver hydatid disease decreases the viability of the cyst. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1996, 8:877-879.
19. Horton RJ. Albendazole in treatment of human cystic echinococcosis: 12 years of experience. *Acta Trop*, 1997, 64:79-93.
20. Chai J. Observations on clinical efficacy of albendazole emulsion in 264 cases of hepatic cystic echinococcosis. *Parasitology International*, 2004, 53:3-10.
21. Liu Y, Wang X, Wu J. Continuous long;term albendazole therapy in intra

- abdominal cystic echinococcosis. *Chin Med J*, 2000, 113:827-832.
22. Wen H, Zhang HW, Muhmut M, Zou PF, New RR, Craig PS. Initial Observation on albendazole in combination with cimetidine for the treatment of human cystic echinococcus. *Ann Trop Med Parasitol*, 1994, 88:49-52.
 23. Morris DL. Albendazole treatment of hydatid disease follow up at 5 years. *Trop Doct*, 1989, 19:179;180.
 24. Science Direct. Albendazole. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X03000317>. 13 Şubat 2016.
 25. Oswal A. Validated UV Spectrophotometric Method for estimation of Albendazole in tablet dosage form. *Analytical Letters*, 2010, 34:1355.
 26. Marlene M.F, Marcela M.B, Erika R.M, Rafeal M.P. Determination of Albendazole in Oral Suspension . *Analytical Letters*, 2001, 5:1255-1263.
 27. Tella A.C, Ojeyemi MO, Musa OS, and Gabriel KO. Developing a Spectrophotometric method for the estimation of albendazole in solid and suspension forms. *Int J Phys Sci*, 2010, 5:379-382.
 28. Dafang Z, Chen X, Zhao L, Xu H. Simultaneous determination of albendazole and its major active metabolite in human plasma using a sensitive and specific liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method. *JPBA*, 2004, 35: 829–836
 29. Ruiz NA, Wojnicz A, Cabaleiro OT, Román M M, Ochoa MD, Abad S F. A simple assay for the simultaneous determination of human plasma albendazole and albendazole sulfoxide levels by high performance liquid chromatography in tandem mass spectrometry with solid-phase extraction. *Clinica Chimica Acta*, 2013, 426 :58-63
 30. Mullangi S, Kandaswamy M, Mithra C, Meena AK, Giri S, Rajagopal S and Sharma K. Highly sensitive LC-MS/MS-ESI method for simultaneous quantitation

- of albendazole and ricobendazole in rat plasma and its application to a rat pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26: 247–255.
31. Batzias GC, Theodosiadou E, Delis GA. Quantitative determination of albendazole metabolites in sheep spermatozoa and seminal plasma by liquid chromatographic analysis with fluorescence detection. *JPBA*, 2004, 35: 1191–1202.
 32. Torrado JJ, Garcia JJ, Bolas FF. Quantitative determination of albendazole and its main metabolites in plasma. *J Chromatography B*, 1999, 723: 265–271.
 33. Tucker IG, Wu Z , Medlicott NJ, Razzak M. Development and optimization of a rapid HPLC method for analysis of ricobendazole and albendazole sulfone in sheep plasma. *JPBA*, 2005, 39: 225–232.
 34. Fleckenstein L, Kitzman D, Cheng KJ. HPLC assay for albendazole and metabolites in human plasma for clinical pharmacokinetic studies. *JPBA* , 2002, 30: 801–813.
 35. Bonato PS, Lanchote VL , Marques MPC , Takayanagui OM , Carvalho , Paias FO. Simultaneous determination of albendazole sulfoxide enantiomers and albendazole sulfone in plasma. *J Chromatography B*, 1998, 709:273–279.
 36. Moamen SR, Gehad GM, Fathi A. Spectrophotometric determination of albendazole drug in tablets: spectroscopic characterization of the charge transfer solid complexes. *Chin J Chem*, 2011, 29: 324-332.
 37. Rouini MR, Mirfazaelian A, Dadashzadeh S. A high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of albendazole metabolites in human serum. *JPBA*, 2002, 30:1249-1254
 38. Bonato PS, Oliveira AR, Santana FJ, Fernandes BD, Lanchote VL, Gonzalez AE, Garcia HH, Takayanagui OM. Simultaneous determination of albendazole metabolites, praziquantel and its metabolite in plasma by high-performance liquid

- chromatography–electrospray mass spectrometry. *JPBA*, 2007, 44:558–563.
39. Gomes AJ, Nagaraju V. High-performance liquid chromatographic separation and determination of the process related impurities of mebendazole, fenbendazole and albendazole in bulk drugs. *JPBA*, 2001, 26 : 919–927.
40. Bonato PS, Lanchote VL, Takayanagui OM. Simultaneous liquid chromatography–tandem mass spectrometric determination of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone in plasma. *J Chromatography B*, 2003, 783: 237–245.
41. Shaikh B, Rummel N, Reimschuessel R. Determination of albendazole and its major metabolites in the muscle tissues of atlantic salmon, tilapia, and rainbow trout by high performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 3254–3259.
42. Batzias GC, Delis GA. Reversed-phase liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of albendazole sulfoxide, albendazole sulphone and albendazole 2-aminosulphone in sheep plasma. *J Chromatography B*, 2004, 805: 267–274.
43. Oliveira RV, Belaz RA, Cass Q B. Determination of albendazole metabolites by direct injection of bovine plasma and multidimensional achiral–chiral high performance liquid chromatography. *Talanta*, 2008, 76: 146–153.
44. Jung-Cook H, Hernández IG, Ruiz-Olmedo MI, Cárdenas G. A simple LC-MS/MS method to determine plasma and cerebrospinal fluid levels of albendazole metabolites (albendazole sulfoxide and albendazole sulfone) in patients with neurocysticercosis. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26: 267–272.
45. Yıldız A, Genç Ö, Bektaş S. *Enstrümantal Analiz Yöntemleri*, 2. Baskı. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 1997:220.
46. Hollas JM. *Modern Spectroscopy*. 4th ed. Chichester ; Hoboken, NJ, J. Wiley, 2004.

47. Skoog DA, D.M. West. *Principles of Instrumental Analysis*. 6th ed. Philadelphia, Saunders College, 2014:55-60.
48. Skoog, DA, Holler JF, Nieman TA. *In Principles of Instrumental Analysis, Molecular Mass Spectrometry*. 5th ed. Philadelphia, Saunders College Publishing, 1998:498-534.
49. Agilent Technologies. Agilent 6400 Serisi LC-MS/MS. <http://www.agilent.com/en-us/products/liquid-chromatography/analytical-lc-systems>. 16 Şubat 2016.
50. Öztürk YE. JWH-018 ve Metabolitlerinin LC-MS/MS ile Kan ve İdrarda Tayinleri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul:İstanbul Üniversitesi, 2014.
51. Şener H. Topraktan Nitramin, Nitroaromatik ve Nitrat Ester Grubu Patlayıcıların LC-MS/MS İle Tayini. Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul:İstanbul Üniversitesi, 2013.
52. R. Sweetman, L.Newborn. Screening by tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 1996, 42: 345-346.
53. Bartlett K, Eaton SJ, Pourf Arzam M. New developments in neonatal screening. *Arch Dis Child*, 1997, 77: 151-154.
54. Atila, A. HPLC'nin Biyoanalitik Yöntem Validasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2006.
55. Validation of Analytical Procedures. Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH), Commission of the European Communities, 1996.
56. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation .Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center, 2001.

57. Yıldız A, Genç O, Bektaş S. *Enstrümental Analiz Yöntemleri*, 2. Baskı. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 1997: 417-419.
58. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J Chromatography B*, 2007, 852: 22–34.
59. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan C, Cook CE, McDowall R. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies: sponsored by the american association of pharmaceutical chemists, US food and drug administration, federation internationale pharmaceutique, health protection branch (Canada) and association of official analytical chemists. *Int J Pharm*, 1992, 82:1-7.
60. Görög S. Drug safety, drug quality, drug analysis. *JPBA*, 2008, 48:247-253.
61. Buick A, Doig M, Jeal S, Land G, McDowall R. Method validation in the bioanalytical laboratory. *JPBA*, 1990, 8: 629-637.
62. Huber L. Validation of analytical methods. *Agilent technologies*, 2010: 13-28.
63. Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste B, Massart D. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *JPBA*, 2001, 24:723-753.
64. Matuszewski B, Constanzer M, Chavez-Eng C. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem*, 2003, 75:3019-3030.
65. Sajid M, Zaheer A, Muhammad A, Sonia H, Abrar H, Naresh K. Method Development and Validation for the Estimation of Anthelmintic Drug (Albendazole) in Tablet Preparations. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2015, 48:284-287.
66. Yaman ME. Anti-Hipertansif Bir İlaç Olan Losartan Potasyumun Farmasötik

Preparatlarda ve Tavşan Plazmasında Biyoanalitik YöntemValidasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2012.



EKLER

EK 1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Elif KESMEN ÖZ Doğum tarihi: 19.05.1980 Doğum Yeri: Erzurum Medeni Hali: Evli, 2 çocuk Uyruğu: T.C. Adres: Adli Tıp Kurumu Erzurum Grup Başkanlığı Yenişehir Girişi Yenişehir Karakolu Altı Palandöken/Erzurum Tel: 05064067027 Faks: E-mail: elif.oz@atauni.edu.tr
Eğitim
Lise: Oltu İmam Hatip Lisesi (1998) Lisans: Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü (1998- 2002) Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı (2003-2006) Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta Derece (ÜDS 66.250, Ekim 2009) Almanca: Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-53
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

04.06.2013
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 30.05.2013 tarih ve 93722986.03/399 sayılı yazı.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığının Analitik Kimya Anabilim Dalı Laboratuvarında yürütülecek olan "Albendazol'un Biyolojik Ortamlarda Miktar Tayini İçin Farklı Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Geçerlilik Testlerinin Yapılması : Tavşanlara Uygulanması ve Farmakokinetik Parametrelerin Belirlenmesi" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 31.05.2013 tarih ve 1 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 54 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.


Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan Vekili

Toplantı Tarihi : 31.05.2013

Toplantı Sayısı : 1

KARAR NO : 54- Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı, Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığının Analitik Kimya Anabilim Dalı Laboratuvarında yürütülecek olan "Albendazol'un Biyolojik Ortamlarda Miktar Tayini İçin Farklı Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Geçerlilik Testlerinin Yapılması : Tavşanlara Uygulanması ve Farmakokinetik Parametrelerin Belirlenmesi" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Eczacılık Fakültesi Dekanlığının 30.05.2013 tarih ve 93722986.03/399 sayılı yazısı ile aktarıldığı görülmüştür.

Yapılan görüşmelerden sonra adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-236 08 80 **Fax** : 0-442-236 08 81 **e-mail**: hadyek@atauni.edu.tr