



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

**DOKTORA
TEZİ**

**BAZI ASİDİK VE BAZIK DOPİNG MADDELERİNİN AT İDRARINDAN
ANALİZİ İÇİN DİSPERSİF SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYON VE
SIVI KROMATOĞRAFİSİ-TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRİSİ
(LC-MS/MS) YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

TENZİLE ZİLHAN ÇABUK

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2018



**BAZI ASİDİK VE BAZIK DOPİNG MADDELERİNİN AT İDRARINDAN
ANALİZİ İÇİN DİSPERSİF SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYON VE SIVI
KROMATOĞRAFİSİ-TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (LC-MS/MS)
YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

Tenzile Zilhan ÇABUK

**DOKTORA TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2018

Tenzile Zilhan ÇABUK tarafından hazırlanan “Bazı asidik ve bazik doping maddelerinin at idrarından analizi için dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon ve sıvı kromatografisi -tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi geliştirilmesi ve validasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER Analitik Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan : Prof. Dr. Sedef KIR, Analitik Kimya, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Bengi USLU, Analitik Kimya, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Hasan BASAN, Analitik Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Uğur TAMER, Analitik Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 19.06.2018

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Tenzile Zilhan ÇABUK

19/06/2018

BAZI ASİDİK VE BAZİK DOPİNG MADDELERİNİN AT İDRARINDAN ANALİZİ
İÇİN DISPERSİF SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYON VE SIVI KROMATOĞRAFİSİ-
TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (LC-MS/MS) YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ
VE VALİDASYONU
(Doktora Tezi)

Tenzile Zilhan ÇABUK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2018

ÖZET

Bazı asidik ve bazik doping maddelerinin (*Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit*) at idrarından eşzamanlı tayini için dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon ve sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrenin birlikte kullanıldığı yeni, etkili, hızlı ve alternatif bir yöntem geliştirilmiş, optimize edilmiş ve yöntemin validasyonu yapılmıştır. Mobil fazların distile su - %0,1 formik asit ve metanol - %0,1 formik asit olduğu ve gradient akışın kullanıldığı sistemde, C18 (150x3 mm; 3,5 µm; 80 Å) Zorbax SB kolonu ile ters-faz kromatografik ayırım gerçekleştirilmiştir. At idrarı numuneleri MRM (Multiple Reaction Monitoring) yöntemiyle, *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* için pozitif iyon modunda ve *Flufenamik asit* için negatif iyon modunda analiz edilmiştir. En iyi sonuçlar; fragmentör voltajı olarak *İzoksuprin* ve *Klorpromazin* için 110 V, *Prokain* ve *Niketamid* için 80 V ve *Flufenamik asit* için 100 V kullanılmasıyla elde edilmiştir. Optimum dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon koşulları altında at idrarı numunelerinin pH'sı 6,0'ya ayarlanmıştır. 900,0 µL asetonitril, %20 oranında sodyum klorür ve ekstraksiyon çözücüsü olarak 80,0 µL kloroform kullanılmıştır. LOD değerleri *Prokain* için 0,07 ng/mL, *İzoksuprin* için 0,06 ng/mL, *Niketamid* için 0,08 ng/mL, *Klorpromazin* için 0,09 ng/mL ve *Flufenamik asit* için 0,075 ng/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin validasyon parametrelerinin değerlendirilmesi sonucunda yöntemin seçici, duyarlı, doğru, tekrarlanabilir ve sağlam olduğu görülmüştür. Yöntemin validasyonundan sonra ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır. Yöntem daha sonra *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* içeren at idrarı numunelerine uygulanmıştır.

Bilim Kodu : 10103

Anahtar Kelimeler : Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon, *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin*, *Flufenamik asit*, At İdrarı, LC-MS/MS

Sayfa Adedi : 99

Danışman : Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A DISPERSIVE LIQUID-LIQUID
MICROEXTRACTION AND A LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS
SPECTROMETRY (LC-MS/MS) METHOD FOR DETERMINATION OF SOME
ACIDIC AND BASIC DOPING SUBSTANCES IN HORSE URINE

(Ph. D. Thesis)

Tenzile Zilhan ÇABUK

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

June 2018

ABSTRACT

A new, efficient, quick and alternative method has been developed, optimized and validated for the simultaneous determination of some acidic and basic doping substances (*Procaine*, *Isoxsuprine*, *Nikethamide*, *Chlorpromazine* and *Flufenamic acid*) in horse urine by dispersive liquid-liquid microextraction in combination with high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The reversed-phase chromatographic separation was obtained with a column Zorbax SB-C18 extended (150x3 mm; 3,5 µm; 80 Å) in gradient elution mode using distilled water-0.1% formic acid (v/v) and methanol-0.1% formic acid (v/v). Horse urine samples were analyzed by the multiple reaction monitoring (MRM) in the positive ion mode for *Procaine*, *Isoxsuprine*, *Nikethamide*, *Chlorpromazine* and negative ion mode for *Flufenamic acid*. Best results were obtained by use of 110 V for *Isoxsuprine* and *Chlorpromazine*, 80 V for *Procaine* and *Nikethamide*, 100 V for *Flufenamic acid* as fragmentor voltage. Under optimum dispersive liquid-liquid microextraction conditions, pH of the horse urine samples was adjusted 6. Acetonitrile (900.0 µL) and sodium chloride (20%) were added. Chloroform (80.0 µL) was used as extraction solvent. LOD values were found as 0.07 ng/mL for *Procaine*, 0.06 ng/mL for *Isoxsuprine*, 0.08 ng/mL for *Nikethamide*, 0.093 ng/mL for *Chlorpromazine* and 0.075 ng/mL for *Flufenamic acid*. After the evaluation of validation parameters for developed method, it was concluded that the method was selective, sensitive, precise, accurate and robust. Measurement uncertainty was calculated after validation of the method. Then the method was applied to the horse urine samples that was determined to contain *Procaine*, *Isoxsuprine*, *Nikethamide*, *Chlorpromazine* and *Flufenamic acid*.

Science Code : 10103

Key Words : Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, *Procaine*, *Isoxsuprine*, *Nikethamide*, *Chlorpromazine*, *Flufenamic acid*, Horse Urine, LC-MS/MS

Page Number : 99

Advisor : Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

TEŞEKKÜR

Doktora tezimi planlayan ve yöneten, çalışmalarım süresince akademik tecrübesini, bilgisini ve desteğini hiç esirgemeyen, hoşgörü ve anlayışla her konuda yanımda olan değerli tez hocam *Prof. Dr. Nilgün Günden GÖĞER*'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmalarım esnasında bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım *Prof. Dr. Sedef KIR* ve *Prof. Dr. Hasan BASAN*'a,

Çalışmalarım süresince destekleriyle beni yalnız bırakmayan başta değerli arkadaşlarım *Kimyager Ekrem ERDOĞAN* ve *Veteriner Hekim Gülay DUDAKLI* olmak üzere, Doping Kontrol Laboratuvarı Şefi *Uzman Veteriner Hekim Erdal TURHAN*'a ve tüm Doping Kontrol Laboratuvarı çalışanlarına,

Her zaman yanımda olan, yardım ve desteği ile bana güven veren çok sevgili dostum *Fatma VARGÜN*'e,

Her şeyden çok sevdiğim kardeşlerim *Tülin ERDEM*'e, *Kadir ERDEM*'e ve benim neşe kaynağım yeğenim *Kerem ERDEM*'e,

Beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olan, sevildiğimi her zaman hissettiren ve çok sevdiğim canım annem *Ayten YURDAGÜL* ve canım babam *Ekrem YURDAGÜL*'e,

Her konuda bana sonuna kadar inanan, iyi günde ve kötü günde hep yanımda olan ve her durumda bana destek veren sevgili eşim *Bayram ÇABUK*'a ve varlığıyla hayatımı anlamlandıran biricik oğlum *Eren ÇABUK*'a

En içten teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. At Yarışlarında Doping Kullanımı ve Tarihçesi	3
2.2. Doping İçin Kullanılan Maddelerin Sınıflandırılması.....	3
2.2.1. Eşik değeri olan maddeler	3
2.2.2. Tarama değeri olan maddeler	5
2.2.3. Yasak(lı) maddeler	6
2.3. Türkiye’de Yarış Atlarında Son 5 Yıldaki Doping Kullanımı.	6
2.4. Dünya’da Yarış Atlarında Son Yıllardaki <i>Prokain</i> , <i>İzoksuprin</i> , <i>Niketamid</i> , <i>Klorpromazin</i> ve <i>Flufenamik Asit</i> Kullanımı	9
2.5. <i>Prokain</i>	9
2.5.1. <i>Prokain</i> ’in fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	9
2.5.2. <i>Prokain</i> ’in farmakolojik özellikleri	9
2.5.3. <i>Prokain</i> ’in veteriner hekimlikte ve yarış hayvanlarında doping amaçlı kullanımı	10
2.5.4. <i>Prokain</i> içeren müstahzarlar.....	11
2.6. <i>İzoksuprin</i>	12

	Sayfa
2.6.1. <i>İzoksuprin</i> 'in fiziksel ve kimyasal özellikleri	12
2.6.2. <i>İzoksuprin</i> 'in farmakolojik özellikleri.....	12
2.6.3. <i>İzoksuprin</i> 'in veteriner hekimlikte ve yarış hayvanlarında doping amaçlı kullanımı	13
2.6.4. <i>İzoksuprin</i> içeren müstahzarlar	13
2.7. <i>Niketamid</i>	13
2.7.1. <i>Niketamid</i> 'in fiziksel ve kimyasal özellikleri	13
2.7.2. <i>Niketamid</i> 'in farmakolojik özellikleri	14
2.7.3. <i>Niketamid</i> 'in veteriner hekimlikte ve yarış hayvanlarında doping amaçlı kullanımı	14
2.7.4. <i>Niketamid</i> içeren müstahzarlar	15
2.8. <i>Klorpromazin</i>	15
2.8.1. <i>Klorpromazin</i> 'in fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	15
2.8.2. <i>Klorpromazin</i> 'in farmakolojik özellikleri	16
2.8.3. <i>Klorpromazin</i> 'in veteriner hekimlikte ve yarış hayvanlarında doping amaçlı kullanımı	17
2.8.4. <i>Klorpromazin</i> içeren müstahzarlar.....	18
2.9. <i>Flufenamik Asit</i>	18
2.9.1. <i>Flufenamik asit</i> 'in fiziksel ve kimyasal özellikleri	18
2.9.2. <i>Flufenamik asit</i> 'in farmakolojik özellikleri	19
2.9.3. <i>Flufenamik asit</i> 'in veteriner hekimlikte ve yarış hayvanlarında doping amaçlı kullanımı	19
2.9.4. <i>Flufenamik asit</i> içeren müstahzarlar	19
2.10. Analiz Yöntemleri.	20
2.10.1. <i>Prokain</i>	20
2.10.2. <i>İzoksuprin</i>	21

	Sayfa
2.10.3. <i>Niketamid</i>	22
2.10.4. <i>Klorpromazin</i>	23
2.10.5. <i>Flufenamik asit</i>	24
2.11. Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (LPME).	25
2.11.1. Tek damla mikroekstraksiyon (SDME)	25
2.11.2. Oyuk fiber mikroekstraksiyon (Hollow Fiber Microextraction)	28
2.11.3. Doğrudan askıda damlacık mikroekstraksiyon (DSDME)	28
2.11.4. Katı damla mikroekstraksiyon (SD-LPME).....	28
2.11.5. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME).....	29
2.12. Sıvı Kromatografi -Tandem Kütle Spektrometri (LC-MS/MS).....	31
2.12.1. Sıvı kromatografi	32
2.12.2. Kütle spektrometri-ara yüz (İyonlaşma kaynağı)	33
2.12.3. Tandem kütle spektrometri (MS/MS).....	34
2.12.4. Kütle spektrometri tarama yöntemleri	35
2.13. Analitik Yöntem Validasyonu ve Validasyon Parametreleri	36
2.13.1. Seçicilik.....	37
2.13.2. LOD ve LOQ	37
2.13.3. Ölçüm aralığı ve doğrusallık	37
2.13.4. Doğruluk (geri kazanım).....	38
2.13.5. Kesinlik.....	39
2.13.6. Sağlamlık	40
2.13.7. Ölçüm belirsizliği	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Gereç.....	41

	Sayfa
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	41
3.1.2. Kullanılan cihazlar	42
3.2. Yöntem	43
3.2.1. LC-MS/MS optimizasyon çalışmaları	43
3.2.2. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon	46
4. BULGULAR	49
4.1. Yöntem Geliştirme	49
4.1.1. pH optimizasyonu.....	49
4.1.2. Dispersif çözücü (asetonitril) hacmi optimizasyonu.....	50
4.1.3. %NaCl (m/v[asetonitril hacmi]) optimizasyonu.....	51
4.1.4. Ekstraksiyon çözücüsü optimizasyonu.....	51
4.1.5. Ekstraksiyon çözücüsü (kloroform) hacmi optimizasyonu	52
4.1.6. Distile su hacmi optimizasyonu.....	53
4.1.7. Santrifüj süresi optimizasyonu	54
4.2. Validasyon ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplamaları	56
4.2.1. Seçicilik	56
4.2.2. LOD ve LOQ	57
4.2.3. Ölçüm aralığı ve doğrusallık	59
4.2.4. Doğruluk (geri kazanım)	66
4.2.5. Kesinlik (tekrarlanabilirlik-tekrar üretilebilirlik)	69
4.2.6. Sağlamlık.....	74
4.2.7. Ölçüm belirsizliği hesaplamaları	77
4.3. Geliştirilen Yöntemin Dopingli Atların İdrar Numunelerine Uygulanması.....	79
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	81

	Sayfa
5.1. LC-MS/MS Yöntemi Optimizasyonu	82
5.2. Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Optimizasyonu.....	83
5.3. Yöntemin Validasyonu	83
5.4. Yöntemin Dopingli Atların İdrar Numunelerine Uygulanması	87
5.5. Geliştirilen Yöntemin Üstünlükleri	87
5.6. Öneriler	88
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	99

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Doping maddelerinin, atların idrar ve/veya kanındaki eşik değerleri	4
Çizelge 2.2. Gıda bulaşanlarının atların idrar ve/veya kanındaki kalıntı limitleri	4
Çizelge 2.3. Doping maddelerinin, atların idrar ve/veya kanındaki uluslararası tarama limitleri.....	5
Çizelge 2.4. Ülkemizde yarış atlarında son 5 yılda kullanılan doping maddeleri	7
Çizelge 2.5. Sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemleri	25
Çizelge 3.1. Optimizasyon sonucu elde edilen MS/M parametreleri	43
Çizelge 3.2. Gradient akış	44
Çizelge 3.3. LC-MS/MS analiz parametreleri	44
Çizelge 4.1. <i>Prokain</i> 'in LOD ve LOQ değerleri.....	57
Çizelge 4.2. <i>İzoksuprin</i> 'in LOD ve LOQ değerleri	57
Çizelge 4.3. <i>Niketamid</i> 'in LOD ve LOQ değerleri	58
Çizelge 4.4. <i>Klorpromazin</i> 'in LOD ve LOQ değerleri	58
Çizelge 4.5. <i>Flufenamik asit</i> 'in LOD ve LOQ değerleri.....	58
Çizelge 4.6. <i>Prokain</i> 'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel verileri	60
Çizelge 4.7. <i>İzoksuprin</i> 'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel verileri	61
Çizelge 4.8. <i>Niketamid</i> 'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel verileri	62
Çizelge 4.9. <i>Klorpromazin</i> 'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel verileri.....	63
Çizelge 4.10. <i>Flufenamik asit</i> 'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel verileri	64
Çizelge 4.11. <i>Prokain</i> 'e ait geri kazanım verileri	67
Çizelge 4.12. <i>İzoksuprin</i> 'e ait geri kazanım verileri.....	67
Çizelge 4.13. <i>Niketamid</i> 'e ait geri kazanım verileri.....	68
Çizelge 4.14. <i>Klorpromazin</i> 'e ait geri kazanım verileri.....	68

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.15. <i>Flufenamik asit</i> 'e ait geri kazanım verileri	69
Çizelge 4.16. Tekrarlanabilirlik parametresine ait %RSD değerleri	69
Çizelge 4.17. <i>Prokain</i> 'e ait tekrar üretilebilirlik verileri	70
Çizelge 4.18. <i>İzoksuprin</i> 'e ait tekrar üretilebilirlik verileri	71
Çizelge 4.19. <i>Niketamid</i> 'e ait tekrar üretilebilirlik verileri	72
Çizelge 4.20. <i>Klorpromazin</i> 'e ait tekrar üretilebilirlik verileri	73
Çizelge 4.21. <i>Flufenamik asit</i> 'e ait tekrar üretilebilirlik verileri	74
Çizelge 4.22. <i>Prokain</i> 'e ait sağlamlık verileri	75
Çizelge 4.23. <i>İzoksuprin</i> 'e ait sağlamlık verileri	75
Çizelge 4.24. <i>Niketamid</i> 'e ait sağlamlık verileri	76
Çizelge 4.25. <i>Klorpromazin</i> 'e ait sağlamlık verileri	76
Çizelge 4.26. <i>Flufenamik asit</i> 'e ait sağlamlık verileri	77
Çizelge 4.27. <i>Prokain</i> 'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları	77
Çizelge 4.28. <i>İzoksuprin</i> 'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları	78
Çizelge 4.29. <i>Niketamid</i> 'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları	78
Çizelge 4.30. <i>Klorpromazin</i> 'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları	78
Çizelge 4.31. <i>Flufenamik asit</i> 'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları	79
Çizelge 5.1. Çeşitli yöntemlerin kullanıldığı çalışmaların karşılaştırılması	84

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Prokain</i> 'in kimyasal yapısı	9
Şekil 2.2. <i>İzoksuprin</i> 'in kimyasal yapısı	12
Şekil 2.3. <i>Niketamid</i> 'in kimyasal yapısı	14
Şekil 2.4. <i>Klorpromazin</i> 'in kimyasal yapısı	16
Şekil 2.5. <i>Flufenamik asit</i> 'in kimyasal yapısı	18
Şekil 2.6. Doğrudan daldırma (DI-SDME) yönteminin şematik gösterimi	26
Şekil 2.7. Tepe boşluklu mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi	27
Şekil 2.8. Katılaştırılmış yüzen organik damla (SFODME) yönteminin temel basamakları	29
Şekil 2.9. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon	30
Şekil 2.10. LC-MS/MS sistemi	32
Şekil 2.11. Ters faz sıvı kromatografinin şematik gösterimi	33
Şekil 2.12. Kuadropolün yapısı	35
Şekil 2.13. MRM yönteminin seçiciliği	36
Şekil 3.1. Gradient akışın analitlerin ayırımına etkisi	45
Şekil 3.2. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon prosedürü	47
Şekil 4.1. pH değerinin analitlerin pik alanlarına etkisi	49
Şekil 4.2. Asetonitril hacminin analitlerin pik alanlarına etkisi	50
Şekil 4.3. %NaCl miktarının analitlerin pik alanlarına etkisi	51
Şekil 4.4. Organik çözücülerin analitlerin pik alanlarına etkisi	52
Şekil 4.5. Kloroform hacminin analitlerin pik alanlarına etkisi	53
Şekil 4.6. Distile su hacminin analitlerin pik alanlarına etkisi	54
Şekil 4.7. Analitlerin fragmentlerine ait pikler	55

Şekil	Sayfa
Şekil 4.8. Boş at idrarı ve 5,0 ng/mL spike yapılmış at idrarına ait kromatogramlar.....	56
Şekil 4.9. <i>Prokain</i> 'in kalibrasyon eğrisi	60
Şekil 4.10. <i>Prokain</i> 'in yöntem doğrusalığının kontrol grafiği.....	60
Şekil 4.11. <i>İzoksuprin</i> 'in kalibrasyon eğrisi	61
Şekil 4.12. <i>İzoksuprin</i> 'in yöntem doğrusalığının kontrol grafiği.....	61
Şekil 4.13. <i>Niketamid</i> 'in kalibrasyon eğrisi.....	62
Şekil 4.14. <i>Niketamid</i> 'in yöntem doğrusalığının kontrol grafiği	62
Şekil 4.15. <i>Klorpromazin</i> 'in kalibrasyon eğrisi.....	63
Şekil 4.16. <i>Klorpromazin</i> 'in yöntem doğrusalığının kontrol grafiği	63
Şekil 4.17. <i>Flufenamik asit</i> 'in kalibrasyon eğrisi	64
Şekil 4.18. <i>Flufenamik asit</i> 'in yöntem doğrusalığının kontrol grafiği	64
Şekil 4.19. 1,0 ng/mL düzeyindeki spike idrar numunesinde <i>Prokain</i> 'in MRM'lerine ait pikler.....	65
Şekil 4.20. 1,0 ng/mL düzeyindeki spike idrar numunesinde <i>İzoksuprin</i> 'in MRM'lerine ait pikler.....	65
Şekil 4.21. 1,0 ng/mL düzeyindeki spike idrar numunesinde <i>Niketamid</i> 'in MRM'lerine ait pikler.....	65
Şekil 4.22. 1,0 ng/mL düzeyindeki spike idrar numunesinde <i>Klorpromazin</i> 'in MRM'lerine ait pikler.	66
Şekil 4.23. 1,0 ng/mL düzeyindeki spike idrar numunesinde <i>Flufenamik asit</i> 'in MRM'lerine ait pikler.	66
Şekil 4.24. <i>Prokain</i> yönünden pozitif idrar numunesine ait kromatogram.....	79
Şekil 4.25. <i>Niketamid</i> yönünden pozitif idrar numunesine ait kromatogram	80
Şekil 4.26. <i>Klorpromazin</i> yönünden pozitif idrar numunesine ait kromatogram	80
Şekil 4.27. <i>Flufenamik asit</i> yönünden pozitif idrar numunesine ait kromatogram.....	80

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

µg	Mikrogram
mL	Mililitre
mmol	Milimol
ng	Nanogram

Kısaltmalar

Açıklamalar

CE	Kapiler Elektroforez
CE-ED	Kapiler Elektroforez-Elektrokimyasal Dedektör
DLLME	Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HRLC	Yüksek Çözünürlüklü Sıvı Kromatografisi
HRMS	Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometrisi
LC	Sıvı Kromatografisi
MS/MS	Tandem Kütle Spektrometrisi
TOF-MS(Q/TOF-MS)	Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi
LLE	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon
MS	Kütle Spektrometrisi
MSTFA	N-metil-N- trimetilsililtriflorasetamid
PABA	Para-aminobenzoik Asit
SERS	Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi
SPE	Katı Faz Ekstraksiyon
TDLLME	Tandem Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon
UPLC	Ultra Performans Sıvı Kromatografisi

Kısaltmalar**Açıklamalar****LOD**

Tespit Limiti (Limit of Detection)

LOQ

Tayin Alt Limiti (Limit of Quantification)

1. GİRİŞ

Doping, bir canlının sürat, kuvvet ve cesaretini veya bunlardan birini veya tümünü değiştirmek amacıyla, normal gıdalar dışında herhangi bir madde verilmesini ifade eder [1]. Yarış atlarındaki doping girişimleri; yarışacak bir atın yarıştaki performansının artırılması ya da çok seyrek olarak azaltılması yönündedir. Doping olarak kullanılan veya kullanılma ihtimali olan maddeler; eşik değeri olanlar, tarama değeri olanlar ve yasak(lı) maddeler olarak 3 gruba ayrılabilir. Eşik değeri olan maddeler, hayvanın vücudunda doğal olarak bulunmaları ve yemle dışarıdan alınmaları sebebiyle zorunlu olarak idrar veya kanda belli bir miktara kadar bulunmasına izin verilen maddeleri kapsar. Tarama değeri olan maddeler, tedavi amacıyla kullanılan ve idrar veya kanda belli miktarda bulunmasına izin verilen maddeleri kapsar. Yasak(lı) maddeler ise, yarış hayvanlarında, her ne sebeple olursa olsun, kullanılmaması gereken maddelerdir ve idrar, kan gibi doping şüpheli numunelerde, bu maddeler için “Sıfır Tolerans” söz konusudur [2]. Bu nedenle bu maddelerin çok duyarlı ve doğru bir şekilde oldukça düşük derişimlerde dahi tespit edilebilmeleri büyük önem arz etmektedir.

DLLME, sulu matrikslerden organik analitlerin zenginleştirilmesi amacıyla uygulanan ve işlem kolaylığı, düşük maliyet, yüksek geri kazanım, yüksek zenginleştirme faktörü, organik çözücülerin az kullanımı gibi üstünlükleri nedeniyle yararlı bir numune hazırlama yöntemidir. Ortaya çıkışından bu yana DLLME, pek çok organik ve inorganik bileşiğin çeşitli matrikslerden ekstraksiyonu için uygulanmıştır.

At yarışlarında doping kontrol testleri için, at idrarı, daha büyük hacimlerde elde edilebileceğinden ve idrardaki ilaçların ve metabolitlerinin derişimleri kandakilere göre daha yüksek olacağından tercih edilen matriks idrardır [3]. At idrarının karmaşık bir matriks olması nedeniyle, cihazla analizi yapılmadan önce sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) ve katı faz ekstraksiyon (SPE) gibi yöntemler kullanılır. Ancak bu gibi ekstraksiyon yöntemleri; zahmetli ve zaman alıcıdır ve zamanın kritik olduğu durumlarda pek tercih edilen yöntemler değildirler [4]. Bu nedenle doping maddelerinin at idrarından tayini için duyarlı, maliyeti düşük, basit ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Uluslararası At Yarışı Otoriteleri Federasyonu'na (International Federation of Horseracing Authorities, IFHA) göre, yasak(lı) maddeler, hayvanın genellikle merkezi sinir sistemini, kalp-damar sistemini ve solunum sistemini etkiler veya davranışlarını değiştirir; bu maddelerin başlıcaları psikotropolar (nöroleptikler, trankilizanlar gibi), uyarıcılar, lokal anestezikler, ağrı kesiciler, anabolik steroidler gibi gruplarda yer alırlar [5]. *Prokain* (Lokal anestezik), *İzoksuprin* (Vazodilatör), *Niketamid* (Analeptik-Stimulan), *Klorpromazin* (Nöroleptik) ve *Flufenamik Asit* (Non-steroidal anti-inflamatuar) son 5 yılda Türkiye'de ve Dünya'da yaygın olarak kullanılan, atlarda her biri farklı etki mekanizmasına sahip, yasak(lı) maddeler grubunda yer alan asidik ve bazik özellikteki doping maddeleridir.

Bu çalışmada bu 5 doping maddesinin analiz edildiği mevcut katı faz ekstraksiyon (SPE) ve sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) yöntemlerine [6] alternatif olarak, mevcut yöntemlere göre üstünlükleri bulunan bir Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon ve Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi geliştirilmiş, optimum parametreler araştırılmış ve tespit edilmiştir. Bu sayede yüksek duyarlılık, yüksek geri kazanım, ekstraksiyon için işlem kolaylığı, analizin kısa sürede sonuçlandırılması, analiz maliyetinin düşürülmesi ve organik çözücülerin hacminin azaltılması gibi üstünlükler hedeflenmiştir. Ayrıca yöntemin validasyonu yapılmış ve geliştirilen yöntem, bu maddelerin varlığı sonucu dopingli çıkan atların idrar numunelerinde, söz konusu maddelerin tayin edilmesinde kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. At Yarışlarında Doping Kullanımı ve Tarihçesi

Yarış atlarında doping ile ilgili ilk rapor İngiltere’de 1666 yılında yayınlanmıştır. Ondokuzuncu yüzyılın sonuna doğru Amerika’da at eğitimcileri ilk kez alkaloidleri kullanmışlardır; bundan kısa bir süre sonra, bu maddeler Avrupa ülkelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Kısa bir süre içinde de (1903), İngiltere ve Fransa’da dopinge mücadele için tedbirler ve kurumsal yapı gündeme gelmiştir. Yirminci yüzyılın başında tükürükte ilk kez alkaloidlerin analizi yapılmıştır. 1940-1950 yılları arasında amfetaminler ve psikotrop ilaçlar kullanılmaya başlanmıştır [2].

1947’de, Fransa, Meksika, Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri’nden bir grup yarış kimyacısı bir araya gelerek; Resmi Yarış Kimyacılar Birliği (AORC)’ni kurmuşlardır. 1958’lerden itibaren merkezi sinir sistemi uyarıcıları, solunum sistemi uyarıcıları, sedatifler, antihistaminikler, aspirin ve benzeri ağrı kesici ilaçlar doping olarak kullanılmaya başlanmıştır [7]. Bu dönem, aynı zamanda, özellikle kağıt ve ince tabaka kromatografi olmak üzere, analitik yöntemlerin doping analizlerinde kullanılmaya başlandığı yıllar olmuştur [8-9]. Bugün, ileri analiz cihazları ile doping için kullanılan maddelerin çok önemli bir kısmının analizi gerçekleştirilebilmektedir.

2.2. Doping İçin Kullanılan Maddelerin Sınıflandırılması

Doping olarak kullanılan veya kullanılma ihtimali olan maddeler 3 gruba ayrılır. Bunlar:

- 1) Eşik değeri olan maddeler,
- 2) Tarama değeri olan maddeler,
- 3) Yasak(lı) maddelerdir.

2.2.1. Eşik değeri olan maddeler

Hayvanın vücudunda doğal olarak var olan veya beslenmesinde kullanılan yemde, otlarda ve içilen sularda bulunan ya da yem ve yem hammaddelerinin üretilmesi, işlenmesi,

depolanması ve taşınması sırasında bulaşmadan kaynaklanan maddeler için “Eşik Değerleri” konulabilir [2]. Yetiştirme, Yarış ve Bahis Üzerine Uluslararası Anlaşma (The International Agreement on Breeding, Racing and Wagering) ’da 10 madde için eşik değeri belirlenmiş ve yayımlanmıştır (Çizelge 2.1.) [5]. Bu maddelerden 5’i endojen (boldenon, estranediol, hidrokortizon, karbondioksit, testosteron), 2’si kirletici (arsenik, kobalt) ve kalan 3’ü de (dimetil sülfoksit, metoksitiramin, salisilik asit) yem kaynaklıdır.

Çizelge 2.1. Doping maddelerinin, atların idrar ve/veya kanındaki eşik değerleri

Madde adı	Eşik değeri
Arsenik	0,3 µg/mL toplam arsenik (idrara)
Boldenon	0,015 µg/mL serbest halde ve sülfat formunda (idrara, erkek at)
Dimetil sülfoksit (DMSO)	15 µg/mL (idrara), 1 µg/mL (plazma)
Estranediol	0,045 µg/mL serbest halde ve 5α-estran-3β, 17α-diol glukuronid halinde (idrara, erkek at)
Hidrokortizon	1 µg/mL (idrara)
Karbondioksit	36 mmol/L (plazma)
Kobalt	0,1 µg/mL (idrara)
Metoksitiramin	4 µg/mL serbest halde ve 3-metoksitiramin halinde (idrara)
Salisilik asit	750 µg/mL (idrara) 6,5 µg/mL (plazma)
Testosteron	0,02 µg/mL serbest halde ve testosteron sülfat halinde (idrara, iğdiş at) 0,1 ng/mL serbest halde (plazma, iğdiş at) 0,055 µg/mL serbest halde ve testosteron sülfat halinde (idrara, dişi tay ve kısarak)

Ayrıca aynı anlaşmada, kanda 1 madde, idrarda ise 9 madde için uluslararası kalıntı limitleri belirtilmiştir (Çizelge 2.2.) [10]. Eşik değeri kuralı, bu maddelerden herhangi birisinin idrar ve/veya plazmada belirtilen eşik değere kadar bulunabileceğini ve bu miktarları aştığında doping-pozitif olduğunu gösterir.

Çizelge 2.2. Gıda bulaşanlarının atların idrar ve/veya kanındaki kalıntı limitleri

Madde adı	İdrarda kalıntı limiti	Kanda kalıntı limiti
Kafein	50 ng/mL	-
Teofilin	250 ng/mL	-
Atropin	60 ng/mL	-
Skopolamin	60 ng/mL	-
Morfin (toplam)	30 ng/mL	-
Bufotenin	10 ng/mL	-
Dimetiltriptamin	10 ng/mL	-
Hordenin	80 ng/mL	-
Teobromin	2 µg/mL	0,3 µg/mL

2.2.2. Tarama değeri olan maddeler

Atlarda, tedavi amacıyla sık kullanılan bazı ilaçlar için, idrar ve/veya kanda, eşik değerine benzer şekilde, “Uluslararası Tarama Limitleri” belirlenmiştir ve Yetiştirme, Yarış ve Bahis Üzerine Uluslararası Anlaşma’da yayımlanmıştır (Çizelge 2.3.) [11-12].

Çizelge 2.3. Doping maddelerinin, atların idrar ve/veya kanındaki uluslararası tarama limitleri

Madde adı	İdrarda kalıntı limiti (ng/mL)	Kanda kalıntı limiti (ng/mL)
Asepromazin	10,0	0,02
Betametazon	0,2	-
Bromeksin	200,0	-
Butorfanol	1,0	0,01
Karprofen	100,0	100,0
Klenbuterol	0,1	-
Dantrolen	1,0	-
Dembreksin	100,0	5,0
Detomidin	2,0	0,02
Deksametazon	0,2	-
Diklofenak	50,0	-
Dipiron	1000,0	-
Eltenak	50,0	-
Fluniksin	100,0	1,0
Furosemid	50,0	0,1
İpratropiyum	0,25	-
Ketoprofen	100,0	-
Lidokain	10,0	0,05
Meklofenomik asit	250,0	5,0
Medetomidin	5,0	0,02
Meloksikam	10,0	1,0
Mepivakain	10,0	0,05
Naproksen	250,0	-
N-Butilskopolamonyum	25,0	0,05
Omeprazol	0,5	-
Fenilbutazon	100,0	100,0
Romifidin	1,0	-
Salbutamol	0,5	-
Triamsinolon asetonid	0,5	-
Vedaprofen	50,0	-

2.2.3. Yasak(lı) maddeler

Bu gruba giren maddeler yarış öncesinde ve yarış sırasında her ne sebeple olursa olsun kullanılmaması gereken maddelerdir. Yetiştirme, Yarış ve Bahis ile İlgili Uluslararası Anlaşma'da bu maddeler aşağıdaki gibi gruplandırılmıştır [5]:

- Vücuttaki sistemlerden birisine veya birçoğuna (kalp-damar sistemi, dolaşım sistemi, kas-iskelet sistemi, sindirim sistemi, sinir sistemi, solunum sistemi, üreme sistemi, üriner sistem, endokrin sistemi, bağışıklık sistemi) etkiyen maddeler,
- Endokrin salgıları ve onların sentetik çeşitleri,
- Maskeleyici ajanlar (ağrı kesiciler, antihistaminikler, idrar söktürücüler, kas gevşeticiler vb.),
- Oksijen taşıyıcılar,
- Genetik yapıyı doğrudan veya dolaylı etkileyen maddeler.

Bu maddeler için “Sıfır Tolerans” söz konusudur. “Sıfır Tolerans” ifadesiyle numunelerde hiçbir seviyede doping maddesi bulunmaması gerektiği ifade edilmektedir. Yasak(lı) madde bulgusu; maddenin kendisini, metabolitini, izomerini, metabolit izomerini ifade eder; yasak(lı) bir maddenin verildiği veya maruz kalındığı ile ilgili bilimsel bir veri de maddenin bulunduğu (yani, doping yapıldığı) anlamına gelir [2].

2.3. Türkiye’de Yarış Atlarında Son 5 Yıldaki Doping Kullanımı

Türkiye’de yarış atlarında doping kontrolü Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’na bağlı Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü’nde bulunan Doping Kontrol Laboratuvarı ile Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü’nde bulunan Doping Kontrol Laboratuvarı tarafından yapılmaktadır. Bu laboratuvarlardan elde edilen verilere göre ülkemizde yarış atlarında son 5 yılda kullanılan doping maddeleri Çizelge 2.4.’de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Ülkemizde yarış atlarında son 5 yılda kullanılan doping maddeleri

Madde adı	Tespit edildiği matriks	Son 5 yıldaki kullanım sıklığı
Arsenik	İdrar	22
Naproksen	İdrar	19
DMSO	İdrar	13
Dipiron (Metamizol)	İdrar	10
Kafein	İdrar	10
Betametazon	İdrar	7
Difilin	İdrar	6
Fluniksin	İdrar	6
Kobalt	İdrar	6
Metilprednizolon	İdrar	6
<i>Prokain</i>	İdrar	6
Dekzametazon	İdrar	5
Diklofenak	İdrar	5
Heptaminol	İdrar	5
<i>Flufenamik asit</i>	İdrar	4
Metenolon	İdrar	4
Ranitidin	İdrar	4
Fenilbutazon	İdrar	3
Metokarbamol	İdrar	3
Pemolin	İdrar	3
Etodolak	İdrar	2
Karbazokrom	İdrar	2
Midodrin	İdrar	2
Morfin	İdrar	2
OH-Lidokain	İdrar	2
Teofilin	İdrar	2
Testosteron	İdrar	2
Dipiron+Dekzametazon	İdrar	2
Dipiron+Difilin	İdrar	2
Dipiron+Fluniksin	İdrar	2
Dipiron+OH-Lidokain	İdrar	2
Kafein+Teofilin	İdrar	2
Pemolin+Tetramisol	İdrar	2
Kafein+ Teobromin+Teofilin	İdrar	2
Atropin	İdrar	1
Estranediol	İdrar	1
Etakrinik asit	İdrar	1
Etilefrin	İdrar	1
Feniramin	İdrar	1
Fluoksetin	İdrar	1
Furosemid	İdrar	1
Ketoprofen	İdrar	1
<i>Klorpromazin</i>	İdrar	1
Kokain	İdrar	1

Metaproterenol	İdrar	1
----------------	-------	---

Çizelge 2.4. (devam) Ülkemizde yarış atlarında son 5 yılda kullanılan doping maddeleri

Madde adı	Tespit edildiği matriks	Son 5 yıldaki kullanım sıklığı
Metoksitiramin	İdrar	1
N-Butilskopolamin	İdrar	1
Neostigmin	İdrar	1
<i>Niketamid</i>	İdrar	1
Oksifenbutazon	İdrar	1
Prednizolon	İdrar	1
Prilamin	İdrar	1
Prilokain	İdrar	1
Sildenafil	İdrar	1
Striknin	İdrar	1
Teobromin	İdrar	1
Amfetamin+Kafein	İdrar	1
Dekzametazon+Metilprednizolon	İdrar	1
Dipiron+Antipirin	İdrar	1
Dipiron+Diklofenak	İdrar	1
Dipiron+ Heptaminol	İdrar	1
<i>Flufenamik asit</i> +Difilin	İdrar	1
<i>Niketamid</i> +Tetramizol	İdrar	1
<i>Prokain</i> +Dipiron	İdrar	1
<i>Prokain</i> +Kafein	İdrar	1
<i>Prokain</i> +Norketamin	İdrar	1
<i>Prokain</i> +Ranitidine	İdrar	1
Promazin+DMSO	İdrar	1
Teofilin+Kafein	İdrar	1
Triamteren+Hidroklorotiyazid	İdrar	1
Ambroksol+Atropin+Kafein	İdrar	1
Dipiron+Fluniksin+Ranitidin	İdrar	1
Dipiron+Difilin+OH-Lidokain	İdrar	1
Dipiron+Ketoprofen+Atropin	İdrar	1
Dipiron+Fluniksin+Desmetil Prilamin	İdrar	1
<i>Flufenamik asit</i> +Metilamino+Antipirin	İdrar	1
<i>Flufenamik asit</i> + <i>Prokain</i> +Etofenamat	İdrar	1
<i>Niketamid</i> +Pemolin+Tetramizol	İdrar	1
<i>Prokain</i> +Fluniksin+Metokarbamol	İdrar	1
<i>Prokain</i> +Fluniksin+4-Hidroksi Ksilazin	İdrar	1
<i>Prokain</i> + Dipiron+Fluniksin+Desmetil Prilamin	İdrar	1
Teofilin+Kafein+Metenolon+Betametazon	İdrar	1
Tetramizol+Heptaminol+Dipiron+Fluniksin	İdrar	1
Dekzametazon	Kan	3
Teofilin	Kan	3
Betametazon	Kan	1
Ketoprofen	Kan	1
Tenoksikam	Kan	1

Kafein+Betametazon	Kan	1
Kafein+Dekzametazon	Kan	1

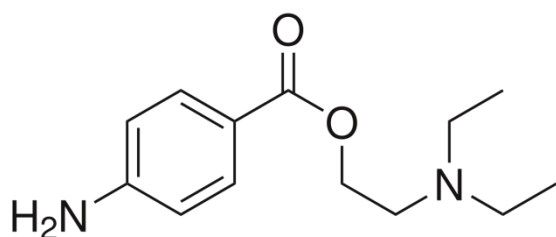
2.4. Dünya’da Yarış Atlarında Son Yıllardaki *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik Asit* Kullanımı

Uluslararası At Yarışları Federasyonu (International Federation of Horseracing Authorities, IFHA) tarafından, yarış atlarında doping analizi yapılan ülkelerde tespit edilen doping maddelerinin yer aldığı, ilgili doping maddelerinin hangi ülkeler tarafından ve kaç kez tespit edildiğini gösteren yıllık raporlar yayımlanmaktadır. 2013 yılından itibaren yayınlanmış olan raporlara göre; Türkiye dışındaki diğer ülkelerde *Prokain* 18 kez, *Prokain*+Klorfeniramin 1 kez, *Prokain*+Trimetoprim 1 kez, *İzoksuprin* 10 kez, *Niketamid* 10 kez ve *Klorpromazin* 1 kez kullanılmıştır [13-15].

2.5. *Prokain*

2.5.1. *Prokain*’in fiziksel ve kimyasal özellikleri

Kapalı formülü $C_{13}H_{20}N_2O_2$ olan *Prokain*’in kimyasal yapısı (2-Dietilaminoetil 4-aminobenzoat) Şekil 2.1’de verilmektedir [16].



Şekil 2.1. *Prokain*’in kimyasal yapısı

Molekül ağırlığı 236,315 g/mol olan *Prokain*’in çözeltileri dayanıklıdır. Sudaki iyi çözünürlüğünün yanı sıra, alkol, eter, benzen ve kloroform içerisinde kolayca çözünür. pKa’sı 9,24’dür [17-18].

2.5.2. *Prokain*’in farmakolojik özellikleri

Farmakolojik sınıflamada *Ester Yapılı Lokal Anestezikler* grubuna dahil olan *Prokain*, para-aminobenzoik asidin (PABA) dietilaminoetanol ile yaptığı esterdir. Hidroklorür tuzunun solüsyonu halinde kullanılır. *Prokain*, kokainin oluşturduğu doku hasarı üzerine yapılan araştırmalara dayalı olarak sentez edilen ve doku içerisine uygulanan ilk lokal anesteziktir. 1904’de Almanya’da Einhorn tarafından sentez edilmiş ve 1905’te Braun tarafından klinik kullanıma girerek tıpta modern lokal anestezi çağını başlatmıştır. Daha sonra bulunan diğer lokal anestezikler için karşılaştırma tabanı oluşturmuştur. Vücutta esterazlar tarafından PABA (para-aminobenzoik asit) ve dietilaminoetanole hidroliz edilir [18].

Prokain, lokal ve bölgesel anestezi için kullanılan kısa etki süreli ester tipi bir lokal anesteziktir. Yüzeysel topikal anestezik etki göstermez. Toksisitesi diğer lokal anestezikler için standart olarak kabul edilir. Ancak amid tipi lokal anesteziklere göre daha fazla aşırı duyarlık reaksiyonuna neden olur [16].

Ancak etki gücünün zayıf olması, etkisinin geç başlaması ve daha sık alerjik yan tesirler yapması nedenlerinden dolayı daha sonra çıkan amid türevi lokal anestezikler *Prokain*’in yerini almıştır. Bu nedenle, lokal infiltrasyon anestezisi dışında diğer anestezi şekillerinde pek kullanılmaz. İnfiltrasyon için adrenalin katılmış %0,25-0,5’lik solüsyonu kullanılır. *Prokain* kanda, plazma psödokolinesterazı ile eritrositlerin asetilkolinesterazı tarafından ve kısmen de karaciğerdeki esteraz tarafından çabuk bir şekilde hidroliz edilerek inaktive edilir [18].

2.5.3. *Prokain*’in veteriner hekimlikte ve yarış hayvanlarında doping amaçlı kullanımı

Etkisi

Prokain, hidroliz sonucu dietilaminoetanol ve PABA’ya ayrışır. Bunlardan dietilaminoetanolün bir ölçüde lokal anestezik etkisi vardır, PABA etkisizdir. Birlikte kullanılmaları halinde *Prokain* ve *Prokain* ihtiva eden maddeler (PABA’dan dolayı) sülfonamidlerin etkisini azaltırlar. PABA’nın %80 ve dietilaminoetanolün %30 kadarı değişmemiş veya birleşme ürünü halinde ve ilacın %2’si değişmemiş olarak idrarla atılır. İdrarın asitleştirilmesi *Prokain*’in atılmasını hızlandırır. İlacın atlarda plazma yarı ömrü 25 dakika civarındadır. *Prokain*’in etkisi çabuk ortaya çıkar ve kısa sürer; adrenalin katılmasıyla etki süresi 5-6 katı uzayabilir [19].

Kullanılması

Prokain tüm lokal anestezikler içinde veteriner hekimlikte en çok kullanılan ve en iyi sonuç veren ilaçtır. Hayvanlarda infiltrasyon, iletim ve epidural anestezi için çok kullanılır. *Prokain*, atlarda idrarla 18 gün süreyle atılır; bu süre 4-6 haftaya kadar uzayabilmektedir [2,19].

Yan etkileri

Yarış hayvanlarında lokal ağrıyı yatıştırıp, maskelemek ve böylece topallığı geçici bir süre hafifletmek veya gidermek için bile olsa *Prokain* ve aynı etki mekanizmasına sahip diğer maddelerin kullanılması uygun görülmemektedir. Zira, yarış öncesinde ve yarış esnasında ağrılı durum hafiflerken, buna sebep olan organik-yapısal bozukluk, yarışın gereği olarak aşırı zorlama sonucu, hayvanın ileriki yaşamında geri dönüşü olmayan bozukluklara kadar ilerleyebilmektedir.

Uygulandığı yerden sistematik dolaşıma geçen lokal anestezik madde, beyin kabuğunda baskıcı etkinliği önleyerek, merkezi sinir sistemini önce uyarıp, huzursuzluk ve korkuya, sonra aşırı uyarının bir sonucu olarak tükenmeye sebep olur. Kalp-damar sistemine yönelik önemli sayılabilecek istenmeyen etkileri (kalp kasının kasılabilirliği, uyarılabilirliği ve uyarının iletiminde azalma, arterlerde genişleme, kan basıncında düşme gibi), nöromusküler kavşaklardan uyarının geçişini engellemek gibi etkileri de vardır [2].

2.5.4. *Prokain* içeren müstahzarlar

Türkiye’de sadece aşağıdaki veteriner ürün müstahzarları mevcuttur:

Combiotic Enjeksiyonluk Süspansiyon:

Tedavi Grubu: Antibakteriyel-sistemik

Kullanıldığı Hayvanlar: Buzağı, Koyun, Köpek, Kuzu, Sığır

Formu: Süspansiyon

Uygulama Yolu: İntramusküler enjeksiyon

Ekopen La Enjeksiyonluk Süspansiyon:

Tedavi Grubu: Antibakteriyeller, sistemik

Kullanıldığı Hayvanlar: Koyun, Sığır

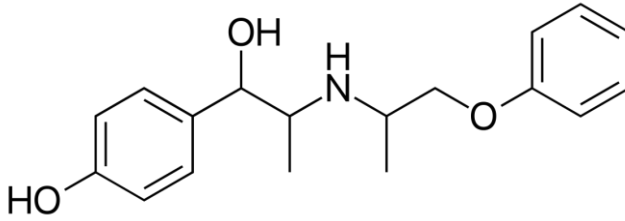
Formu: Süspansiyon

Uygulama Yolu: İntramusküler enjeksiyon [16].

2.6. *İzoksuprin*

2.6.1. *İzoksuprin*'in fiziksel ve kimyasal özellikleri

Hidroklorür tuzu şeklinde bulunur; beyaz renkte, kokusuz, acı, kristalize bir tozdur. Kapalı formülü $C_{18}H_{23}NO_3$ olan *İzoksuprin*'in kimyasal yapısı (2-(3-Fenoksi-2-propilamin)-1-(p-hidroksifenil) -1-propanol hidroklorür) Şekil 2.2.'de verilmektedir.



Şekil 2.2. *İzoksuprin*'in kimyasal yapısı

Molekül ağırlığı 301,386 g/mol olan *İzoksuprin*'in çözünürlüğü suda 1/500, etanol ve seyreltik sodyum hidroksit çözeltisinde 1/100 ve seyreltik hidroklorik asit içerisinde 1/2500'dür. Yapılan çalışmalarda, *İzoksuprin HCl* için 8,0 ve 9,8 olmak üzere iki farklı pKa değeri verilmiştir [19-20].

2.6.2. *İzoksuprin*'in farmakolojik özellikleri

Farmakolojik sınıflamada, periferik vazodilatörlerin 2-amino-1-feniletanol türevleri grubuna dahil olan *İzoksuprin*, günümüzde sadece veteriner hekimlikte kullanılmaktadır. [16]. İlaç hayvanlara ağızdan verildikten sonra sindirim kanalından iyi emilir; ancak ilk geçiş etkisine maruz kalması sebebiyle, sistemik biyoyararlanımı düşüktür. Atlara damar içi yolla verildiğinde, atılma yarı ömrü 2,5-3 saat arasındadır [19].

2.6.3. *İzoksuprin*'in veteriner hekimlikte ve yarış hayvanlarında doping amaçlı kullanımı

Etkisi

İzoksuprin vazodilatör bir ilaç olup, yapı yönünden semptomimetik aminlere yakındır ve çoğu kez de β -adrenerjik reseptör agonisti olarak tanımlanır. Belirli bir reseptör veya nöromediyatör madde ile etkileşmeden düz kasları gevşetici etkiye papaverin-benzeri etki denir. *İzoksuprin*'in düz kaslara olan etkisi, papaverin benzeri etki yanında, β -agonistik etkiyle de ilgilidir. Uterus düz kaslarını iyi gevşetir. Kalp kasının kasılma gücü ve atım sayısını artırır [19].

Kullanılması

İzoksuprin atlarda navikular hastalığının tedavisinde kullanılır; bu amaçla önce 21 gün süreyle ağızdan günde 2 kez ve sonra 14 gün süreyle 1 kez ve daha sonra da 1 hafta süreyle gün aşırı 0,6 mg/kg dozda verilir [19].

2.6.4. *İzoksuprin* içeren müstahzarlar

Türkiye’de sadece aşağıdaki veteriner ürün müstahzarı mevcuttur:

Utelax Enjeksiyonluk Çözelti:

Tedavi Grubu: Tokolitikler

Kullanıldığı Hayvanlar: At, Keçi (Süt), Kedi, Koyun (Süt), Köpek, Sığır (Süt)

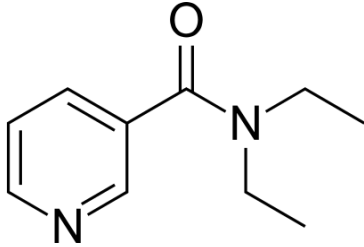
Formu: Çözelti

Uygulama Yolu: İntramusküler enjeksiyon [16].

2.7. *Niketamid*

2.7.1. *Niketamid*'in fiziksel ve kimyasal özellikleri

Dietilnikotinamid yapısında, renksiz veya soluk sarı renkte, acı, kendine has bir kokuya sahip, yağlı bir sıvı veya kristalize bir tozdur. Kapalı formülü $C_{10}H_{14}N_2O$ olan *Niketamid*'in kimyasal yapısı (N,N-dietilpiridin-3-karboksamid) Şekil 2.3'de verilmektedir [16].



Şekil 2.3. *Niketamid*'in kimyasal yapısı

Molekül ağırlığı 178,235 g/mol olan *Niketamid*, su ve organik çözücülerde kolayca çözünür. pKa'sı 3,5'dir [19].

2.7.2. *Niketamid*'in farmakolojik özellikleri

Farmakolojik sınıflamada *Santral Sinir Sistemi Stimulanı*, *Analeptikler* alt grubuna ait olan *Niketamid*, kimyaca dietilnikotinamid'tir. Konvulsan dozu ile solunum merkezini oldukça selektif bir şekilde stimule eden dozu arasındaki oran, pentilentetrazolunkinden daha yüksektir. Günümüzde sadece veteriner hekimlikte kullanılmaktadır [18]. İlaç ağızdan ve parenteral uygulama yerlerinden iyi emilir. Vücutta N-dealkilasyonla N-etilnikotinamid ve nikotinamide çevrilir; vücuttan, özellikle N-etilnikotinamid şeklinde olmak üzere, idrarla hızla atılır. İlacın atlarda idrarla atılması 9 saatte tamamlanır [2, 19].

2.7.3. *Niketamid*'in veteriner hekimlikte ve yarış hayvanlarında doping amaçlı kullanımı

Etkisi

İlaç bir yandan solunum merkezini, diğer yandan da karotid ve aort bölgelerindeki kimyasal reseptörleri etkileyerek, solunumun hızı ve derinliğini artırır. İlaç, ayrıca, kalp-damar merkezini de uyarır; kan basıncı yükselir. Yüksek dozlarda uygulandığında, beyin kabuğunu ve omuriliği etkileyerek uyarılara sebep olur; bunları merkezi sinir sisteminin baskısı izler.

Bu özelliğinden dolayı güvenilir bir ilaç değildir. Etki gücü diğer uyarıcılardan zayıftır. Ancak, konvülsan dozu ile solunum merkezini oldukça selektif bir şekilde stimüle eden dozu arasındaki oran, pentilentetrazolunkinden daha yüksek olduğundan veteriner hekimlikte daha sık kullanılır [19].

Kullanılması

Niketamid solunum uyarıcısı olarak kullanılır. Genel dolaşımı iyileştirmesi, doku ve organlardan geçen kan miktarını artırarak daha iyi beslenmelerini sağlamaları sebebiyle hayvanlarda yarış performansını artırır [2].

2.7.4. *Niketamid* içeren müstahzarlar

Türkiye’de sadece aşağıdaki veteriner ürün müstahzarı mevcuttur:

Kardiovet Enjeksiyonluk Çözelti:

Tedavi Grubu: Analeptikler

Kullanıldığı Hayvanlar: At, Kedi, Köpek, Tay

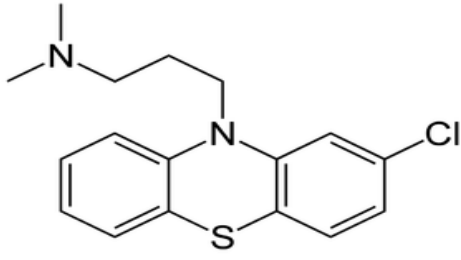
Formu: Çözelti

Uygulama Yolu: İntravenöz enjeksiyon, İntramusküler enjeksiyon [16].

2.8. *Klorpromazin*

2.8.1. *Klorpromazin*’in fiziksel ve kimyasal özellikleri

Klorpromazin kokusuz veya çok hafif amin kokulu beyaz veya krem-beyaz renkte veya mumsu görünümlü acı bir tozdur. Hidroklorür halinde bulunur. Çözeltileri ışık ve yükseltgenmeye duyarlıdır. Uzun süre bekletilmekle kararır; koyu renkli veya çökelti içeren çözeltileri kullanılmamalıdır; hafif sarımsı bir renk etkinliğini değiştirmez. Kapalı formülü $C_{17}H_{19}ClN_2S$ olan *Klorpromazin*’in kimyasal yapısı (3-(2-Klorofenotiyazin-10-il)propildimetilamin) Şekil 2.4.’de verilmektedir [16].



Şekil 2.4. *Klorpromazin*'in kimyasal yapısı

Molekül ağırlığı 318,863 g/mol olan *Klorpromazin*, su (1/1) ve alkol (1/1,5), eter, benzen ve kloroform içerisinde kolayca çözünür. Erime derecesi 56-58°C arasındadır. pKa'sı 9,3'dür [19].

2.8.2. *Klorpromazin*'in farmakolojik özellikleri

Farmakolojik sınıflamada Nöroleptik ilaçlar, fenotiazin türevleri, alifatik fenotiazinler alt grubuna dahil olan *Klorpromazin*, tıpta ilk kullanılan ve değerini günümüzde kısmen koruyan bir nöroleptik ilaçtır. *Klorpromazin* insana 25-50 mg dozunda ağızdan veya intramüsküler verildiğinde nöroleptik sendrom belirtilerini oluşturur. Ayrıca sedatif etkisi de vardır ve diğer gruptaki fenotiazinlerinkine göre daha fazladır. Uzun süre kullanıldığında diğer bazı etkileri gibi sedatif etkisine karşı da tolerans oluşur; fakat antipsikotik etkisine karşı tolerans oluşmaz. Fenotiazinler içinde sedatif etkisi en zayıf olanlar piperazinli bileşiklerdir. *Klorpromazin*'in sedatif etkisi barbitüratlarınkinden farklıdır; şöyle ki *Klorpromazin* verilen hastada uyuşukluk hali ve motor koordinasyon bozukluğu ve ataksi meydana gelmeksizin sedasyon olur; hasta uyuklasa bile kolayca uyandırılabilir. *Klorpromazin* narkotik analjeziklerin ve hipnotik ilaçların yaptığı sedasyon ve hipnoz halini potansiyalize eder; aynı şekilde genel anesteziğin depresan etkilerini artırır. Piperazinli bileşikler hariç diğer fenotiazinler de bu özelliğe sahiptirler. *Klorpromazin* yüksek dozda verildiğinde insan ve deney hayvanlarında katalepsi (katatoni) yapar.

Klorpromazin; amfetaminlerin, kokainin ve bazı psikomimetik ilaçların meydana getirdiği psişik stimülasyon, öfori, hallüsinasyon ve delüzyon hallerini ortadan kaldırır. *Klorpromazin*, dopaminerjik reseptörleri etkileyen dopamin ve apomorfın gibi maddelerin santral ve periferik dopaminerjik etkilerini kompetitif bir biçimde antagonize eder. Otonom sinir sistemi ile ilgili olarak *Klorpromazin* güçlü alfa- adrenenerjik (α), reseptör bloke edici

etkiye sahiptir. Hastaya verilen semptomimetik ilaçların prekürsör etkisini ortadan kaldırır. Beta- adrenerjik reseptörlere etkisizdir. Antikolinerjik etkisi nedeniyle, ağız ve boğaz kuruluğu, konstipasyon ve diğer atropin-benzeri etkiler meydana getirir. *Klorpromazin*'in güçlü antihistaminik etkisi vardır. Serotonin 5-HT₂ reseptörlerini de bloke eder.

Klorpromazin mide barsak kanalından yaklaşık %30 oranında absorbe edilir. Plazma proteinlerine %95-98 oranında bağlanır. Karaciğerden ilk geçişte önemli ölçüde inaktive edilir. Ayrıca ince barsak mukozasından geçerkende metabolize edilir. Bu nedenle; ağızdan alınan dozu parenteral verilen aynı doza göre daha az etkili olur. Barsaktan absorbe edilen miktarın %60-70 kadarı karaciğerden safraya itrah edilir ve enterohepatik sıklusa girer. Bu durum *Klorpromazin* etkisinin uzamasına neden olur. *Klorpromazin*in eliminasyon yarılanma ömrü ortalama 30 saat kadardır. Günlük dozu günde bir kezde verilebilir. Karaciğerdeki primer biyotransformasyonu hidroksillenmek ve sülfoksid türevine dönüştürülmek suretiyle olur. Böbreklerden kısmen değişmemiş halinde ve kısmen de bu metabolitleri halinde itrah edilir.

Klorpromazin şu indikasyonlarda hala kullanılır: (i) Şizofreni ve diğer psikozlar, mani ve kısa süreli yardımcı ilaç olarak ağır anksiyete, psikomotor ajitasyon, eksitasyon ve saldırgan ve tehlikeli nitelikte impülsif davranış, ayrıca çocukluk şizofrenisi ve otizm. (ii) Cerrahi girişim için hipotermi oluşturma ve (iii) İnatçı hıçkırık [18].

2.8.3. *Klorpromazin*'in veteriner hekimlikte ve yarış hayvanlarında doping amaçlı kullanımı

Etkisi

Klorpromazin nörolepsiye yol açar; ayrıca, yatıştırıcı etkisi de vardır. Bu sebeple, preanestezik olarak kullanıldığında, barbitüratların anesteziye yol açan miktarları 1/2 oranında azaltılmalıdır. Uzun süre kullanılması durumunda, yatıştırıcı ve diğer etkilerine direnç gelişirken, nöroleptik etkilerine duyarlılıkta herhangi bir azalma olmaz. Genellikle belirgin bir yatışma yapmaksızın, hareketlerde yavaşlama, çevreye ilgisizlik ve çevreden gelen uyarılara cevap vermede isteksizlik, heyecansızlık, merakta azalma, aldırmaçlık, sakinleşme, insiyatifte azalma yaparken, motor faaliyet, bellek, hatırlama, dikkat etmek gibi yeteneklerde genellikle bir değişiklik veya azalma yapmaz. *Klorpromazin* fenotiazin

türevleri içerisinde yatıştırıcı etkisi en zayıf olanıdır. Piperazin türevi dışındaki fenotiazin nöroleptikler, narkotik ağrı kesiciler ve uyku ilaçlarının etkisini güçlendirirler; fakat, ağrı kesici etkileri çok zayıf veya yok gibidir [2, 19].

Kullanılması

Klorpromazin premedikasyon, hayvanların tutulması ve yeni bir çevreye alıştırılması, psikonörotik bozukluklar, deri hastalıkları, kusma ve tetanozun tedavisinde kullanılır [19].

2.8.4. *Klorpromazin* içeren müstahzarlar

Largactil Ampul (Enjektabl Preparat)

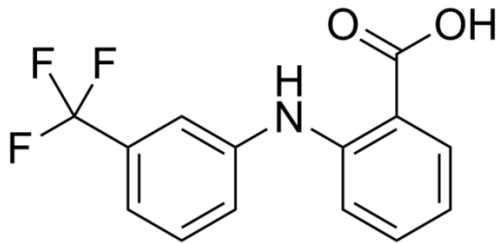
Largactil Kaplanmış Tablet (Tablet)

Türkiye’de *Klorpromazin* içeren veteriner ürün mevcut değildir [16].

2.9. *Flufenamik Asit*

2.9.1. *Flufenamik asit*’in fiziksel ve kimyasal özellikleri

Flufenamik asit soluk sarı renkte kristalize bir tozudur. Kapalı formülü $C_{14}H_{10}F_3NO_2$ olan *Flufenamik asit*’in kimyasal yapısı (N-(alfaalfaalfa-Trifloro-m-tolil)anthranilik asit) Şekil 2.5.’de verilmektedir [16].



Şekil 2.5. *Flufenamik asit*’in kimyasal yapısı

Molekül ağırlığı 281,234 g/mol olan *Flufenamik asit*, suda çözünmez ve pKa’sı 3,9’dur [21].

2.9.2. *Flufenamik asit*’in farmakolojik özellikleri

Flufenamik asit yapıca mefenamik asite benzeyen antranilik asit türevi nonsteroidal antienflamatuar bir ilaç (NSAID)'dir. Çoğunlukla %2,5-3'lük krem, pomat, jel veya sprey formlarındaki preparatları halinde kas-iskelet sistemi, eklem ve yumuşak doku hastalıklarında görülen ağrı veya enflamasyona karşı topikal olarak uygulanır. Oral yoldan da verilebilir [16].

Flufenamik asit ağızdan verildikten sonra sindirim kanalından yavaş emilir. En yüksek plazma yoğunluğuna 6 saatte ulaşır ve plazma yarı ömrü 3-9 saat arasındadır. İlaç vücutta önemli ölçüde hidrosillenmeye uğrar; hidrosilli metabolit ve birleşme ürünleri halinde idrar ve dışkıyla çıkarılır; 72 saatte %50'si idrar ve %36'sı dışkıyla atılır [19].

2.9.3. Flufenamik asit'in veteriner hekimlikte ve yarış hayvanlarında doping amaçlı kullanımı

Etkisi

Yangı önleyici etkisi güçlü olan *Flufenamik asit*, sık olarak bulantı, kusma ve sindirim bozukluklarına yol açar. Etkisi; prostaglandin sentetazı engelleyip, araşidonik asitin endoperoksitler ve prostaglandinlere çevrilmesini önlemeyle ilgilidir [2, 19].

Kullanılması

Atlarda romatizmal rahatsızlıklar da dahil, kas, eklem ağrıları ve yangılarının yatıştırılması ve tedavisinde kullanılırlar [2].

2.9.4. Flufenamik asit içeren müstahzarlar

Türkiye'de *Flufenamik asit* içeren müstahzar ve veteriner ürün mevcut değildir [16].

2.10. Analiz Yöntemleri

2.10.1. *Prokain*

Kioussi ve grubu, içerisinde *Prokain*'in de yer aldığı bir grup doping maddesi için sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon yöntemleri sonrası LC-TOF-MS, GC-HRMS ve GC-MS'in kullanıldığı bir tarama yöntemi geliştirmişlerdir [22]. Dhananjeyan ve arkadaşları *Prokain* ve Para-aminobenzoik asidin eş zamanlı tayini için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirerek, valide etmişlerdir [23]. Stanley ve Foo, içerisinde *Prokain*'in de bulunduğu bir grup doping maddesinin at idrarından analizi için direkt enjeksiyonu kullandıkları bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmaya göre; geliştirdikleri yöntemle tespit edebildikleri en düşük *Prokain* seviyesi 10 ng/mL'dir [24]. Xu ve Lee, *Prokain*, Lidokain, Tetrakain ve Bupivakain'in analizi için yeni bir polivinil klorür fiber geliştirmişler ve geliştirdikleri bu fiberi mikroekstraksiyonda kullanarak, HPLC-UV ile bir analiz gerçekleştirmişlerdir [25]. Takeda ve arkadaşları, içerisinde *Prokain*'in de bulunduğu bir grup doping maddesinin at plazmasından analizi için bir SPE-GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir [26]. Kohler ve grubu, *Prokain* ile birlikte bir grup ilacın idrardan analizi için hızlı ve yüksek hassasiyette bir CE-MS yöntemi geliştirmişlerdir [17]. Başka bir çalışmada ise yine içerisinde *Prokain*'in de yer aldığı başka bir grup ilacın idrardan analizi için bir DLLME-CE-TOF-MS yöntemi geliştirmişlerdir [27]. Pavlović ve arkadaşları, içerisinde *Prokain*'in de yer aldığı 12 adet farmasötiğin analizi için matris katı-faz dispersiyon (MSPD) ile LC-MS/MS'in bir arada kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir [28].

Wang ve arkadaşları, *Prokain hidroklorür*'ün idrar ve farmasötik preparatlardan analizi için bir diferansiyel puls voltametrisi (DPV) yöntemi geliştirmişlerdir [29]. Xu ve grubu, *Prokain hidroklorür*'ün farmasötik preparatlardan analizi için kromojenik ajan olarak 1,2-naftakinon-4-sülfonik asiti kullanarak bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir [30]. Carretero ve arkadaşları *Prokain*'in farmasötik preparatlardan tayini için, türevlendirme ajanı olarak floresamin kullanarak bir florometrik yöntem geliştirmişlerdir [31].

2.10.2. *İzoksuprin*

Juan ve grubu, aralarında *İzoksuprin*'in de yer aldığı 12 adet β -agonistin yemden analizi için katı faz ekstraksiyon ve UPLC-Q/TOF-MS'in birlikte kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir [32]. Kwok ve arkadaşları, aralarında *İzoksuprin*'in de yer aldığı 100 ilacın at idrarından tespiti için otomatik katı-faz ekstraksiyon cihazı ve LC-MS/MS'i bir arada kullanarak doping kontrolü için bir proses geliştirmişlerdir [4]. Wang ve grubu, aralarında *İzoksuprin*'in de bulunduğu 5 adet β -agonistin domuz yemi, domuz idrarı ve domuz ciğerinden analizi için bir CE-ED yöntemi geliştirmişlerdir [33]. Kootstra ve arkadaşları, içerisinde *İzoksuprin*'in de yer aldığı bir grup β -agonistin sığır kasından analizi için moleküler baskılanmış polimer kullanarak bir iyon tuzak LC-MS yöntemi geliştirmişlerdir [34]. Guo ve grubu, aralarında *İzoksuprin*'in de yer aldığı 12 adet β_2 -agonistin domuz, sığır, koyun ve tavuk etinden analizi için katı faz ekstraksiyon ve UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS'in bir arada kullanıldığı bir yöntem geliştirmişler ve valide etmişlerdir [35]. Mauro ve grubu, aralarında *İzoksuprin*'in de bulunduğu 18 adet β -agonistin sığır idrarından tespiti için katı faz ekstraksiyon ve UPLC-MS/MS'in bir arada kullanıldığı bir yöntem geliştirmişler ve valide etmişlerdir [36]. Leon ve arkadaşları aralarında *İzoksuprin*'in de yer aldığı bir grup yasaklı veteriner ilacın idrardan analizi için QuEChERS yöntemi, katı faz ekstraksiyon ve UHPLC-HRMS'in bir arada kullanıldığı bir proses geliştirmişlerdir [37]. Suo ve grubu, *İzoksuprin*'in de aralarında bulunduğu bir grup β -agonistin hayvan idrarından analizi için pseudo-moleküler baskılanmış polimer ve UHPLC-MS/MS'in bir arada kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir [38].

Tharpa ve arkadaşları, *İzoksuprin hidroklorür*'ün insan idrarından ve farmasötiklerden analizi için 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon kullanarak 2 farklı pH'da, 2 farklı kromojen ile spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir [39]. Alarfaj, *İzoksuprin hidroklorür*'ün farmasötik ve biyolojik sıvılardan tespiti için bir florometrik yöntem geliştirmiştir [40]. Belal, AL-Malaq ve Majed *İzoksuprin* ve Fenoterolün dozaj formlarından ve biyolojik sıvılardan tespiti için voltametrik bir yöntem geliştirmişlerdir [41]. Xiao ve grubu, Raktopamin ve *İzoksuprin*'in domuz dokusundan analizi için moleküler baskılanmış polimerle gerçekleştirilen katı faz ekstraksiyon yöntemi ile SERS'in bir arada kullanıldığı bir proses geliştirmişlerdir [42].

2.10.3. Niketamid

Musenga ve Cowan, aralarında *Niketamid*'in de yer aldığı çeşitli doping maddelerinin insan idrarından analizi için katı-faz ekstraksiyon ve UHPLC-HRMS'in bir arada kullanıldığı bir proses geliştirmişlerdir [43]. Girón ve ekibi, aralarında *Niketamid*'in de bulunduğu bir grup doping maddesinin insan idrarından tespiti için direkt enjeksiyon ve UHPLC-HRMS'in birlikte kullanıldığı bir yöntem geliştirmişler ve valide etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada *Niketamid*'in LOD değerini 50 ng/mL olarak bulmuşlardır [44]. Lu ve arkadaşları, içerisinde *Niketamid*'in de bulunduğu 14 adet tersiyer amin stimulanının insan idrarından doping kontrol amacıyla analizi için katı faz ekstraksiyon, sıvı-sıvı ekstraksiyon, LC-MS/MS ve GC-MS'in birlikte kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir [45]. Chen ve grubu *Niketamid* ve Lidokain'in insan kanı ve beyin omurilik sıvısından eş zamanlı tespiti için bir ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir [46]. Garcés ve arkadaşları, aralarında *Niketamid*'in de bulunduğu bir grup yasaklı maddenin plazmadan analizi için bir katı faz mikroekstraksiyon yöntemi geliştirmişlerdir [47]. Badoud ve grubu aralarında *Niketamid*'in de bulunduğu bir grup doping maddesinin idrardan tarama analizi için direkt enjeksiyon ile UHPLC-QTOF-MS'in birlikte kullanıldığı ve konfirmasyon analizi için ise katı faz ekstraksiyon ile UHPLC-QTOF-MS'in birlikte kullanıldığı bir proses geliştirmişlerdir [48- 49].

Thuyne, Eenoo ve Delbeke, aralarında *Niketamid*'in de bulunduğu bazı doping maddelerinin idrardan analizi için sıvı-sıvı ekstraksiyon ile GC-MS'in birlikte kullanıldığı ve MSTFA ile türevlendirme basamağı da içeren bir proses geliştirmişler ve valide etmişlerdir [50]. Kolmonen ve arkadaşları, aralarında *Niketamid*'in de yer aldığı farklı etki mekanizmalarına sahip doping maddelerinin insan idrarından analizi için katı-faz ekstraksiyon ve LC-TOF-MS'in bir arada kullanıldığı bir proses geliştirmişlerdir [51]. Leung ve ekibi, aralarında *Niketamid*'in de bulunduğu bir grup ilacın analizi için bir CE yöntemi geliştirmişlerdir [52].

2.10.4. Klorpromazin

Moulard ve arkadaşları, aralarında *Klorpromazin*'in de yer aldığı çeşitli doping maddelerinin at idrarından analizi için katı faz ekstraksiyon ve HPLC-Q-Orbitrap-HRMS'in birlikte kullanıldığı bir yöntem geliştirmişler ve valide etmişlerdir [53]. Song ve ekibi, yeni bir moleküler baskılanmış polimer sentezleyip, HPLC-UV sistemini de kullanarak, *Klorpromazin*'in domuz idrarından tespiti için yeni bir proses geliştirmişlerdir [54]. Yamini ve Faraji, *Klorpromazin*'in biyolojik sıvılardan eser miktarlarda tayini için manyetik katı faz ekstraksiyon ve HPLC'nin beraber kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir [55]. Xiao ve Hu, aralarında *Klorpromazin*'in de bulunduğu 4 adet fenotiyazin grubu ilacın insan idrarından tespiti için oyuk fiber sıvı faz mikroekstraksiyon ve gaz kromatografinin birlikte kullanıldığı bir yöntem geliştirmişler ve valide etmişlerdir [56]. Li, Zhao ve Ju, aralarında *Klorpromazin*'in de bulunduğu psikotropik ilaçların insan idrarından eş zamanlı analizi için bir elektrokemilüminesans dedeksiyonlu kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir [57]. Borges ve arkadaşları, *Klorpromazin*'in insan plazmasından analizi için sıvı-sıvı ekstraksiyon ve UPLC-ESI-MS/MS'in bir arada kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir [58]. Asghari ve arkadaşları, Klozapin, *Klorpromazin* ve Tiyoridazin'in insan plazması ve farmasötik atık sulardan analizi için bir TDLLME-HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir [59]. Zhang ve ekibi, *Klorpromazin*'in fare plazması ve beyin dokusundan analizi için sıvı-sıvı ekstraksiyon ve LC-ESI-MS/MS'in bir arada kullanıldığı hassas bir yöntem geliştirmişlerdir [60].

Daniel ve Gutz, saf haldeki *Klorpromazin* analizi için basit ve hassas bir akış-enjeksiyon spektroeletroanalitik yöntem geliştirmişlerdir [61]. Sales ve grubu, saf haldeki *Klorpromazin* analizi için yeni bir akış enjeksiyon-potansiyometrik yöntem geliştirmişlerdir [62].

2.10.5. *Flufenamik asit*

Ho ve arkadaşları, aralarında *Flufenamik asit*'in de yer aldığı asidik ilaçların, anabolik steroidlerin ve kortikosteroidlerin at idrarından tespiti için katı faz ekstraksiyon ve LC-MS'in bir arada kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir [63]. Helfer ve ekibi, *Flufenamik asit*'in de aralarında bulunduğu bir grup ilacın ve metabolitlerinin insan plazmasından analizi için bir LC-HR-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir [64]. Dahane ve arkadaşları, *Flufenamik asit*'in de aralarında yer aldığı çok farklı polariteye sahip bir grup ilacın sudan tespiti için, silika tabanlı mezopor bir materyal olan MCM-41'i ilk defa bir katı faz ekstraksiyon sorbenti olarak kullanarak geliştirdikleri yöntemi, mikro-LC-MS/MS ile bir araya getirerek yeni bir proses geliştirmişlerdir [65]. Huang ve arkadaşları, aralarında *Flufenamik asit*'in de bulunduğu 8 adet farmasötiğin su numunelerinden analizi için katı faz mikroekstraksiyon ve GC-MS'in bir arada kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir [66]. Mikami ve grubu, Mefenamik asit, *Flufenamik asit* ve Tolfenamik asit'in farmasötiklerden ve insan idrarından eş zamanlı tespiti için bir izokratik elüsyonlu HPLC yöntemi geliştirmişlerdir [67]. Hoshina ve arkadaşları, aralarında *Flufenamik asit*'in de yer aldığı non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların su numunelerinden analizi için moleküler baskılanmış polimer ve LC-MS/MS'in birlikte kullanıldığı bir proses geliştirmişlerdir [68]. Peters ve ekibi, içlerinde *Flufenamik asit*'in de bulunduğu yaklaşık 100 veteriner ilacın yumurta, balık ve etten tespiti için katı faz ekstraksiyon ve HRLC-TOF-MS'in birlikte kullanıldığı bir yöntem geliştirmişler ve valide etmişlerdir [69]. Wild ve arkadaşları, içlerinde *Flufenamik asit*'in de bulunduğu non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların su numunelerinden tespiti için katı faz mikroekstraksiyon ve GC-MS'in bir arada kullanıldığı yeni bir proses geliştirmişlerdir [70]. Vázquez ve arkadaşları, aralarında *Flufenamik asit*'in de yer aldığı bir grup farmasötiğin atık sulardan tespiti için ultrases yardımlı iyonik sıvı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon ile sıvı kromatografi-kuadropol-lineer iyon trap kütle spektrometrinin beraber kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir [71].

Muñoz de la Peña ve arkadaşları, *Flufenamik asit* ile Meklofenamik asitin insan idrarından analizi için yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir [72]. Pérez-Ruiz ve ekibi, *Flufenamik asit*, Meklofenamik asitin ve Mefenamik asit'in analizi için β -siklodekstrin kullanarak bir CE yöntemi geliştirmişlerdir [73]. Aly ve grubu, *Flufenamik asit* ve Mefenamik asit'in farmasötik preparatlardan tespiti için akış enjeksiyonu kullanarak yeni bir kemilüminesans yöntemi geliştirmişlerdir [74].

2.11. Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (LPME)

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE), sulu ortamdaki analitlerin su ile karışmayan bir çözücü içine alınmasını esas alan bir numune hazırlama tekniğidir. Ancak klasik LLE yöntemi; büyük numune hacmi gereksinimi, fazla miktarda organik çözücü tüketimi, ekstraksiyon süresinin uzun olması sebebiyle, pahalı ve çevre dostu olmayan bir yöntemdir. LLE uygulamalarında karşılaşılan bu problemleri azaltmak amacıyla LPME teknikleri geliştirilmiştir [75].

LPME, ilgili analiti içeren sulu faz ve su ile karışmayan çözücünün çok küçük hacimleri arasında gerçekleşir. LPME ile ilgili ilk çalışmanın yapıldığı 1996 yılından günümüze kadarki süreçte farklı LPME yaklaşımları geliştirilmiştir [75-77]. Bu yaklaşımlar Çizelge 2.5.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. Sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemleri [75]

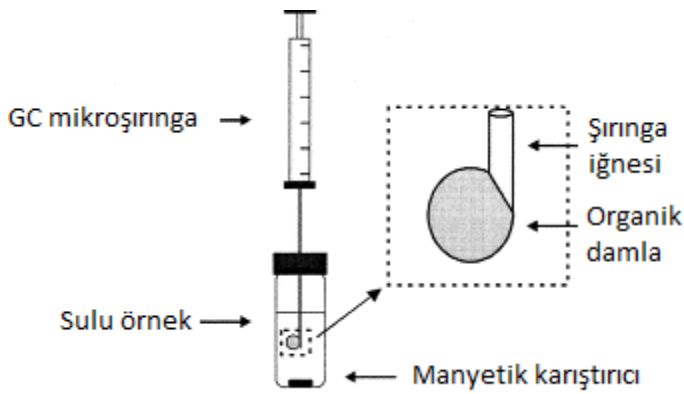
Sıvı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemleri	• Tek damla Mikroekstraksiyon (SDME)	• Doğrudan daldırma (DI-SDME) • Tepe boşluklu (HS-SDME) • Sıvı-sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (LLLME) • Sürekli akış mikroekstraksiyon (CFME)
	• Oyuk fiber (HF-LPME) • Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) • Doğrudan askıda damlacık mikroekstraksiyonu (DSDME) • Katı damla mikroekstraksiyon	

2.11.1. Tek damla mikroekstraksiyon (SDME)

Bu yöntemde, ekstraksiyon ortamı tek damladır. SDME'de genel olarak mikro şırınga vasıtasıyla oluşturulan 1-10 µL hacminde organik çözücü damlacığı, ekstraksiyon ortamında tutulur. Ekstraksiyon sonrası organik damla mikro şırıngaya tekrar geri çekilir ve analiz için ilgili kromatografik sisteme enjekte edilir. SDME kullanılmaya başlandığından beri, çeşitli analitik uygulamalar için, farklı SDME yöntemleri geliştirilmiştir [77-79].

Doğrudan daldırma (DI-SDME)

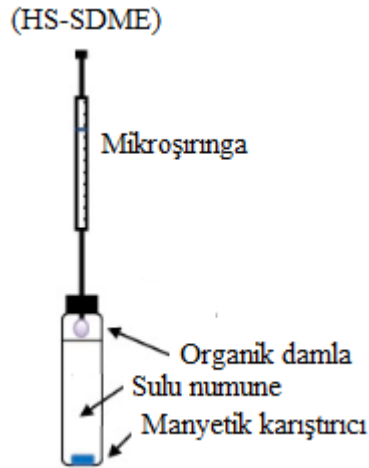
Bu yöntemde organik çözücü içeren mikro şırınga kullanılır. Önce mikro şırıngaya birkaç mikro litre organik çözücü çekilir ve sonra mikro şırınganın iğnesi sıvı örneğe daldırılır. Yöntem, sulu faz ile mikro şırınga iğnesinin ucundaki organik çözücü arasında analitlerin dağılması prensibine dayanmaktadır. Ekstraksiyondan sonra, organik faz, mikro şırınga ile geri alınır ve direkt olarak analitlerin analizi için kullanılır. Bu yöntemin en büyük dezavantajı, özellikle temiz olmayan numunelerde yüksek karıştırma hızı ve sıcaklıklara bağlı olarak damlanın kararsız olmasıdır [80-81].



Şekil 2.6. Doğrudan daldırma (DI-SDME) yönteminin şematik gösterimi [80]

Tepe boşluklu tek damla mikroekstraksiyon (HS-SDME)

Bu yöntem ilk kez 2001 yılında Theis ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır [82]. Uçucu veya yarı uçucu bileşiklerin numunenin üzerindeki boşlukta tutulan mikro damlaya ekstraksiyonunu esas alan numune hazırlama yöntemidir. Damla, ekstraksiyon boyunca mikro şırınganın ucunda kalır ve sonra mikro şırınga içerisine geri çekilerek, ekstre edilen analit tayin edilir. HS-SDME yönteminde analitler, numune, tepe boşluğu ve organik damla olmak üzere üç faz arasında dağılım gösterirler. Bu mikroekstraksiyon yöntemi karmaşık matrislerde üstün bir temizleme sağlar [75].



Şekil 2.7. Tepe boşluklu mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi [75]

Sıvı-sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (LLLME)

3 fazlı bir yöntem olup asidik ve bazik analitlerin ekstraksiyonu için uygundur. 1999 yılında Ma ve Cantwell tarafından “eşzamanlı geri ekstraksiyonlu çözücü mikroekstraksiyonu” adı altında geliştirilmiştir [83]. Bu ekstraksiyon tekniği iki basamakta gerçekleşir. İlk olarak iyonlaşabilen analitler, organik faza alınır, ikinci basamakta ise analitler iyonlaşabilecekleri pH’larda ayarlanmış geri ekstraksiyon çözeltisi kullanılarak sulu faza alınır. LLLME’de kullanılan organik çözücüler, su ile karışmamalı ve sudan daha düşük bir yoğunluğa sahip olmalıdır. Toluen, n-oktan, 1-oktanol ve n-hekzan en sık kullanılan çözücülerdir. Bu yöntemde, analitler sulu faza alındığından doğrudan sıvı kromatografiye ve kapiler elektroforeze uygulanabilir [84].

Sürekli akış mikroekstraksiyon (CFME)

Bu yöntemde, ekstraksiyon çözücü damlacığı sürekli akış halinde olan numune çözeltisi ile temas halindedir. Numune çözeltisi sürekli aktıkça ekstraksiyon çözücü damlası ekstraksiyon işlemini gerçekleştirir. Yöntemin dezavantajı; mikroinfüzyon pompası gibi ilave ekipmanlara ihtiyaç duyulması ve sadece apolar ekstraksiyon çözücülerinin akış sisteminde kararlı olmasından dolayı apolar ya da çok az polar yarı uçucuların ekstraksiyonuyla sınırlı olmasıdır [85-86].

2.11.2. Oyuk fiber mikroekstraksiyon (Hollow Fiber Microextraction)

Pedersen-Bjergaard ve Rasmussen, 1999 yılında, LPME'nin kararlılığını artırmak için, polipropilenden üretilmiş gözenekli liflerin kullanıldığı bu mikroekstraksiyon yöntemini geliştirilmişlerdir [87]. Bu yöntemde organik çözücü gözenekli, hidrofobik oyuk fiberin lumeninin içerisinde yer alır ve mikroekstraksiyon çözücüsü numune çözeltisi ile doğrudan temas etmez. Organik çözücü oyuk fiberin duvarının içinde ince bir tabaka oluşturur. Daha sonra lumen kısmı akseptör çözelti ile doldurulur. Akseptör çözelti organik çözücü (iki-fazlı sistem) olabileceği gibi asidik veya bazik sulu çözelti (üç fazlı sistem) olabilir. Oyuk fiber, analitlerin bulunduğu sulu çözelti kabına yerleştirilir. Analitler, sulu numuneden oyuk fiberin gözeneklerindeki organik faz içerisine ve sonra lumen içerisindeki akseptör çözücüyeye ekstre edilirler. Ekstraksiyonu hızlandırmak için numune çözeltisi iyice karıştırılır. Yüksek molekül kütleli bileşikler membranın bariyerinden geçemeyeceği için yöntem etkin bir temizleme sağlar. Geniş bir polarite aralığındaki inorganik ve organik analitler için uygundur [88-90].

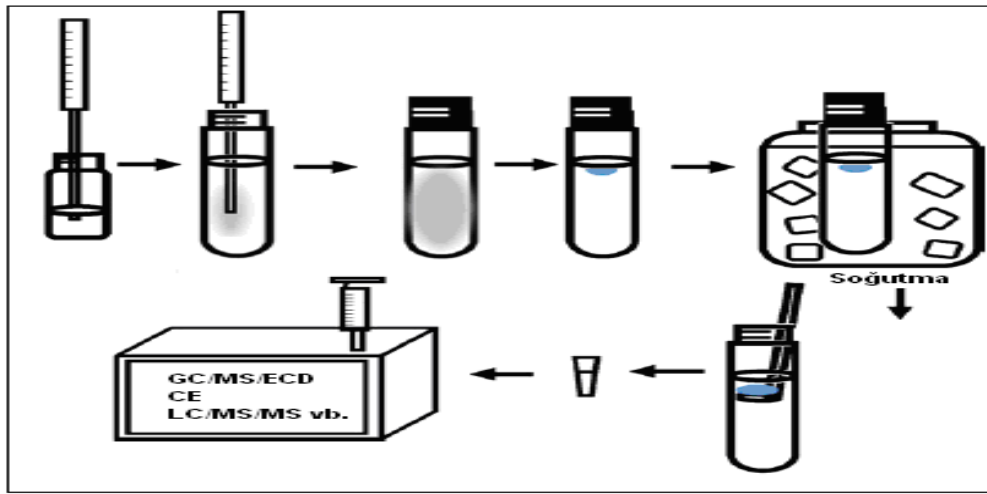
2.11.3. Doğrudan askıda damlacık mikroekstraksiyon (DSDME)

Bu mikroekstraksiyon yöntemi, Lu ve arkadaşları tarafından 2006 yılında geliştirilmiştir. Yöntemde, bir manyetik karıştırıcı sulu numune içeren kabın dibine yerleştirilerek düşük girdaplı bir karıştırma sağlanır. Suyla karışmayan organik çözücünün çok küçük bir hacmi sulu çözeltinin yüzeyine eklendiğinde, dönme merkezi yakınında bir damla oluşur. Kütle transferi olurken, damla da sulu fazın yüzeyinde kendi etrafında döner. Yöntemin en büyük dezavantajı, küçük hacimdeki asılı damlanın çözeltiden alınma güçlüğüdür [75].

2.11.4. Katı damla mikroekstraksiyon (SD-LPME)

2007 yılında Khalili-Zanjani ve çalışma grubu tarafından geliştirilen sıvı faz mikroekstraksiyon tekniğidir [91]. Aynı zamanda katılaştırılmış yüzen organik damla mikroekstraksiyonu (SFODME) olarak da adlandırılır. Bu ekstraksiyon yönteminde, uygun bir organik çözücünün küçük bir hacmi (20 mikro litreden küçük), cam bir kabın içerisinde bulunan sulu numune çözeltisinin yüzeyinde dağıtılır. Sıvı faz bir süre karıştırılır. Sonra numunenin olduğu kap bir buz banyosuna yerleştirilir. Kısa bir süre sonra organik çözücü katılaşır. Katılaşan organik çözücü uygun bir teknik ile vialle aktarılıp doğrudan veya dolaylı

olarak analitik cihazlara enjekte edilir. Bu yöntemde kullanılan organik çözücü, oda sıcaklığına yakın bir erime noktası sıcaklığına (10-30°C aralığında) sahip olmalıdır. 1-undekanol, 1-dodekanol, 2-dodekanol ve n-hekzadekan bu özelliğe sahip çözücülerdendir. Yöntemin; işlem kolaylığı, az zaman alması, düşük maliyet, yüksek geri kazanım ve zenginleştirme faktörü gibi avantajları vardır. Bununla birlikte, sadece az sayıda organik çözücü oda sıcaklığına yakın bir erime noktası sıcaklığına sahip olduğundan ekstraksiyon çözücüsü seçiminin sınırlı olması gibi bir dezavantajı da mevcuttur [75].



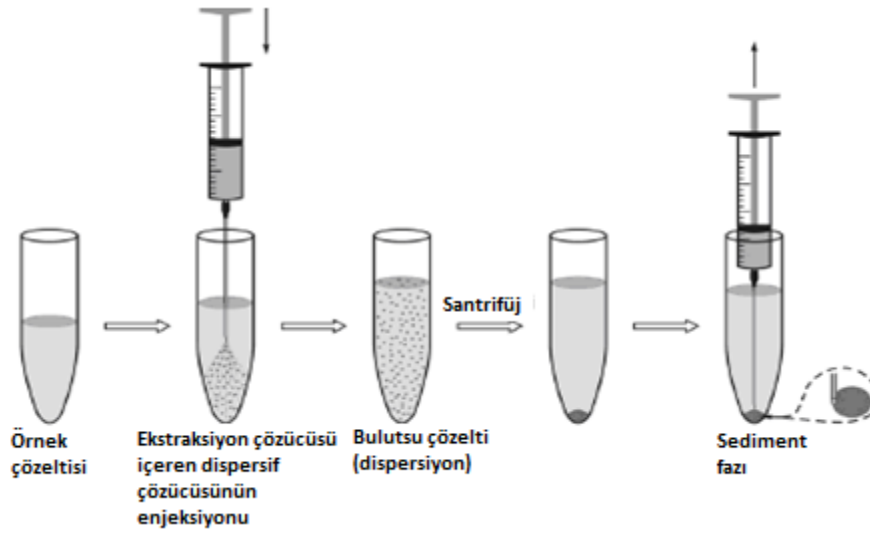
Şekil 2.8. Katılaştırılmış yüzen organik damla (SFODME) yönteminin temel basamakları [92]

2.11.5. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME)

DLLME yöntemi ilk olarak Rezaee ve arkadaşları tarafından 2006 yılında geliştirilmiştir. Basit ve hızlı bir mikroekstraksiyon yöntemidir ve uygun bir ekstraksiyon çözücüsü (kloroform veya klorobenzen gibi yüksek özkütleli bir organik çözücü) ile hem ekstraksiyon çözücüsü hem de suyla karışabilen dispersif çözücü kullanımına dayanır. Dispersif çözücü olarak genellikle aseton, etanol, metanol ve asetonitril kullanılır [75].

DLLME sadece yüksek veya orta derecede lipofilik özellikteki analitler için uygundur ve yüksek derecede hidrofilik özellikteki nötral analitler için uygun değildir. Asidik ya da bazik analitlerin dağılma katsayısı ise, numune çözeltisinin pH değerinin kontrol edilmesiyle arttırılabilir [93].

Ekstraksiyon çözücüsü ve dispersif çözücünden oluşan karışım numuneye hızlı bir şekilde enjekte edildiğinde yüksek bir türbülans oluşur. Bu türbülans karışım içerisinde dağılmış olan küçük damlacıkların oluşumunu artırır. Bulutumsu çözelti oluşuktan sonra, ekstraksiyon çözücüsü ile sulu numune arasındaki yüzey alanı çok büyük olur, hızlıca dengeye ulaşılır ve ekstraksiyon zamanı azalır. Bu etki DLLME'nin başlıca avantajıdır. Bulutumsu çözeltinin santrifüjünden sonra, konik tüpün dibindeki sediment faz alınır ve uygun bir analitik teknik ile analiz edilir. DLLME'nin dezavantajı gerekli koşullar nedeniyle az sayıdaki ekstraksiyon çözücüsü ile sınırlı olmasıdır [75].



Şekil 2.9. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon [92]

Ekstraksiyon çözücüsünün seçimi DLLME yönteminin optimizasyonundaki en önemli parametredir. Ekstraksiyon çözücüsünün sulu fazdan ekstraksiyonla ayrılabilmesi için, ekstraksiyon çözücüsü olarak sudan daha yüksek yoğunluğa sahip organik çözücüler kullanılmalıdır. Ekstraksiyon çözücüsü, aynı zamanda ilgili analitler için yüksek ekstraksiyon kapasitesine sahip olmalıdır [94].

Dispersif çözücü, ekstraksiyon çözücüsü ve suyla karışabilir özellikte olmalıdır. Her iki faz içinde dağılan dispersif çözücünün bulutumsu bir görüntü oluşturması gerekir. Dispersif çözücü, ekstraksiyon çözücüsü ile sulu faz arasındaki yüzey alanının artmasını sağlar ve bu sayede ekstraksiyon verimi de artar [94].

Ekstraksiyon çözücüsünün hacmi, zenginleştirme faktörünü doğrudan etkiler. Ekstraksiyon çözücü hacminin artması santrifüj sonrası elde edilen organik faz hacmini artıracığından, zenginleştirme faktörünün de azalmasına sebep olur. Bu da hedef analitin tayininde hassasiyetin azalması anlamına gelir. Bu yüzden ekstraksiyon çözücü hacmini düşük tutarak hem zenginleştirme faktörünün yükselmesi hem de hedef analitlerin belirlenmesindeki duyarlılığı artırmış oluruz. Ekstraksiyon çözücü hacmi genellikle 5-100 µL aralığında bir değerde seçilmektedir [94].

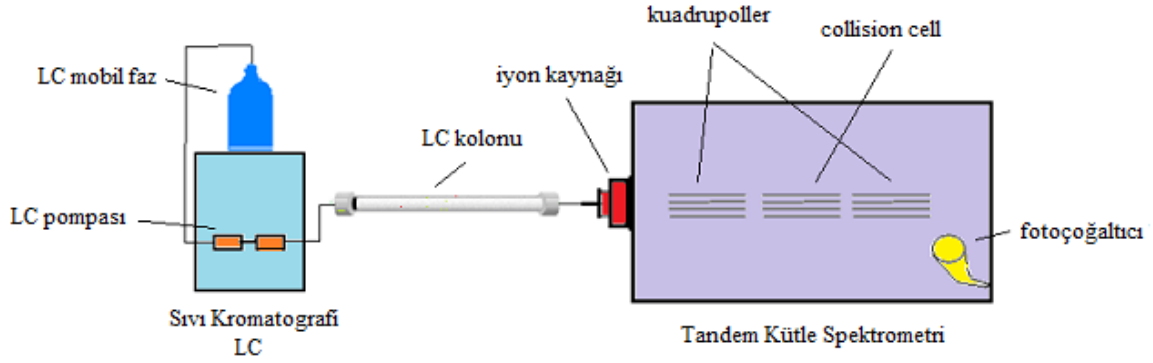
Dispersif çözücü hacmi, bulutumsu çözelti oluşumunu doğrudan etkileyerek, ekstraksiyon çözücüsünün sulu fazdaki dağılımını ve ekstraksiyon verimini etkiler. DLLME için genellikle 0,5-1,5 mL hacim aralığında dispersif çözücü kullanılır [94].

Analit eğer asidik veya bazik karakterde ise pH'da ekstraksiyon verimini etkileyen önemli bir faktördür. Ayrıca sulu fazın iyonik şiddetinin de analitlerin ekstraksiyon verimi üzerinde etkisi vardır. Analitin ve ekstraksiyon çözücüsünün sulu fazdaki çözünürlüğü genellikle iyonik şiddetin artmasıyla azalır [93].

Ekstraksiyon süresi DLLME verimini etkileyen bir diğer faktördür. DLLME'de ekstraksiyon süresi, dispersif çözücü ve ekstraksiyon çözücüsü karışımının numuneye enjekte edilmesinden santrifüje başlamadan önceki zaman aralığı olarak tanımlanır. Böylece, analitlerin sulu fazdan ekstraksiyon fazına geçişi hızlı olur. Denge durumuna çok çabuk ulaşılır [94].

2.12. Sıvı Kromatografi -Tandem Kütle Spektrometri (LC-MS/MS)

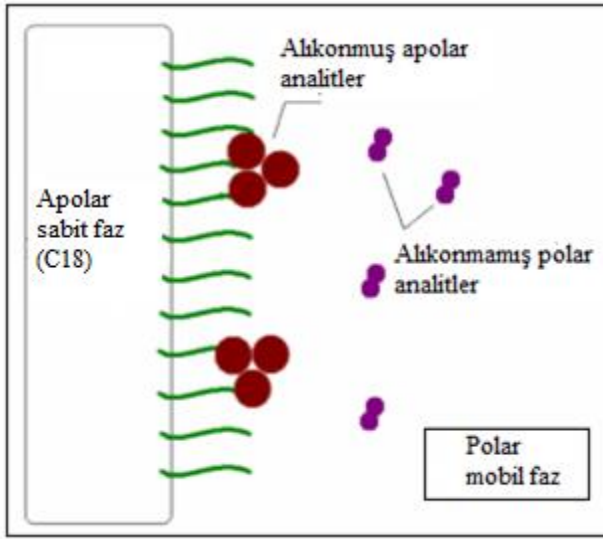
LC-MS/MS yüksek performanslı sıvı kromatografinin (HPLC) tandem kütle spektrometriye doğrudan bağlı olduğu bir sistemdir. Analitlerin matriksden ayrılması sıvı kromatografi (LC) kısmında meydana gelir; hemen ardından analitler iyonlaşır, ilgili kütleler seçilir ve tandem kütle spektrometresi (MS/MS) kısmında tespit yapılır.



Şekil 2.10. LC-MS/MS sistemi

2.12.1. Sıvı kromatografi

HPLC, LC-MS/MS sisteminin ilk kısmıdır, bu kısımda bir analitik kolon kullanılarak sisteme enjekte edilen numunedeki analitlerin ayrımı gerçekleşir. Ayrımın çoğu, kolondaki sabit faz ile numunedeki analitlerin, bir mobil faz varlığındaki afinite farklılığına dayanır. Örneğin; bir ters-faz kromatografi esnasında (Bkz. Şekil 2.1), apolar bir analit, apolar bir sabit faza karşı yüksek bir afiniteye sahiptir ve polar bir mobil fazın kullanıldığı sistemde, C18 kolon üzerindeki ters-faz ayrım esnasında, yüksek bir alıkonma zamanı gözlenir. Eğer mobil fazın polaritesi azaltılırsa analitin mobil faza olan afinitesi artar ve bu durumda daha düşük bir alıkonma zamanı gözlenir. Bazı analitler, izokratik bir mobil faz uygulamasıyla numune matriksinden kolaylıkla ayrılırlar. Çok farklı kimyasal özelliklere sahip analitleri içeren bir karışımda ise farklı mobil fazların, farklı zamanlarda kullanılarak gradient bir mobil faz oluşturulmasıyla ayrım gerçekleştirilebilir. Belirli bir ayırma yöntemi için uygun analitik kolonun seçimi, çoğunlukla analitin kimyasal özellikleri ve numune matriksi yoluyla belirlenir. Bu nedenle, bir analitin polaritesinin yanında, asidik veya bazik fonksiyonel gruplarının olup olmadığı, kiral olup olmadığı, büyüklüğü gibi diğer özellikleri de alternatif ayırma stratejileri geliştirmek için araştırılmalıdır. LC-MS/MS sisteminde uygulanan diğer ayırma yöntemlerine örnek olarak; normal faz, hidrofobik etkileşim, iyon değişimi, afinite verilebilir [95].



Şekil 2.11. Ters faz sıvı kromatografinin şematik gösterimi [95]

2.12.2. Kütle spektrometri-ara yüz (İyonlaşma kaynağı)

Tandem kütle spektrometresi, LC-MS/MS'in ikinci kısmıdır ve bu kısımda; sıvı kromatografideki ayırmadan sonra, ilgili moleküllerin kütle seçimli tespiti gerçekleşir. Eluat akışı doğrudan tandem kütle spektrometreye iletilir. LC kısmının, MS/MS kısmına bağlanması için çözünmüş numune moleküllerini LC kısmından, gaz fazındaki iyonize olmuş moleküllere dönüştürecek bir ara yüz gereklidir. LC-MS/MS'de en sık kullanılan iyonlaşma tekniği elektrosprey iyonizasyondur (ESI). LC kısmından gelen ve ayrılmış analitleri içeren mobil faz, yüksek voltaj uygulanılabilen çok ince bir nano-sprey iğne ile atmosferik basınç altında püskürtülür ve damlacıklar halinde dağıtılır. Damlacıklar, iğneden çıkarken yüklüdürler. Sisteme verilen bir inert gaz (Azot) sayesinde çözücü damlacıklarının boyu küçülmeye ve yüklü analit moleküllerinin yükleri artmaya başlar. Bu işlem, çözücü damlacıkları tamamen buharlaşınca ve negatif veya pozitif yüklü serbest moleküller kalıncaya kadar devam eder. LC numune çözeltisinin bileşimi, iyonizasyon esnasında analit ile birleşecek moleküllerin oluşumuna etki eder. M molekülün pozitif yüklenmesinde; $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ ve negatif yüklenmesinde $[M-H]^-$ sıklıkla gözlenen moleküllerdir [95].

LC-MS/MS'de kullanılan bir diğer iyonlaşma tekniği atmosferik basınç kimyasal iyonizasyondur (APCI). Bu teknik esnasında, LC kısmından ayrılmış numune çözeltisi ısıtılmış bir tüp içerisine püskürtülür. Azot gaz akışının yardımıyla bu kısımda nano

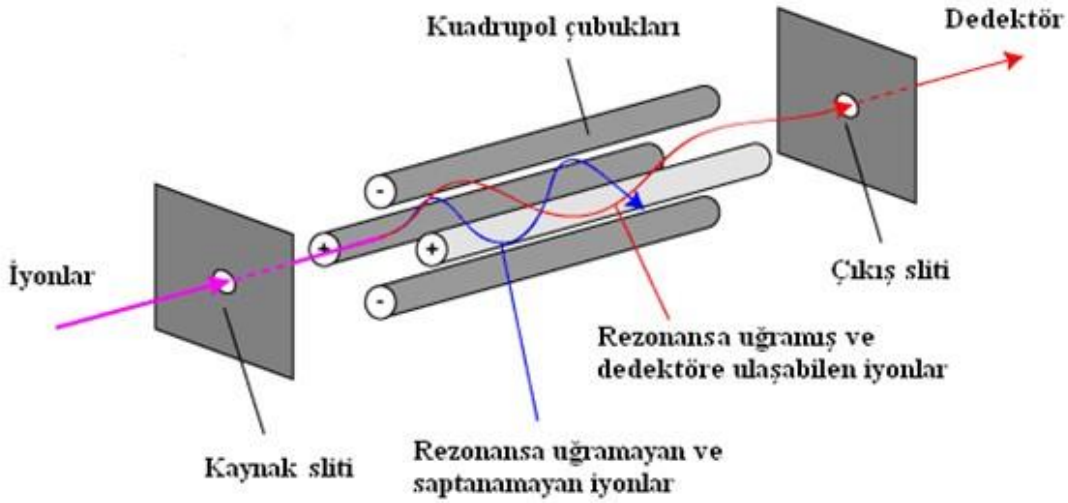
damlacıklar buharlaşırlar. Buharlaşma sonrasında çözücü molekülleri iyonlaşır. İyonlaşma tüpün dışında gerçekleşir. Çözücü ve analit arasındaki çarpışmalar ve yük transfer reaksiyonlarının etkisiyle $[M+H]^+$ ve $[M-H]^-$ iyonlarının oluşmasına yol açan proton transferi meydana gelir.

MS/MS'in hassasiyeti iyonlaşma etkisine doğrudan bağlıdır. APCI tekniği, düşük ile orta molekül kütleli apolar moleküller için daha iyi bir iyonlaşma sağlar. ESI tekniği ise, geniş bir molekül kütlesi aralığındaki polar ve orta derecede apolar bileşikler için daha iyi bir iyonlaşma performansı sağlar. ESI, özellikle buharlaştırılması ve iyonlaştırılması zor olan büyük biyolojik moleküller için faydalı bir iyonizasyon tekniğidir. Bu nedenle, ESI, LC-MS/MS yöntemlerinde en çok uygulanan tekniktir [95].

2.12.3. Tandem kütle spektrometri (MS/MS)

İyonlaşmadan sonra iyonlar, yüklü analitlerin tandem kütle spektrometrenin yüksek vakumuna girmesini sağlayan elektrik alan tarafından giriş deliğine doğru zorlanırlar. İyonlar, kütlelerine göre ilk seçimin yapıldığı kuadrupol 1'e girerler.

Kuadrupol, 4 paralel silindirik çubuktan oluşur ve bir elektrik alan meydana getirir. Kuadrupolde karşılıklı çubuklar aynı polaritede, komşu çubuklar zıt polaritededir. Her bir çubuğa doğru akım (DC) ve radyo frekansı (RF) voltaj uygulanır. Kuadrupol voltajları değiştirilerek iyonlar taranır. Kuadrupolde oluşan elektrik alan sadece seçilmiş kütle/yük (m/z) oranına sahip iyonların doğru yolu izleyerek kuadrupolden geçişine izin verir ve diğerlerini eler.

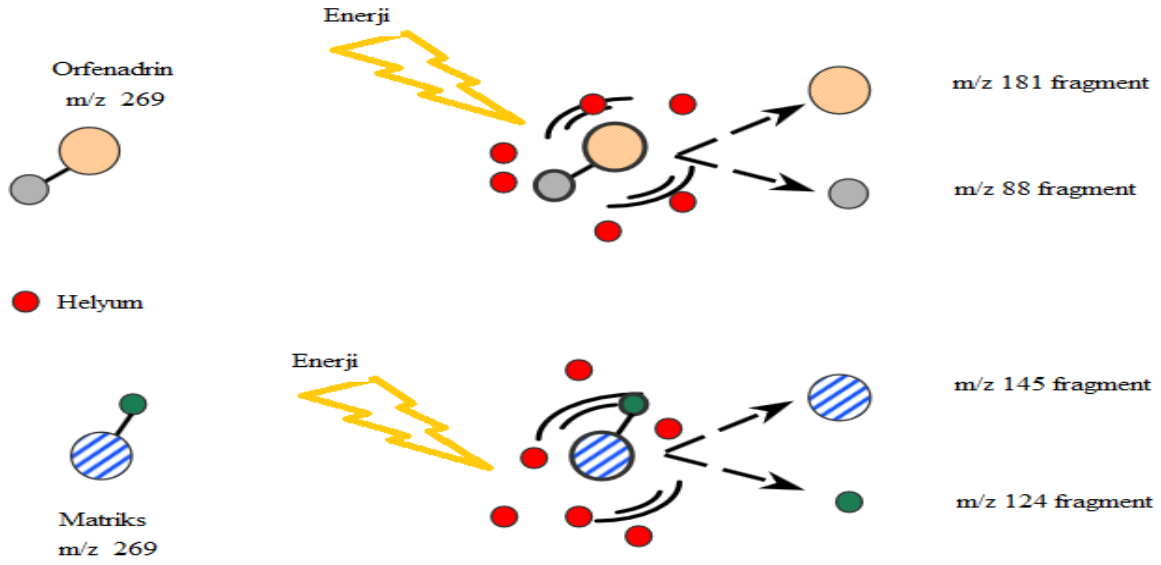


Şekil 2.12. Kuadrupolün yapısı [95]

Seçilmiş iyonlar kuadrupol 2 (collision cell)'ye gelerek, hafifçe artan bir basınçta ve Azot gibi bir gaz varlığında fragmentlerine ayrılırlar. Bu kısımdan sonra kuadrupol 3'e gelen analit fragmentlerinin m/z 'ye göre 2. seçimi gerçekleşir. Yüklü analitlerin veya fragmentlerin tespiti ve bir elektrik sinyaline dönüştürülmesi bir elektron çoğaltıcı dedektör tarafından gerçekleştirilir. Bu sinyal bilgisayara gönderilerek datalar elde edilir [95].

2.12.4. Kütle spektrometri tarama yöntemleri

Kütle spektrometride çeşitli tarama yöntemleri vardır. Bununla birlikte kantitatif MS/MS yöntemleri için SRM ve MRM yöntemi sıklıkla kullanılır. SRM (selected reaction monitoring) yönteminde, ilk kuadrupolde sadece ilgili analitin m/z (kütle/yük) oranı seçilir. 3. kuadrupolde, ise bu iyonun ait tek bir m/z fragmenti seçilir. Analitin başlangıç sinyali, ana iyonun 2. kuadrupolde çarpışmaya bağlı olarak parçalanmasının ardından azalsa da, bir analitik yöntemde SRM uygulanmasıyla çok yüksek bir hassasiyet elde edilir. Kütle spektrometride tek bir m/z geçişinin (SRM) yanı sıra, çoklu m/z geçişlerinin ölçümünün de yapıldığı MRM (multiple reaction monitoring) yöntemi de uygulanabilir. Belirli bir analit için, ana iyon ile fragment iyon çifti o analite özgü olduğundan, daha fazla iyon çifti izlenerek seçicilik artırılmış olur. Kütle spektrometride belirli bir analite ait fragmentlerin intensitelerinin oranı da o analite özgü olup, analitin doğru tespiti için değerlendirilmesi gereken bir husustur. Bunlara ilave olarak hedef analitin alıkonma zamanı da beraber değerlendirildiğinde kesin bir ölçüm olur [95].



Şekil 2.13. MRM yönteminin seçiciliği

Bir analiti analiz etmek için, MS/MS’de yöntem geliştirilirken cihazın çeşitli parametreleri optimize edilmelidir. Analit ile numune matrisi bileşenleri arasındaki girişimleri azaltmak ve analizin hassasiyetini artırmak için bu parametrelerin optimizasyonu büyük önem taşımaktadır.

2.13. Analitik Yöntem Validasyonu ve Validasyon Parametreleri

Validasyon, bir yöntemin ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için, yöntem parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. Kapsamlı validasyon, rutin kullanım öncesi yöntem performans kriterlerinden belirli bir kısmının incelenip, dökümanite edilmesi anlamına gelirken; tam validasyon yöntemin tüm performans kriterlerinin değerlendirilmesidir [96].

ISO/IEC 17025’in 5.4.5.2. bölümünde de belirtildiği gibi; standart olmayan yöntemler, laboratuvarında geliştirilen yöntemler, amacının dışında kullanılan standart yöntemler ya da değiştirilmiş standart yöntemler kullanıldığında validasyon gereklidir. FDA rehberinde yöntem validasyonu için incelenmesi önerilen performans kriterleri; seçicilik, LOD (Tespit Limiti), LOQ (Tayin Limiti), ölçüm aralığı ve linearite, doğruluk (geri kazanım) ve kesinlik (tekrarlanabilirlik-tekrar üretebilirlik) parametrelerinden oluşmaktadır [97].

2.13.1. Seçicilik

Seçicilik, bir analitik yöntemin aranan analiti diğer bileşenlerin bulunduğu numune içinde ayırt edebilme yeteneğine denir [97]. Seçiciliğin belirlenebilmesi için kör numuneye aranan analit eklenerek girişim oluşturup oluşturmadığı incelenir.

2.13.2. LOD ve LOQ

LOD (Tespit Limiti), tespit edilebilen, fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen ve analit sinyalinin, gürültüden ayrılabilmesi için gerekli olan en düşük derişimdir. LOQ (Tayin Alt Limiti) ise kabul edilebilir doğrulukta ve kesinlikte ölçülebilen en düşük derişimdir.

LOD ve LOQ değerleri hesaplanırken farklı yöntemler kullanılabilir. Yaygın kullanılan yöntemlerden birisi;

$LOD = 3 \times \text{Standart Sapma (SD)} / m$ (Kalibrasyon doğrusunun eğimi)

$LOQ = 10 \times \text{Standart Sapma (SD)} / m$ (Kalibrasyon doğrusunun eğimi) şeklinde yapılan hesaplamadır.

Eurachem rehberine göre ise, LOD ve LOQ değerlerini hesaplamak için, 10 bağımsız ölçüm yapılır. Ölçümlerin standart sapması hesaplanır. Standart sapma 3 ile çarpılarak LOD'nin ve 10 ile çarpılarak LOQ'nun sayısal değeri belirlenir. Ölçümler için ya kör numune ya da küçük bir derişimde ilgili analiti içeren numuneler kullanılır [98].

$$LOD = 3 \times \text{Standart Sapma (SD)} \quad (2.1)$$

$$LOQ = 10 \times \text{Standart Sapma (SD)} \quad (2.2)$$

2.13.3. Ölçüm aralığı ve doğrusallık

Ölçüm aralığı tespit çalışması, yöntemin uygulama aralığının belirlenmesi için yapılır. Kalibrasyon eğrisinde, ölçülen analitin derişimi ve dedektör yanıtının doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır [96].

Kalibrasyon eğrisi, yöntem ve ürüne bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans numuneyle veya kör numune içine eklenmiş analitin bilinen derişimi ile yapılır. FDA rehberinde en az 6 nokta, bir de kör eklenerek toplam 7 nokta olarak belirtilmiştir [97]. Sonuçlar grafiksel olarak verilir ve “regresyon eşitliği” ile “korelasyon katsayısı” belirtilir. Bu şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir. Regresyon hesabı için Excel’de bulunan formüllerden yararlanılabilir. Doğrusallık, korelasyon katsayısının hesaplanması yanında ANOVA tablosunda F değeri ile karşılaştırılarak da değerlendirilmelidir [96].

2.13.4. Doğruluk (geri kazanım)

Doğruluk, çok sayıdaki ölçüm sonucunun ortalamasının gerçek değere yakınlığıdır. Doğruluk için sistematik hata hesabı yapılır. Sistematik hatanın hesaplanabilmesi için doğru olduğu kabul edilen referans yani gerçek değer bilinmelidir. Gerçek değer; sertifikalı referans materyallerden, valide edilmiş yöntemin ölçümü sonucu veya yeterlilik testleri sonucunda elde edilebilir [96].

Doğruluğun tespiti için sertifikalı referans materyal, referans yöntem ve yeterlilik testinin bulunmadığı durumlarda geri kazanım çalışması yapılır. Geri kazanım çalışmasının en büyük avantajı orijinal matrikste çalışma yapılabilmesidir. Çalışmaların en az 3 farklı derişimde yapılması gerekir [96]. Geri kazanım çalışmasında aşağıdaki eşitlik kullanılır;

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar} - \text{Numunedeki miktar}}{\text{Spike edilen miktar}} \times 100 \quad (2.3)$$

Hesaplanan sistematik hatanın gerçek değerle arasında önemli bir farkının bulunup bulunmadığı t-testi yapılarak kontrol edilebilir.

$$t = \frac{|X_{\text{ortalama}} - \mu|}{SD/\sqrt{n}} \quad (2.4)$$

X_{ortalama} = Tekrarlanabilirlik veya tekrar üretebilirlik koşulları altında yapılan ölçümlerin ortalaması

μ = Bilinen değer (Zenginleştirme miktarı)

SD = Tekrarlanabilirlik veya tekrar üretilebilirlik koşulları altında yapılan ölçümlerin standart sapması

n = Tekrarlanabilirlik veya tekrar üretilebilirlik koşulları altında yapılan ölçümlerin sayısı

2.13.5. Kesinlik

Kesinlik, bağımsız ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir. Bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı ve rastgele hataların dağılımını gösterir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olarak iki genel kesinlik ölçümü bulunmaktadır [96].

Tekrarlanabilirlik, tekrarlanabilirlik koşulları altında elde edilen kesinliktir. Tekrarlanabilirlik koşulları; aynı yöntem ile eşdeğer numunelerde, aynı laboratuvar, aynı ekipman ve aynı analizci tarafından kısa zaman aralığında bağımsız test sonuçları elde edilmesi olarak tanımlanır. Koşulların yakınlığı nedeniyle beklenen kesinlik küçük olmaktadır [96].

Tekrar üretilebilirlik ise tekrar üretilebilirlik koşulları altında elde edilen kesinliktir. Tekrar üretilebilirlik koşulları; aynı yöntem ile eşdeğer numunelerde, aynı ya da farklı laboratuvar, farklı ekipman ve farklı analizciler tarafından uzun zaman aralığında bağımsız test sonuçlarının elde edilmesi olarak tanımlanmıştır [96].

Kesinlik, kantitatif analizlerde standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (RSD) olarak ifade edilir. Kesinliğin relatif standart sapma olarak ifadesi, derişimden bağımsız hale getireceği için kullanımda tercih edilmektedir [96].

Analitik yöntemlerin kesinliğinin kabul edilebilirliği konusunda basit bir performans parametresi olan Horwitz oranından ($HorRat$) faydalanılır. Her ne kadar laboratuvarlar arası $\%RSD$ ile ilgili geliştirilmiş olsa da laboratuvar içi $\%RSD$ için de uygulanabilmektedir. $HorRat$ değeri 2'den daha küçük olmalıdır. $HorRat$ hesabı için aşağıdaki formüller kullanılır [99]:

$$HorRat = \frac{\%RSD}{\%PRSD} \quad (2.5)$$

$$\%PRSD = 2x(C^{-0.15}) \quad (2.6)$$

Formülde yer alan "C" değeri derişim olup, örneğin; 1 ng/mL için 10^{-9} , 10 ng/mL için 10^{-8} ve 100 ng/mL için ise 10^{-7} dir.

2.13.6. Sağlamlık

Sağlamlık, analiz yöntemini uygularken koşullardaki bazı küçük değışikliklerin analiz sonuçları üzerine etkisini inceler. Bir yöntem koşullardaki ufak değışikliklerden ne kadar az etkileniyorsa o kadar sağlamdır. Sağlamlık çalışması yapılırken, üretim tarihi farklı kimyasallar, pH, sıcaklık, basınç gibi analiz sonucuna etki edebilecek faktörler tanımlandıktan sonra bu faktörler üzerinde küçük değışiklikler uygulanır ve analiz sonucuna etkisi belirlenir [96].

2.13.7. Ölçüm belirsizliğı

Belirsizlik, ölçüm sonucu ile beraber yer alan ve ölçülen büyüklüğe makul bir şekilde karşılık gelebilecek değerlerin dağılımını karakterize eden bir parametredir. Validasyon sırasında elde edilen veriler üzerinden gerçekleştirilen ölçüm belirsizliğı hesaplamalarında; tartım ve hacim belirsizlikleri, sıcaklık belirsizliğı gibi bileşenlerin etkileri geri kazanım, tekrarlanabilirlik ve laboratuvar-içi tekrarüretilebilirlik sonuçlarına zaten yansıdığından, bu bileşenlerden gelen belirsizliğin ayrıca hesaplamalara dahil edilmesine gerek yoktur. Geri kazanım verileri ile hesaplanan t-testi sonucunda $t = < t_{\text{tablo}}$ ise, geri kazanımdan gelen standart belirsizlik, t-testi için kullanılan eşitliğin paydasındaki değere eşittir. Elde edilen standart belirsizlik değeri yüzde ortalama geri kazanım değerine bölünerek relatif standart belirsizlik değeri elde edilir ve birleştirilmiş belirsizlik hesaplamalarında bu değer kullanılır. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilirlikten gelen belirsizlikleri hesaplamak için RSD değerleri kullanılarak RSD_{pool} ile her iki parametre için de birer RSD değeri hesaplanır ve birleştirilmiş belirsizlik hesaplamalarında doğrudan kullanılır. RSD_{pool} hesaplanırken aşağıdaki eşitlik kullanılır:

$$(RSD_{\text{pool}})^2 = \frac{(n_1-1) \times (RSD_1)^2 + (n_2-1) \times (RSD_2)^2 + \dots + (n_n-1) \times (RSD_n)^2}{(n_1-1) + (n_2-1) + \dots + (n_n-1)} \quad (2.7)$$

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

<i>Prokain</i>	Sigma-Aldrich
<i>İzoksuprin</i>	Sigma-Aldrich
<i>Niketamid</i>	Sigma-Aldrich
<i>Klorpromazin</i>	Sigma-Aldrich
<i>Flufenamik asit</i>	Sigma-Aldrich
Asetonitril	Sigma-Aldrich
Kloroform	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür	Scharlau
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich
Hidroklorik asit	Sigma-Aldrich
Metanol	Sigma-Aldrich
Karbon tetraklorür	Sigma-Aldrich
Diklorometan	Sigma-Aldrich
β -glukuronidaz	Sigma-Aldrich
Proteaz	Sigma-Aldrich

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Sıvı Kromatografi	Agilent 1200 (ABD)
Tandem Kütle Spektrometresi	Agilent 6460 (ABD)
LC kolon	Agilent Zorbax SB-C18 (ABD)
Santrifüj	Thermo Scientific Sorvall (ABD)
Vorteks	VELP Scientifica (İtalya)
Hassas terazi	Precisa (İsviçre)
Derin dondurucu	BEKO (Türkiye)
Etüv	Heraeus (Almanya)
Isıtıcı blok	Labnet (ABD)
Distile su cihazı	Millipore Milli-Q (ABD)
Otomatik pH robotu	Mettler Toledo (ABD)
Otomatik pipet	Eppendorf (Almanya)

3.2. Yöntem

3.2.1. LC-MS/MS optimizasyon çalışmaları

Analizler, elektro sprey iyonizasyonlu (ESI) LC-MS/MS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın başlangıcında fragmentör voltajı ve çarpışma enerjileri (collision energy) optimize edilmiştir ve analitler için uygun olan pozitif veya negatif iyonlaşma modları ile fragment iyonlar (product ions) belirlenmiştir. Optimizasyon esnasında sistemde kolon kullanılmamıştır.

Çizelge 3.1. Optimizasyon sonucu elde edilen MS/MS parametreleri

Madde Adı	Ana İyon	Fragment İyonlar	Fragmentör Voltajı (V)	Çarpışma Enerjisi (V)	İyonlaşma Modu
<i>Klorpromazin</i>	319	214	110	35	Pozitif
<i>Klorpromazin</i>	319	86,2	110	20	Pozitif
<i>İzoksuprin</i>	302,2	284,2	110	15	Pozitif
<i>İzoksuprin</i>	302,2	150,1	110	20	Pozitif
<i>Flufenamik asit</i>	280,1	236,1	100	15	Negatif
<i>Flufenamik asit</i>	280,1	176	100	20	Negatif
<i>Prokain</i>	237,2	120,1	80	25	Pozitif
<i>Prokain</i>	237,2	100,2	80	10	Pozitif
<i>Niketamid</i>	179,1	108	80	14	Pozitif
<i>Niketamid</i>	179,1	72,2	80	18	Pozitif

Analiz esnasında Zorbax SB-C18 (150x3 mm; 3,5 µm; 80 Å) kolon kullanılmıştır.

Analitlerin iyi ayrılabilmeleri için gradient akış kullanılmıştır. Mobil faz olarak;

- **A**-distile su - %0,1 formik asit
- **B**-metanol - %0,1 formik asit kullanılmıştır.

Analitlerin ayrımının en iyi olduğu uygun gradient akışın bulunması için, A mobil fazının oranının %5'e düştüğü ve B mobil fazının oranının %95'e çıktığı akış zamanında ufak değişiklikler yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar (Şekil 3.1.) sonucunda, en iyi kromatografik ayırım Çizelge 3.2.'de yer alan gradient akışla elde edilmiştir.

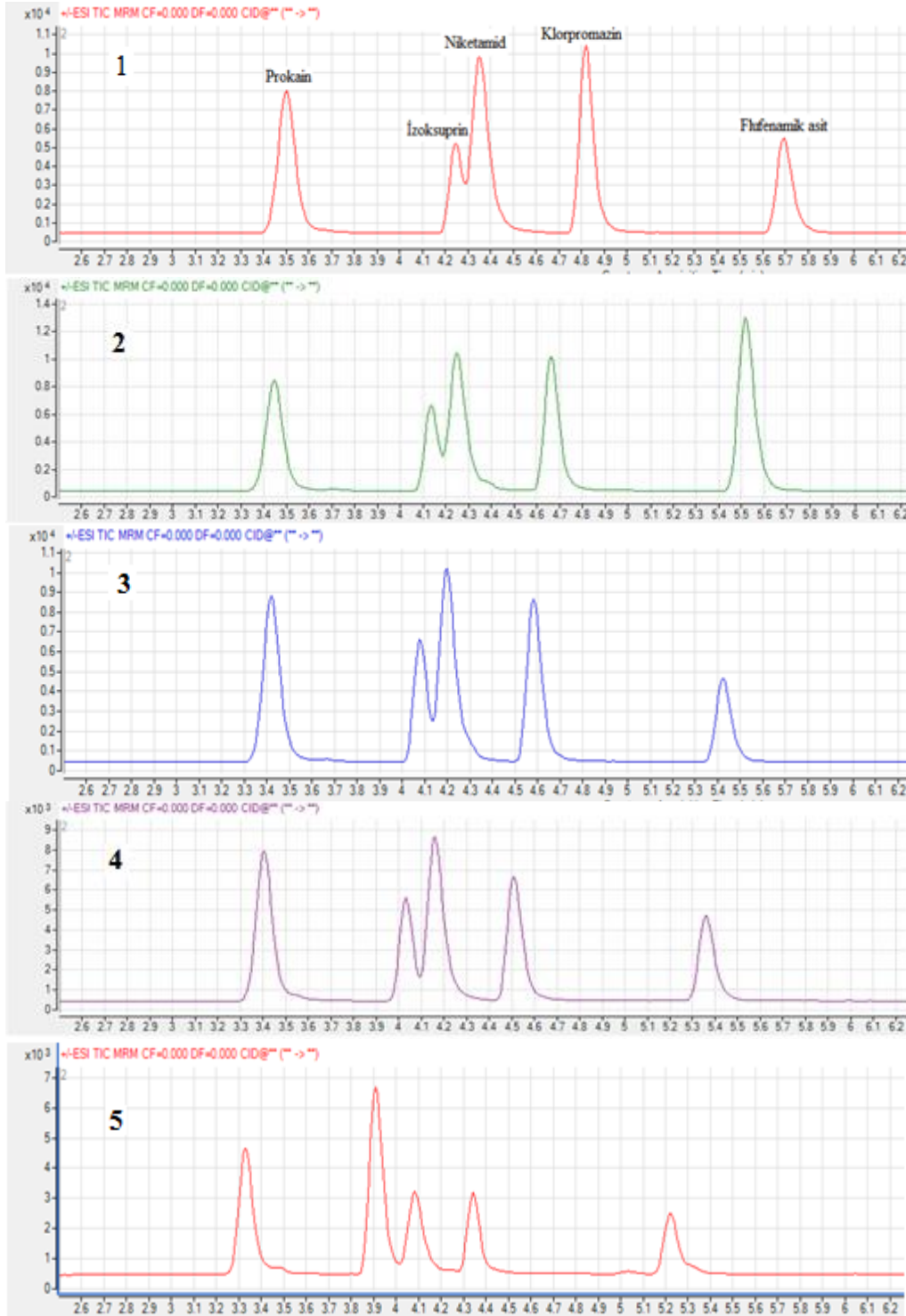
Çizelge 3.2. Gradient akış

Zaman	% A	% B
0,00	95,0	5,0
0,50	9,0	5,0
2,50	5,0	95,0
6,10	5,0	95,0
8,00	95,0	5,0

Analiz esnasında kullanılan diğer parametreler Çizelge 3.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. LC-MS/MS analiz parametreleri

Nebulizer basıncı	: 40 psi
Kurutucu gaz (Azot) sıcaklığı	: 330°C
Kurutucu gaz (Azot) akış hızı	: 10,0 L/dk
Enjeksiyon hacmi	: 4,8 µL
Akış hızı	: 0,5 mL/dk
Analiz süresi	: 9 dk
İyon tarama şekli	: MRM



Şekil 3.1. Gradient akışın analitlerin ayırımına etkisi

- (1) Gradient akıştaki mobil faz A, 2,90. dakikada %5'e düştüğünde,
- (2) Gradient akıştaki mobil faz A, 2,80. dakikada %5'e düştüğünde,
- (3) Gradient akıştaki mobil faz A, 2,70. dakikada %5'e düştüğünde,
- (4) Gradient akıştaki mobil faz A, 2,60. dakikada %5'e düştüğünde,
- (5) Gradient akıştaki mobil faz A, 2,50. dakikada %5'e düştüğünde.

3.2.2. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon

At idrar numunelerinin toplanması

At idrarı numuneleri Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Doping Kontrol Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Numuneler -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Standart çözeltilerin hazırlanması

Optimizasyon çalışmaları ile yöntem validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmaları için *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* standartları hassas terazide 1,0 mg tartılıp 50,0 mL metanol içerisinde çözülerek ana stok çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok çözeltiler metanolle seyreltilerek her bir madde için 10,0 µg/mL derişiminde standart çözeltiler elde edilmiştir. 10,0 µg/mL derişimindeki standart çözeltilerin her birinden 1,0'er mL alınıp, son hacim metanolle 50,0 mL'ye tamamlanarak 0,20 µg/mL derişiminde 5 maddeyi de içeren bir çözelti hazırlanmıştır. Bu standart çözelti kullanılarak spike idrar numuneleri hazırlanmıştır.

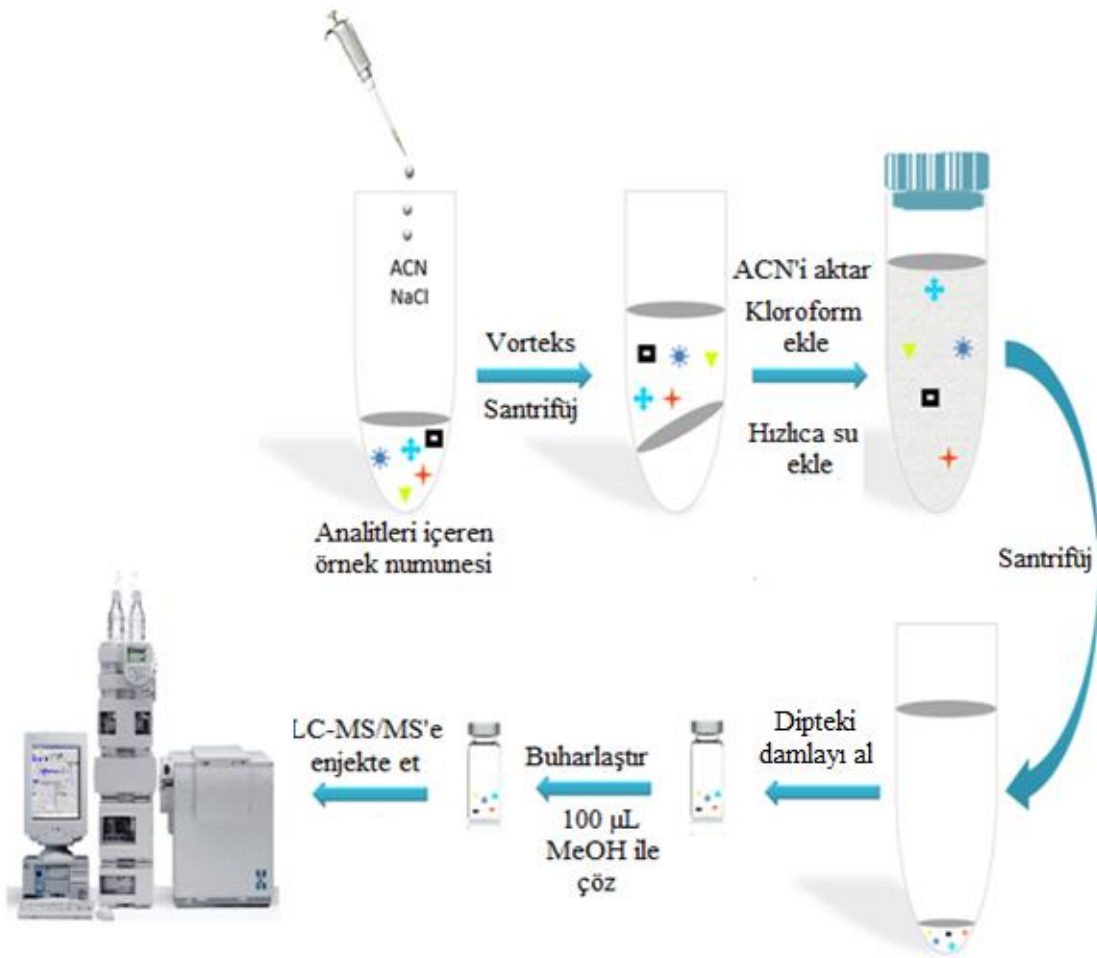
Enzimatik hidroliz

Prokain, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit*'i at idrarından analiz etmek için iki farklı yol izlenmiştir. At idrarı numunesi optimizasyon ya da validasyon çalışmaları için kullanılacaksa idrar numunesine enzim eklenmeden ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fakat dopingli çıkan atların idrar numuneleri analiz edilecekse, ilgili analitleri konjuge formlardan kurtarmak için enzimatik hidroliz işlemi yapılmıştır. Enzimatik hidroliz işlemi için; ekstraksiyona başlamadan önce, 1,0 mL at idrarı numunesinin pH'sı 6,0'ya ayarlandıktan sonra üzerine 50,0 µL β-glukuronidaz enzimi ve 50,0 µL Proteaz enzimi eklenip 3 saniye vorteks yapılmıştır ve daha sonra idrar numunesi 55°C'de etüvde 2 saat bekletilmiştir.

DLLME prosedürü

1,0 mL idrar numunesi temiz bir cam tüpe alınmıştır. Otomatik pH robotu kullanılarak idrar numunesinin pH'sı 6,0'ya ayarlanmıştır. Üzerine 900,0 mL asetonitril ve 180,0 mg NaCl

eklenmiştir. Vorteksle 3 saniye karıştırılmış ve 1 dakika (4000 rpm) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte oluşan yaklaşık 600,0 μL asetonitril fazı başka bir temiz cam tüpe aktarılmıştır. Üzerine 80,0 μL kloroform ilave edilmiş ve sonra 1250,0 μL distile su hızlı bir şekilde eklenmiştir. 3 saniye vorteksle karıştırılmış ve tekrar 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüpün dibinde oluşan damla bir mikropipet yardımıyla cam viale alınmıştır. Vialdeki organik çözücü buharlaştırılmış ve 100,0 μL metanol ile çözülerek LC-MS/MS'e enjekte edilmiştir.



Şekil 3.2. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon prosedürü

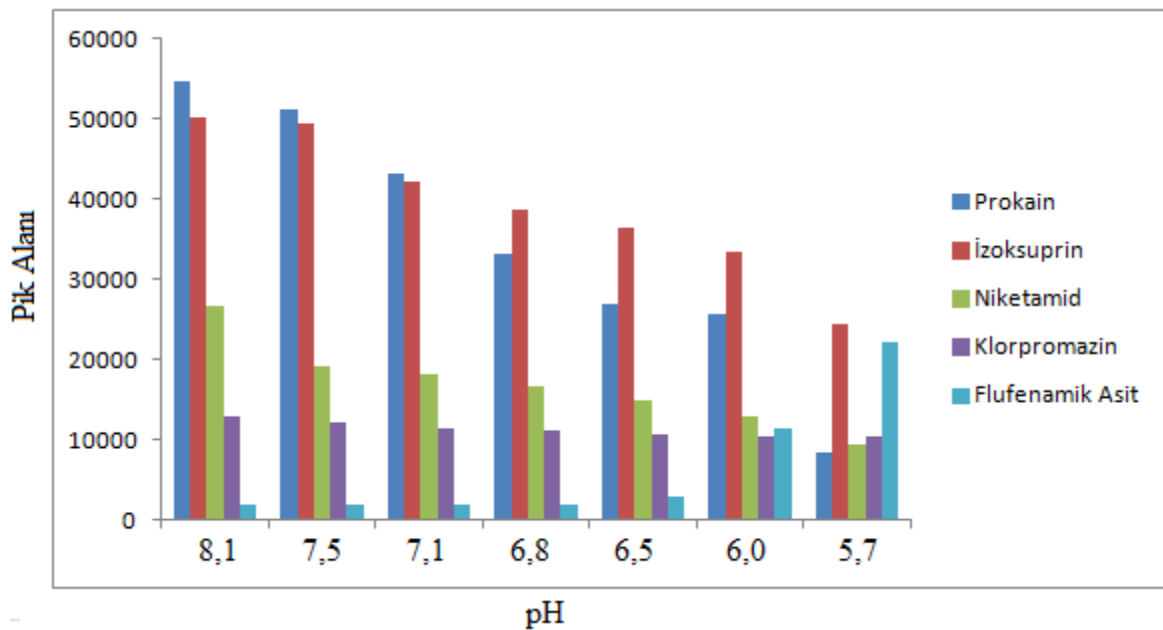
4. BULGULAR

4.1. Yöntem Geliştirme

Prokain, İzoksuprin, Niketamid, Klorpromazin ve Flufenamik asit'in, at idrarından analizi için dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Çeşitli basamaklardan oluşan yöntemin her bir basamağı için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır ve daha sonra geliştirilen yöntem sıvı kromatografi- tandem kütle spektrometresine uyarlanmıştır.

4.1.1. pH optimizasyonu

Prokain, İzoksuprin, Niketamid, Klorpromazin ve Flufenamik asit'in at idrarından analizinde pH önemli bir parametre olduğu için pH optimizasyonu çalışması yapılmıştır. Maddelerin asidik ve bazik özellikleri birbirinden oldukça farklı olduğu için 5 maddeyi de eşzamanlı olarak, tek bir yöntem ile at idrarından analiz edebilmek için pH 7'ye yakın değerlerde bir optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. At idrarının pH'sının otomatik pH robotu ile 5,7; 6,0; 6,5; 6,8; 7,1; 7,5 ve 8,1'e ayarlanarak yapılan optimazyon çalışmasına ait sonuçlar Şekil 4.1.'de görülmektedir.

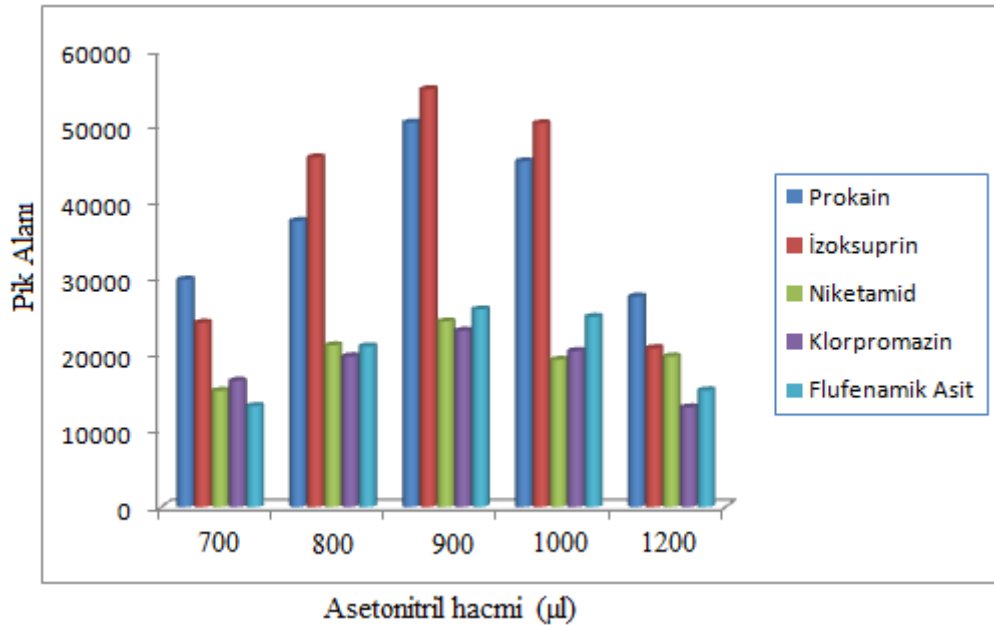


Şekil 4.1. pH değerinin analitlerin pik alanlarına etkisi (ACN: 1 mL, NaCl: %20, H₂O: 2 mL, CHCl₃: 75 µL, Spike: 5 ng/mL)

Optimizasyon çalışması sonucunda, idrarın pH'sının düşmesiyle *Prokain*'in, *İzoksuprin*'in ve *Niketamid*'in intensitelerinin azaldığı ve *Flufenamik asit*'in intensitesinin arttığı gözlenmiştir. *Klorpromazin*'in intensitesinin pH değişiminden çok fazla etkilenmediği görülmüştür. Optimizasyon çalışmasının amacı; bu beş doping maddesini eşzamanlı ve hassas bir şekilde analiz edebilmek olduğundan, *Prokain*'in intensitesinin çok fazla azalmadan, *Flufenamik asit*'in intensitesinin önemli derecede arttığı pH 6,0 değeri optimum pH değeri olarak belirlenmiştir.

4.1.2. Dispersif çözücü (asetonitril) hacmi optimizasyonu

Prokain, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit*'in dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemiyle at idrarından analizinde, ekstraksiyon verimi açısından, dispersif çözücünün hacmi önemli bir parametredir. En uygun hacmi belirlemek için sırasıyla 700, 800, 900, 1000 ve 1200 μL asetonitril kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasına ait sonuçlar Şekil 4.2.'de görülmektedir.

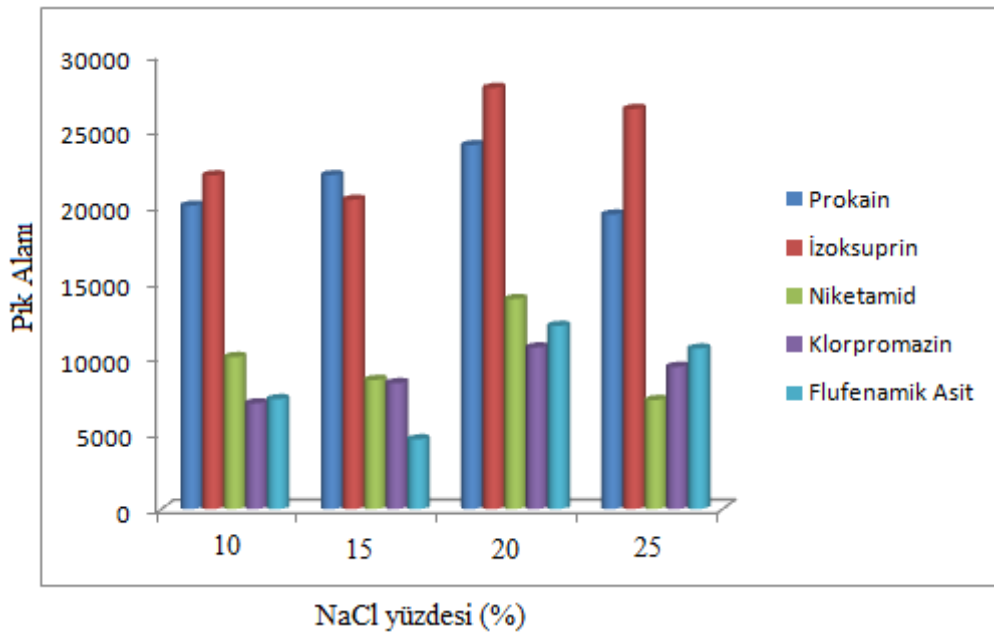


Şekil 4.2. Asetonitril hacminin analitlerin pik alanlarına etkisi (NaCl: %20, H₂O: 2 mL, pH: 6, CHCl₃: 75 μL , Spike: 10 ng/mL)

Asetonitrilin hacmini belirlemek için yapılan optimizasyon çalışmasına göre en iyi sonuç, 900 μL hacim ile elde edilmiştir.

4.1.3. %NaCl (m/v[asetonitril hacmi]) optimizasyonu

Asetonitril hacmine göre kütlege %5, %10, %15, %20 ve %25 NaCl kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında; %5 (m/v) NaCl için 45,0 mg, %10 (m/v) NaCl için 90,0 mg, %15 (m/v) NaCl için 135,0 mg, %20 (m/v) NaCl için 180,0 mg ve %25 (m/v) NaCl için 225,0 mg NaCl kullanılmıştır. %5 NaCl kullanılarak yapılan deneyde faz ayrımı gerçekleşmediği için çalışmaya devam edilmemiştir. Optimizasyon çalışması sonuçları Şekil 4.3.'de görülmektedir.

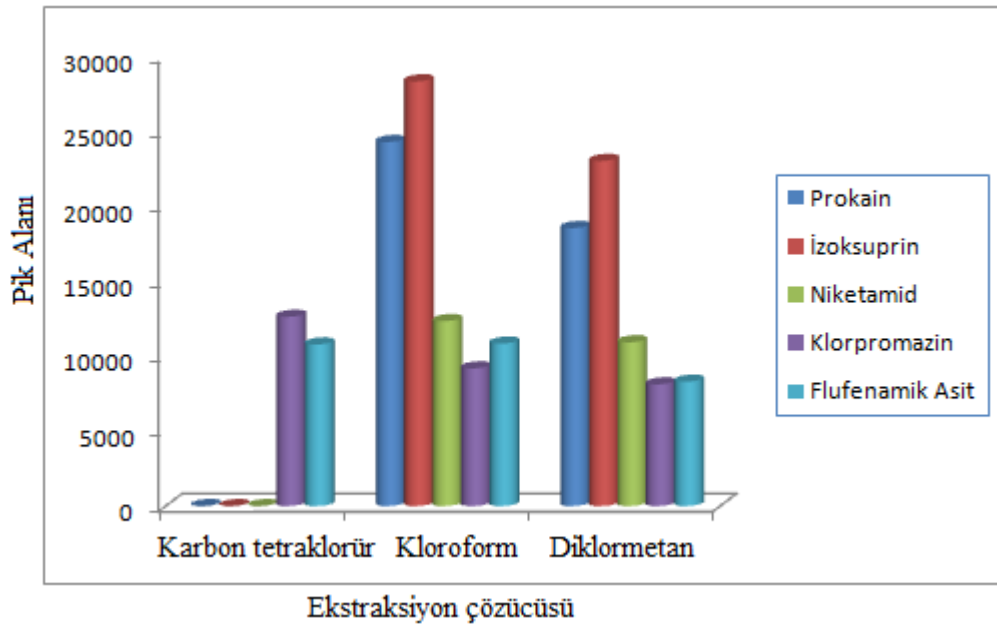


Şekil 4.3. %NaCl miktarının analitlerin pik alanlarına etkisi (ACN: 900 μ L, H₂O: 2 mL, pH: 6, CHCl₃: 75 μ L, Spike: 5 ng/mL)

%NaCl miktarını belirlemek için yapılan optimizasyon çalışmasına göre en iyi sonuç, %20 NaCl miktarı ile elde edilmiştir.

4.1.4. Ekstraksiyon çözücüsü optimizasyonu

Mikroekstraksiyonda kullanılacak ekstraksiyon çözücüsünün belirlenmesi için optimizasyon çalışması yapılmıştır. En yüksek ekstraksiyon verimliliğini sağlayan organik çözücünün seçimi için kloroform, karbon tetraklorür ve diklorometan kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasına ait sonuçlar Şekil 4.4.'de görülmektedir.

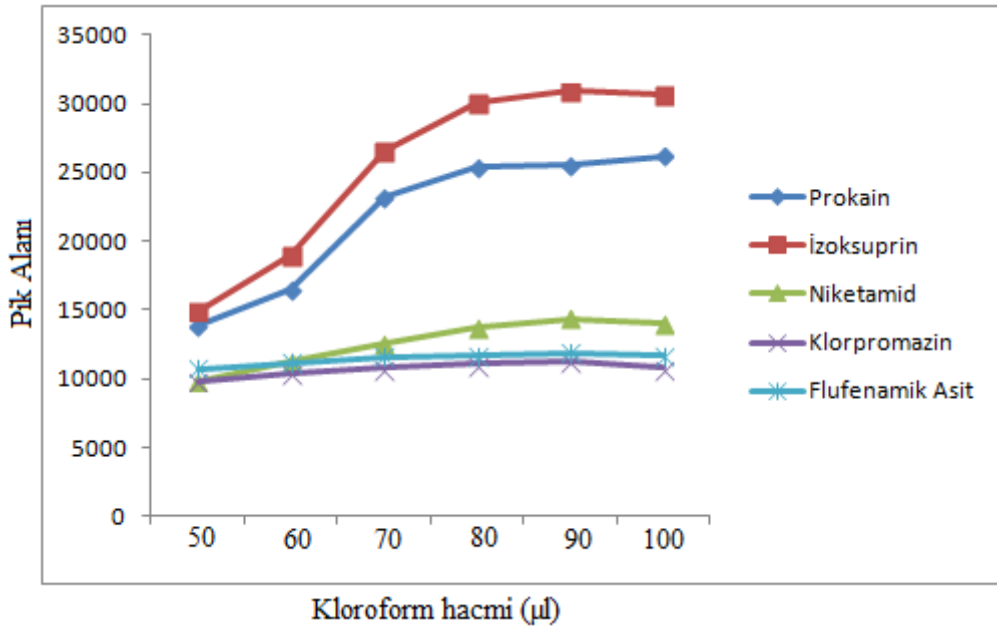


Şekil 4.4. Organik çözütülerin analitlerin pik alanlarına etkisi (ACN: 900 μ L, NaCl: %20, H₂O: 2 mL, pH: 6, CCl₄: 75 μ L, CHCl₃:75 μ L, CH₂Cl₂: 75 μ L, Spike: 5 ng/mL)

En uygun ekstraksiyon çözütüsünü belirlemek için yapılan optimizasyon çalışmasına göre, ekstraksiyon çözütüsü olarak karbon tetraklorür kullanıldığında *Prokain*, *İzoksuprin* ve *Niketamid*'in idrardan analizi mümkün olmamıştır. Diklorometan ve kloroform kullanılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında ise en yüksek ekstraksiyon veriminin kloroform kullanılarak elde edildiği görülmüştür.

4.1.5. Ekstraksiyon çözütüsü (kloroform) hacmi optimizasyonu

Prokain, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit*'in dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemiyle at idarından analizinde ekstraksiyon çözütüsünün hacmi, hassasiyeti etkilediğinden dolayı, optimize edilmesi gereken bir parametredir. 50,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 ve 100,0 μ L kloroform kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasına ait sonuçlar Şekil 4.5.'de görülmektedir.

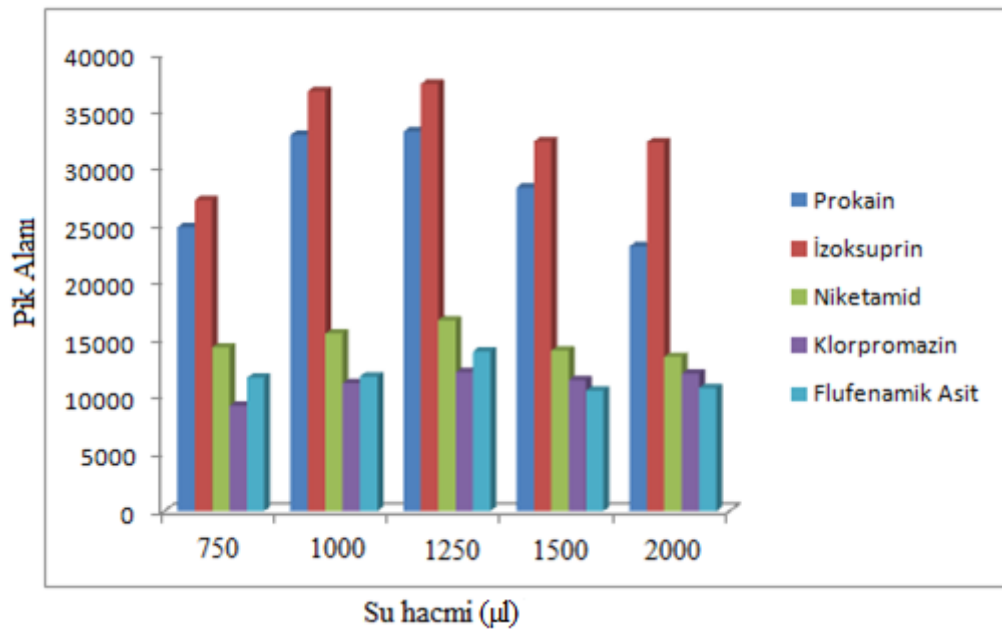


Şekil 4.5. Kloroform hacminin analitlerin pik alanlarına etkisi (ACN: 900 µL, NaCl: %20, H₂O: 2 mL, pH: 6, Spike: 5 ng/mL)

Optimum kloroform hacmini belirlemek amacıyla yapılan optimizasyon çalışmasına göre; kloroform hacminin artışıyla, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asitin* intensitelerinde fazla bir değişiklik gözlenmemiştir. Bununla birlikte; kloroform hacmi arttıkça diğer 3 maddenin intensitelerinde önce artış görülmüş fakat 80,0 µL kloroform hacminden itibaren intensitelerinde önemli derecede bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu nedenle geliştirilen dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminde optimum kloroform hacmi 80,0 µL olarak belirlenmiştir.

4.1.6. Distile su hacmi optimizasyonu

Prokain, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asitin* at idarından analizinde, ekstraksiyon esnasında kullanılacak distile suyun hacmi optimize edilmiştir. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonda eklenen distile suyun hacmi, dolayısıyla distile su-asetonitril oranı çeşitli faktörlere bağlı olarak analitlerin organik faza geçiş miktarını etkilemektedir. 500, 750, 1000, 1250, 1500 ve 2000 µL distile su kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasına ait sonuçlar Şekil 4.6.'da görülmektedir.

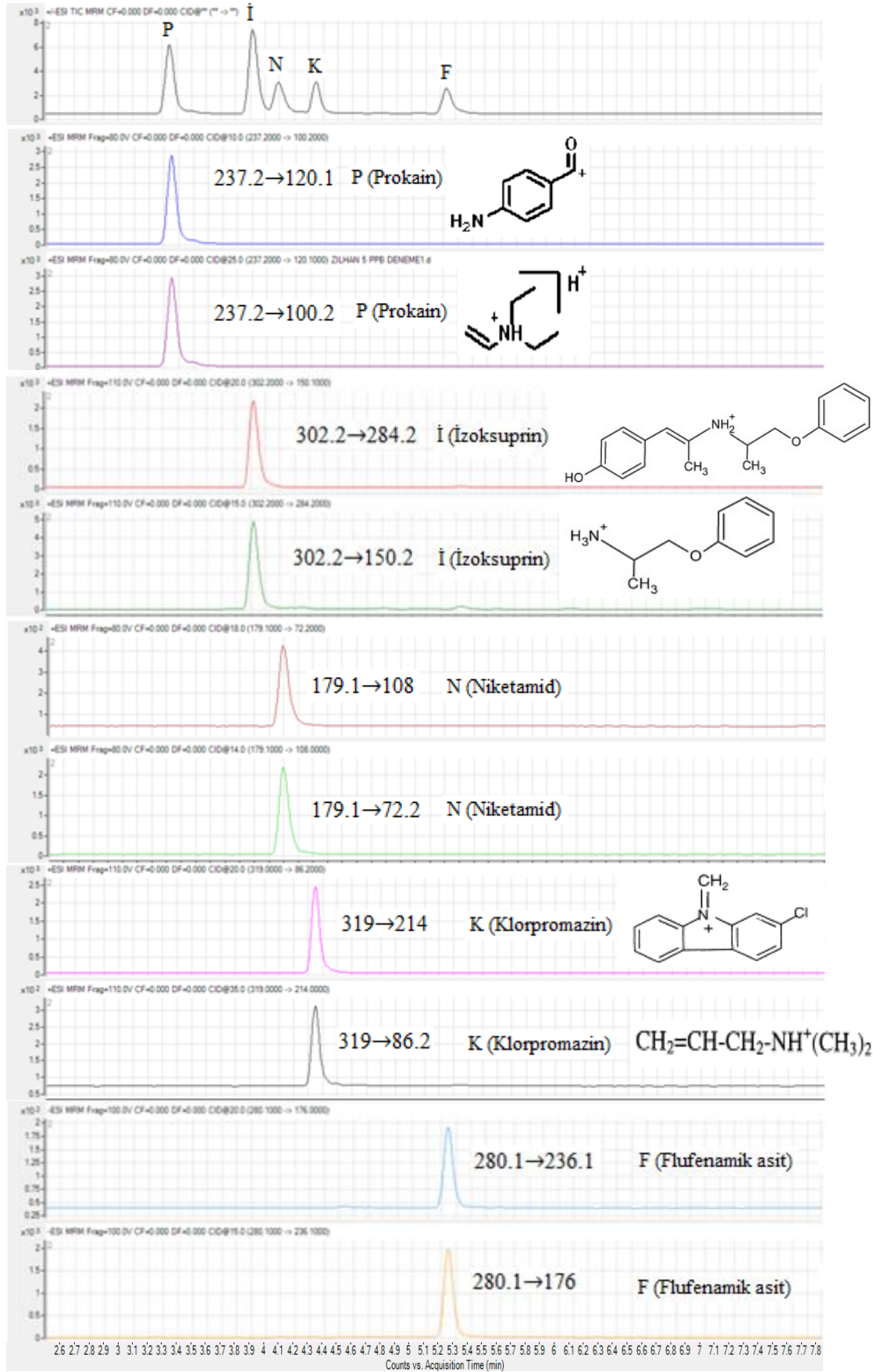


Şekil 4.6. Distile su hacminin analitlerin pik alanlarına etkisi (ACN: 900 µL, NaCl: %20, CHCl₃: 80 µL, pH:6, Spike: 5 ng/mL)

En uygun distile su hacmini belirlemek için yapılan optimizasyon çalışmasında, 500 µL distile su kullanılarak yapılan deneyde organik damlanın oluşumu gözlenmemiştir. Ayrıca optimizasyon çalışması esnasında distile su hacmi arttıkça tüpün dibinde biriken organik damla miktarının azaldığı ve daha kirli bir görünüme sahip olduğu gözlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmasına göre en iyi sonuç 1250 µL distile su hacmi ile elde edilmiştir.

4.1.7. Santrifüj süresi optimizasyonu

En uygun santrifüj süresini belirlemek için yapılan optimizasyon çalışmasında, distile su ve kloroform ilavesinden sonraki santrifüj basamağında sırasıyla; 1, 2, 3, 4 ve 5 dakikalık santrifüj sürelerinde ve 4000 rpm'de deneyler yapılmıştır. Yapılan optimizasyon çalışmasının sonucunda santrifüj süresinin ekstraksiyon verimine bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu nedenle santrifüj süresi 1 dakika olarak belirlenmiştir.



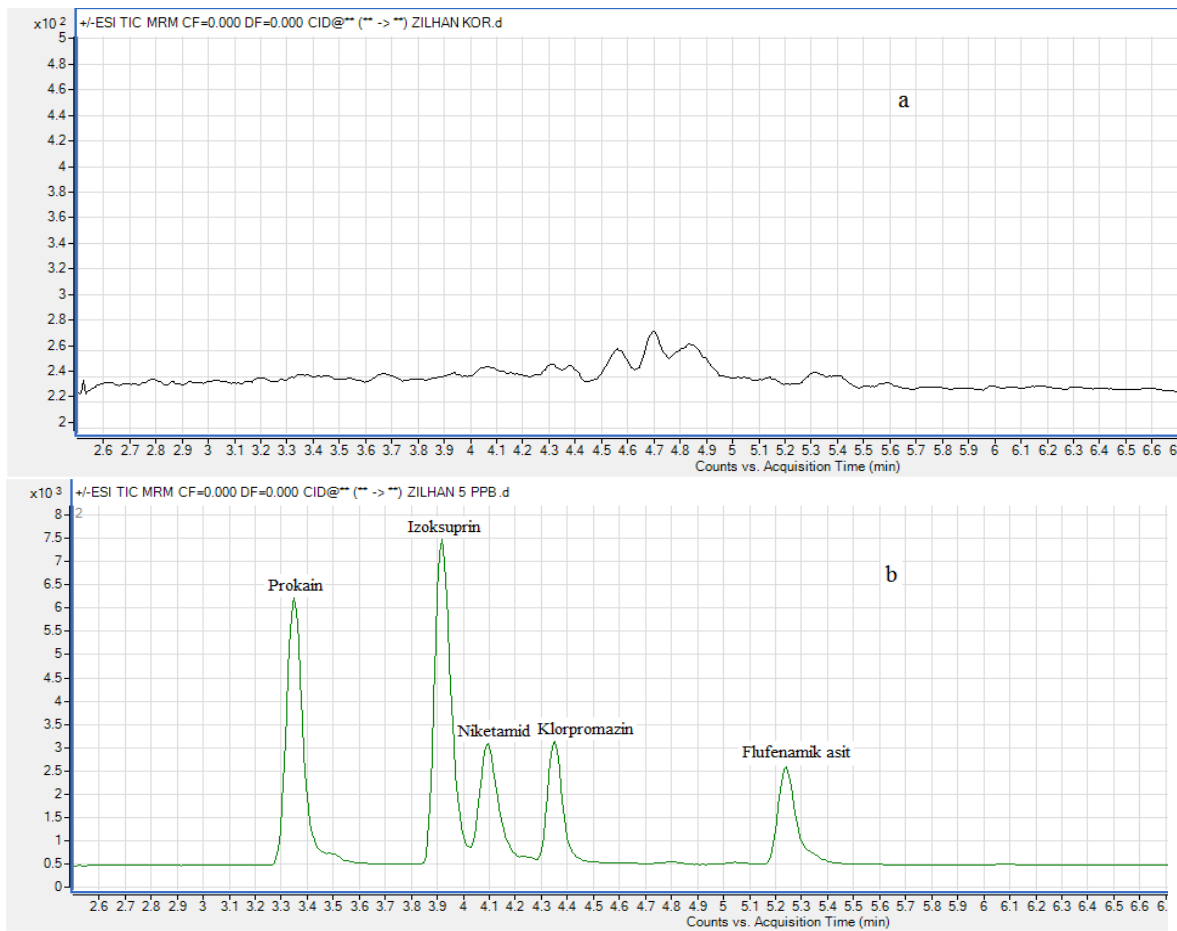
Şekil 4.7. Analitlerin fragmentlerine ait pikler (Spike:5 ng/mL)

4.2. Validasyon ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplamaları

Geliştirilen dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi; seçicilik, LOD, LOQ, ölçüm aralığı ve doğrusallık, doğruluk (geri kazanım), kesinlik (tekrarlanabilirlik-tekrar üretilebilirlik) ve sağlamlık parametreleri yönünden incelenmiş ve validasyonu yapılmıştır.

4.2.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliği için doping maddesi ihtiva etmeyen (boş) at idrarı örneğinin ve boş at idrarı örneğine eklenen 5,0 ng/mL düzeyindeki *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit*'in kromatogramları karşılaştırılmıştır. Boş at idrar örneği ile *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* eklenmiş at idrarı örneğinin TIC (Total Ion Chromatogram) kromatogramı Şekil 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Boş at idrarı (a) ve 5,0 ng/mL spike yapılmış at idrarına (b) ait kromatogramlar

4.2.2. LOD ve LOQ

LOD ve LOQ çalışmaları için, 1,0 mL'lik boş idrar numuneleri üzerine *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit*'i içeren standart karışımından ölçüm sonucu 1,0 ng/mL olacak şekilde hazırlanan spike numuneleri kullanılmış ve 10 kez ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçümlerin standart sapması 3 ile çarpılarak LOD'nin ve 10 ile çarpılarak LOQ'nun sayısal değeri belirlenmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.1.-4.5.'de yer almaktadır.

Çizelge 4.1. *Prokain*'in LOD ve LOQ değerleri

Ölçüm sayısı	Ölçüm sonucu ng/mL
1	0,97
2	0,99
3	1,01
4	0,98
5	1,03
6	0,97
7	0,96
8	0,98
9	0,97
10	0,96
SD: 0,023	
LOD = 3 x SD = 0,07 ng/mL	
LOQ = 10 x SD = 0,23 ng/mL	

Çizelge 4.2. *İzoksuprin*'in LOD ve LOQ değerleri

Ölçüm sayısı	Ölçüm sonucu ng/mL
1	0,99
2	0,98
3	0,96
4	0,98
5	1,01
6	0,99
7	0,96
8	0,98
9	0,97
10	1,02
SD: 0,020	
LOD = 3 x SD = 0,06 ng/mL	
LOQ = 10 x SD = 0,20 ng/mL	

Çizelge 4.3. *Niketamid*'in LOD ve LOQ değerleri

Ölçüm sayısı	Ölçüm sonucu ng/mL
1	0,99
2	0,98
3	1,03
4	0,97
5	0,98
6	0,96
7	1,04
8	0,98
9	0,99
10	0,97
	SD: 0,026
LOD = 3 x SD = 0,08 ng/mL	
LOQ = 10 x SD = 0,26 ng/mL	

Çizelge 4.4. *Klorpromazin*'in LOD ve LOQ değerleri

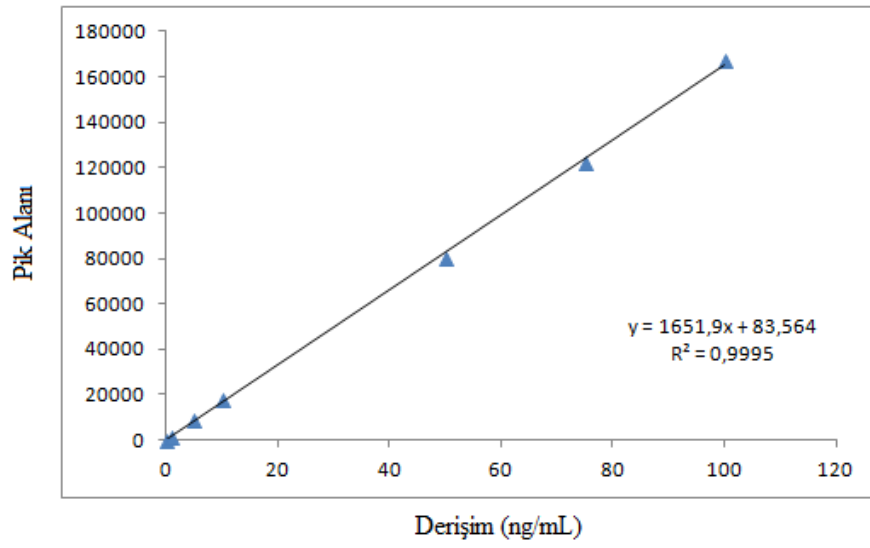
Ölçüm sayısı	Ölçüm sonucu ng/mL
1	0,95
2	0,96
3	1,02
4	1,05
5	0,96
6	0,97
7	0,96
8	0,98
9	0,99
10	0,97
	SD: 0,031
LOD = 3 x SD = 0,09 ng/mL	
LOQ = 10 x SD = 0,31 ng/mL	

Çizelge 4.5. *Flufenamik asit*'in LOD ve LOQ değerleri

Ölçüm sayısı	Ölçüm sonucu ng/mL
1	0,97
2	0,99
3	0,98
4	1,03
5	1,02
6	0,99
7	1,03
8	0,97
9	0,98
10	0,97
	SD: 0,025
LOD = 3 x SD = 0,075 ng/mL	
LOQ = 10 x SD = 0,25 ng/mL	

4.2.3. Ölçüm aralığı ve doğrusallık

Kalibrasyon eğrisini çizmek için, boş idrar numunesi ve yöntemde belirtilen standart çözeltileri ile 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 75,0; 100,0 ng/mL *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* içeren idrar numuneleri hazırlanıp Bölüm 3.2.2.'de anlatılan ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Boş idrar numunesiyle birlikte toplam 7 farklı düzeyde hazırlanan numunelerin LC-MS/MS'e enjeksiyonuyla elde edilen analiz sonuçları ile Microsoft Excel programından yararlanılarak kalibrasyon eğrisi grafiği çizdirilmiş ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Doğrusallığın belirlenmesi için ANOVA regresyon analizi kullanılmış ve F testi yapılmıştır. Her bir maddeye ait kalibrasyon eğrisi ve cihazdan her bir derişim için okunan sonuçların kalibrasyon eğrisi denklemi ile hesaplanıp olması gereken derişimlere karşı oluşturulan grafikler Şekil 4.9.- 4.18.'de verilmiştir. Kalibrasyon eğrisine ilişkin regresyon analizi sonuçları Çizelge 4.6. - 4.10.'da verilmiştir. Ayrıca her bir maddeye ait 1,0 ng/mL seviyesindeki MRM pikleri Şekil 4.19 - 4.23'de verilmiştir.



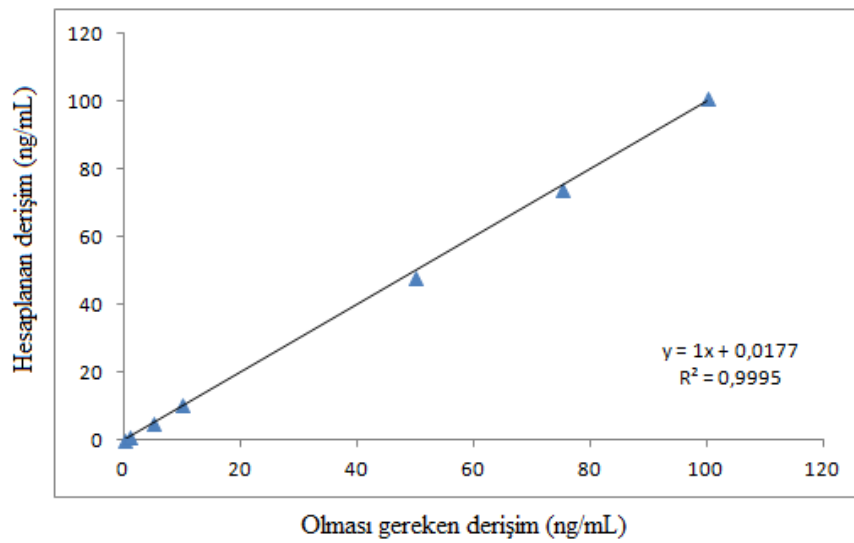
Şekil 4.9. *Prokain*'in kalibrasyon eğrisi (n=7)

Çizelge 4.6. *Prokain*'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel verileri (n=7)

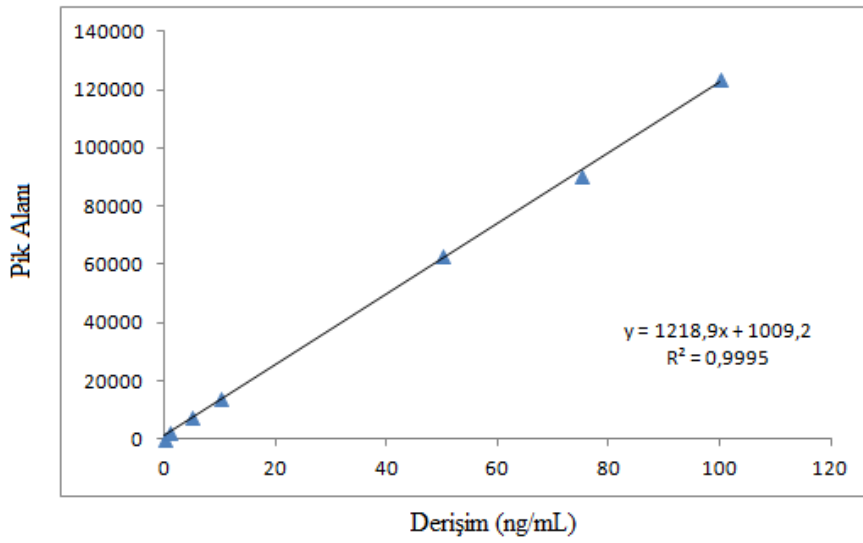
Regresyon denklemleri ($y=mx\pm n$)*	$y=1651,9 x + 83,564$
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9995
Korelasyon katsayısı (r)	0,9997
Eğimin standart hatası	16,97
Kesişimin standart hatası	866,30
Doğrusallık aralığı (ng/mL)	0,23-100
p**	0,93 > 0.05
F***	9480,0 > $F_{\text{tablo}} = 6,61$

*y=pık alanı, x=derişim, m=eğim, n=kesişim

Kesişimin p değeri, *Korelasyon katsayısının F değeri



Şekil 4.10. *Prokain*'in yöntem doğrusallığının kontrol grafiği (n=7)



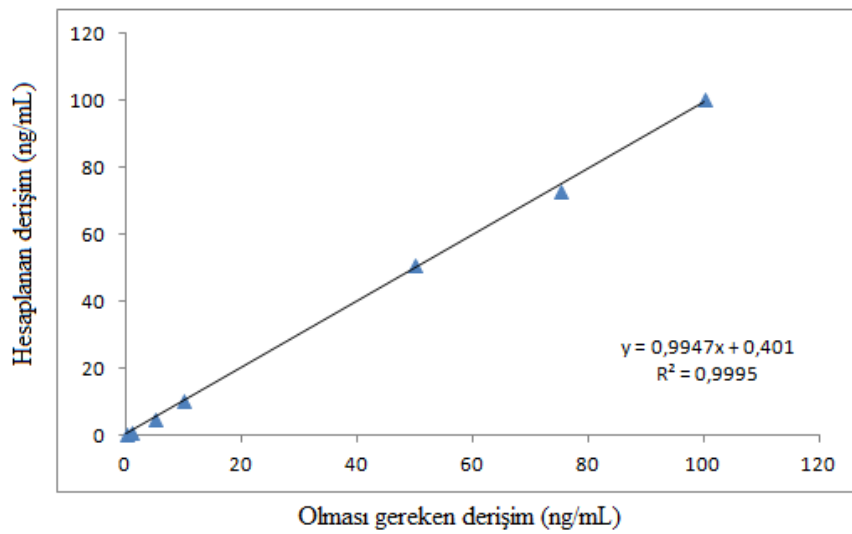
Şekil 4.11. *İzoksuprin*'in kalibrasyon eğrisi (n=7)

Çizelge 4.7. *İzoksuprin*'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel verileri (n=7)

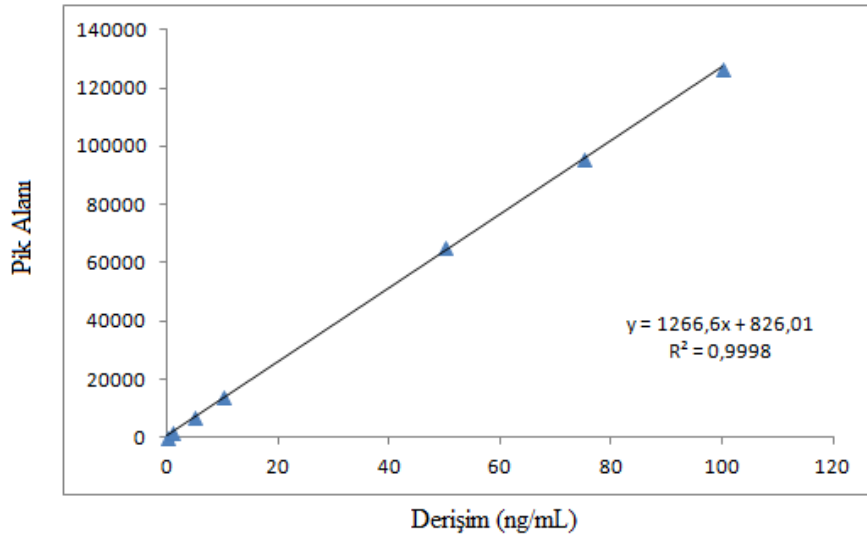
Regresyon denklemleri ($y=mx\pm n$)*	$y=1218,9 x + 1009,2$
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9995
Korelasyon katsayısı (r)	0,9997
Eğimin standart hatası	12,55
Kesişimin standart hatası	640,63
Doğrusallık aralığı (ng/mL)	0,20-100
p**	0,18 > 0,05
F***	9438,3 > $F_{\text{tablo}} = 6,61$

*y=pık alanı, x=derişim, m=eğim, n=kesişim

Kesişimin p değeri, *Korelasyon katsayısının F değeri



Şekil 4.12. *İzoksuprin*'in yöntem doğrusallığının kontrol grafiği (n=7)



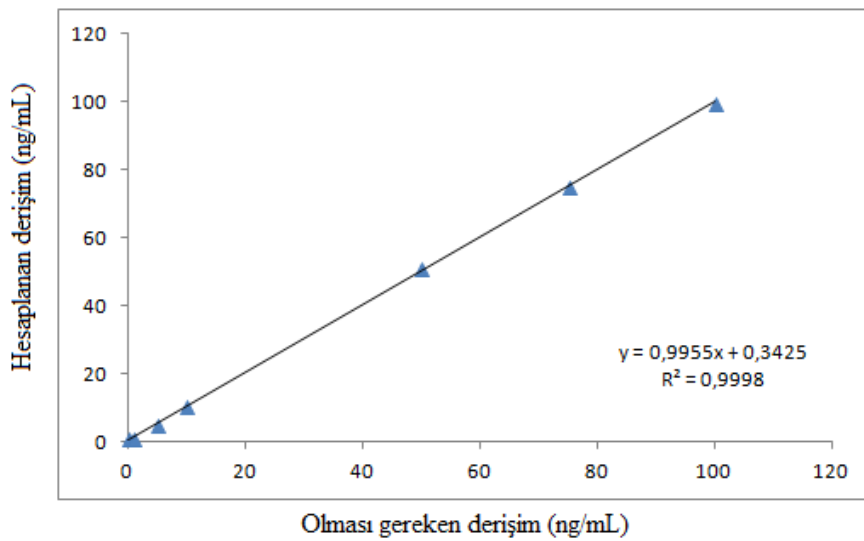
Şekil 4.13. *Niketamid*'in kalibrasyon eğrisi (n=7)

Çizelge 4.8. *Niketamid*'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel verileri (n=7)

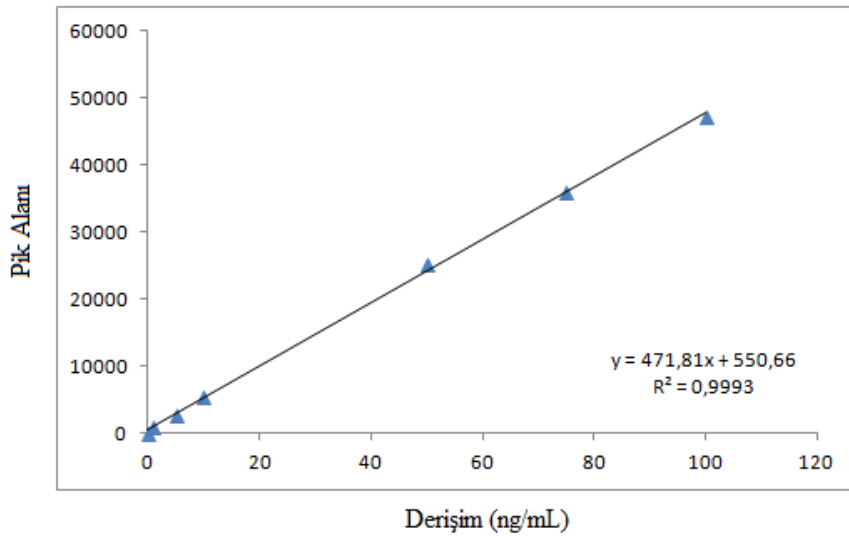
Regresyon denklemleri ($y=mx\pm n$)*	$y=1266,6 x + 826,01$
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9998
Korelasyon katsayısı (r)	0,9999
Eğimin standart hatası	8,39
Kesişimin standart hatası	428,56
Doğrusallık aralığı (ng/mL)	0,26-100
p**	0,11 > 0,05
F***	22775,2 > $F_{\text{tablo}} = 6,61$

*y=pık alanı, x=derişim, m=eğim, n=kesişim

Kesişimin p değeri, *Korelasyon katsayısının F değeri



Şekil 4.14. *Niketamid*'in yöntem doğrusallığının kontrol grafiği (n=7)



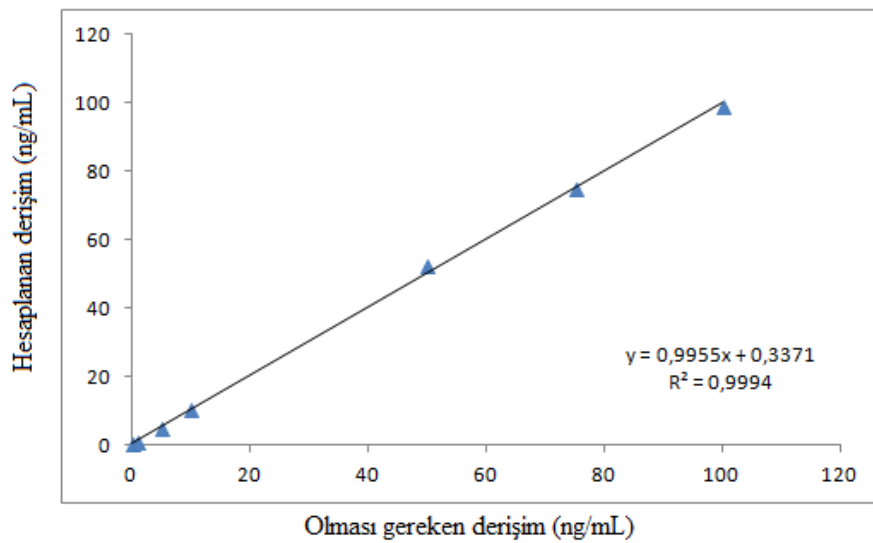
Şekil 4.15. *Klorpromazin*'in kalibrasyon eğrisi (n=7)

Çizelge 4.9. *Klorpromazin*'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel verileri (n=7)

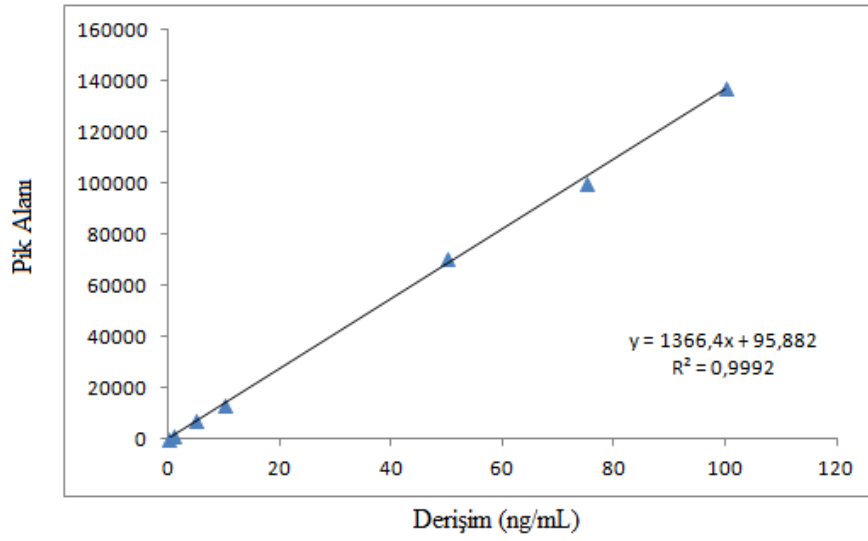
Regresyon denklemleri ($y=mx\pm n$)*	$y=471,81 x + 550,66$
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9993
Korelasyon katsayısı (r)	0,9996
Eğimin standart hatası	5,73
Kesişimin standart hatası	292,39
Doğrusallık aralığı (ng/mL)	0,31-100
p**	0,12 > 0,05
F***	6788,88 > $F_{\text{tablo}} = 6,61$

*y=pık alanı, x =derişim, m=eğim, n=kesişim

Kesişimin p değeri, *Korelasyon katsayısının F değeri



Şekil 4.16. *Klorpromazin*'in yöntem doğrusallığının kontrol grafiği (n=7)



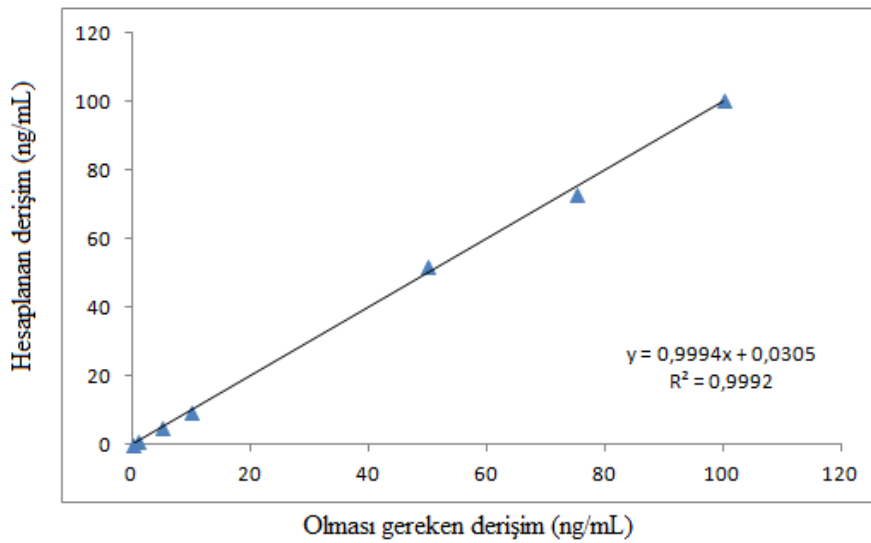
Şekil 4.17. *Flufenamik asit*'in kalibrasyon eğrisi (n=7)

Çizelge 4.10. *Flufenamik asit*'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel verileri (n=7)

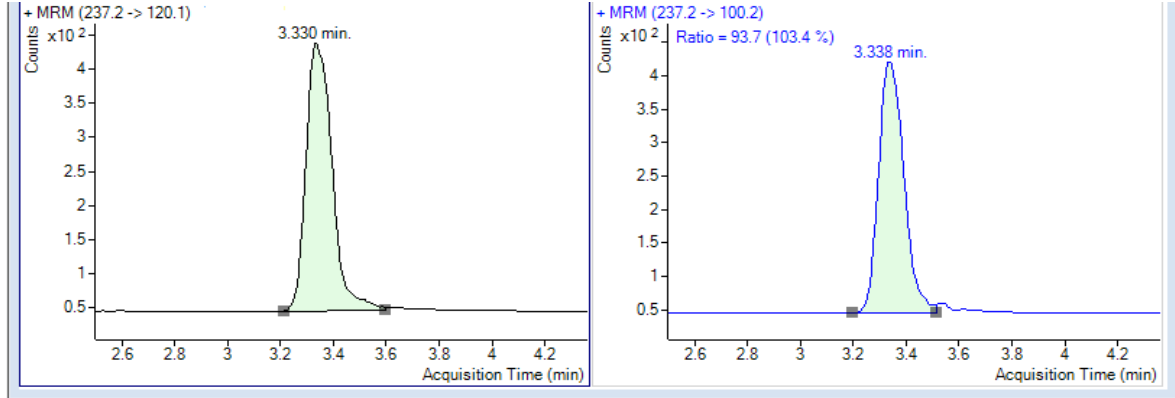
Regresyon denklemi ($y=mx\pm n$)*	$y=1366,4 x + 95,882$
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9992
Korelasyon katsayısı (r)	0,9996
Eğimin standart hatası	17,20
Kesişimin standart hatası	878,29
Doğrusallık aralığı (ng/mL)	0,25-100
p**	0,92 > 0.05
F***	6310,68 > $F_{\text{tablo}} = 6,61$

*y=pık alanı, x=derişim, m=eğim, n=kesişim

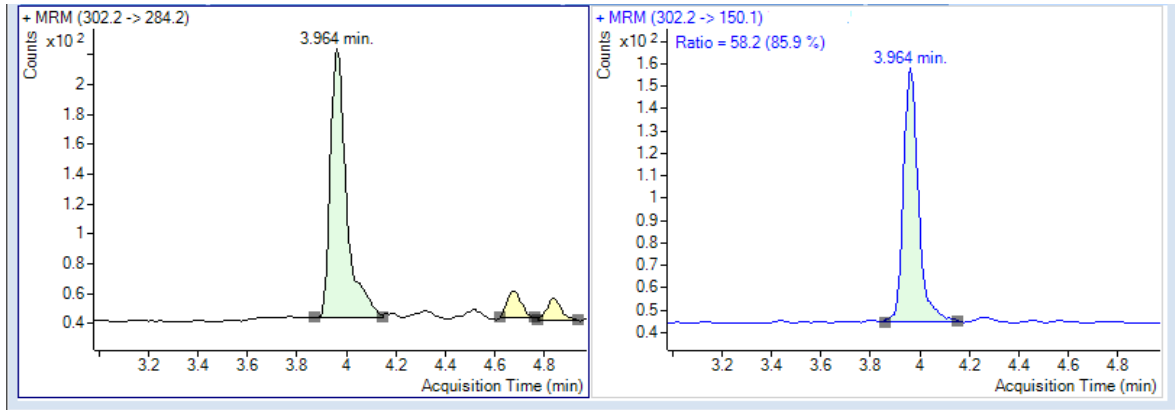
Kesişimin p değeri, *Korelasyon katsayısının F değeri



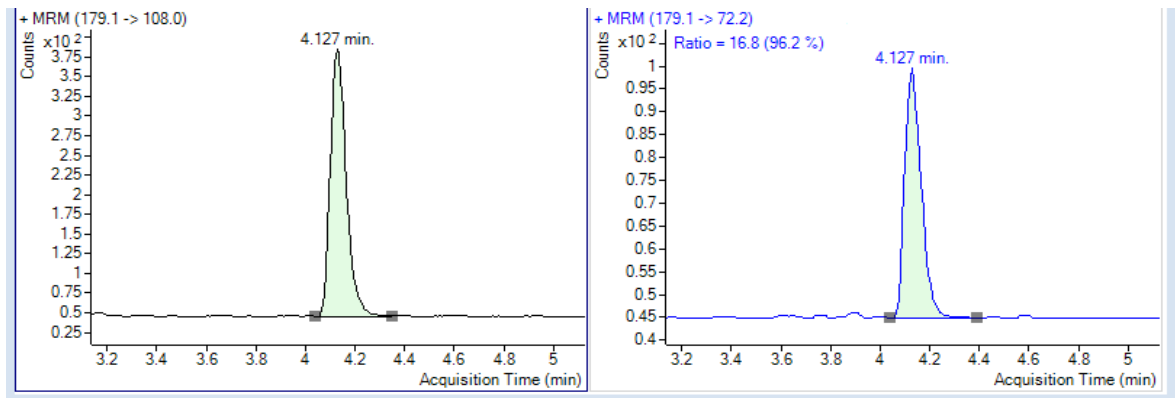
Şekil 4.18. *Flufenamik asit*'in yöntem doğrusallığının kontrol grafiği (n=7)



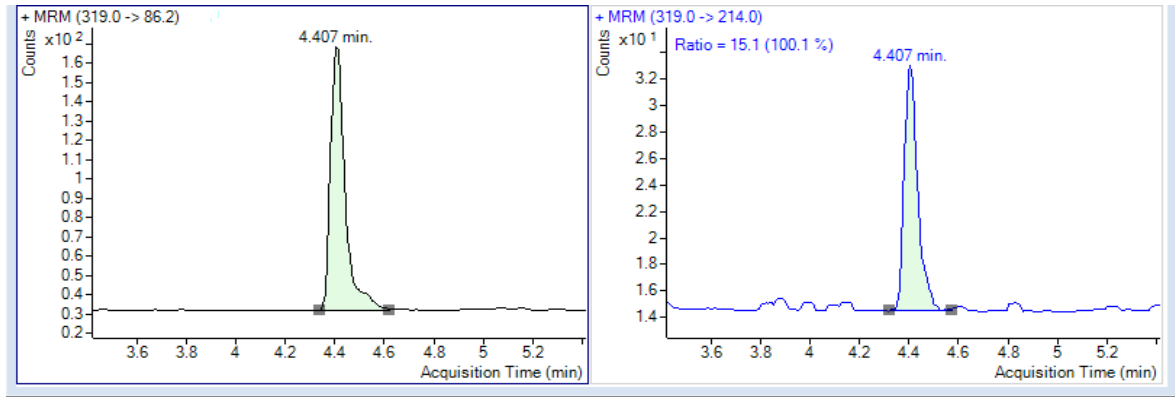
Şekil 4.19. 1,0 ng/mL düzeyindeki spike idrar numunesinde *Prokain*'in MRM'lerine ait pikler



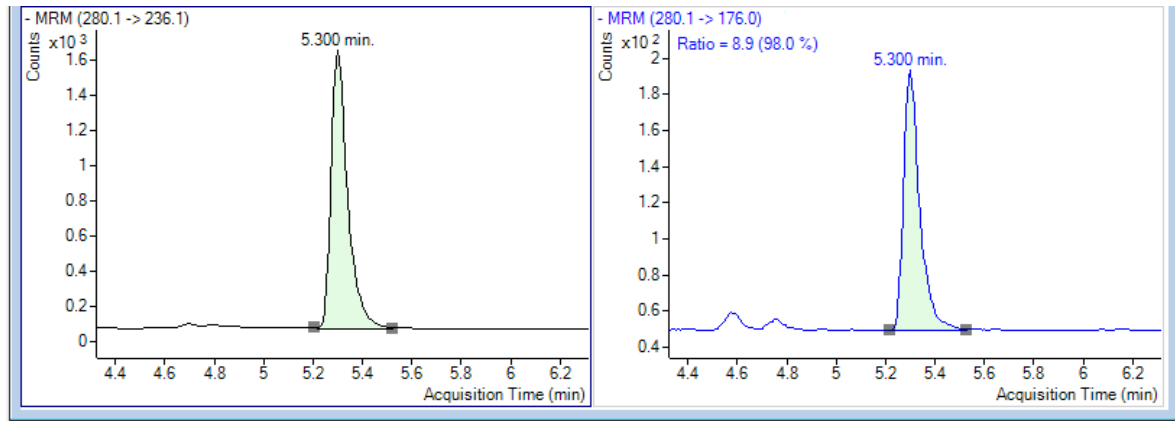
Şekil 4.20. 1,0 ng/mL düzeyindeki spike idrar numunesinde *İzoksuprin*'in MRM'lerine ait pikler



Şekil 4.21. 1,0 ng/mL düzeyindeki spike idrar numunesinde *Niketamid*'in MRM'lerine ait pikler



Şekil 4.22. 1,0 ng/mL düzeyindeki spike idrar numunesinde *Klorpromazin*'in MRM'lerine ait pikler



Şekil 4.23. 1,0 ng/mL düzeyindeki spike idrar numunesinde *Flufenamik asit* MRM'lerine ait pikler

4.2.4. Doğruluk (geri kazanım)

Çalışma aralığı 1,0-10,0 ng/mL olduğundan, geri kazanımı hesaplamak için, çalışma aralığına giren üç farklı derişimde (1,0; 5,0; 10,0 ng/mL) ve her bir derişim için 6'şar adet olmak üzere; *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* eklenmiş idrar numuneleri hazırlanarak aynı günde analiz edilmiştir. Veriler, hazırlanan kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve geri kazanım değerleri Çizelge 4.11.-4.15.'de verilmiştir. Hesaplanan sistematik hatanın gerçek değerle arasında önemli bir farkının bulunup bulunmadığı t- testi yapılarak kontrol edilmiştir.

Çizelge 4.11. *Prokain*'e ait geri kazanım verileri

Analiz Sayısı	Bulunan Derişim (Spike: 1,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 5,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 10,0 ng/mL)
1	0,96	5,14	10,17
2	0,97	5,23	10,53
3	0,95	5,29	10,31
4	0,98	5,09	10,40
5	0,97	5,18	10,21
6	0,98	5,05	10,11
Ortalama	0,97	5,16	10,29
%Ort. Geri Kazanım	97	103,2	102,9
Standart Sapma	0,012	0,089	0,157
%RSD	1,24	1,73	1,53

t-testi : (Bkz. Eş. 2.4)

$$t = \frac{(1,01-1)}{0,086 / 4,24} = 0,49 \quad t = 0,49 < t_{\text{tablo}} = 2,11$$

Çizelge 4.12. *İzoksuprin*'e ait geri kazanım verileri

Analiz Sayısı	Bulunan Derişim (Spike: 1,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 5,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 10,0 ng/mL)
1	0,98	5,35	10,41
2	0,97	5,17	10,33
3	0,98	5,42	10,27
4	0,96	5,21	10,46
5	0,97	5,26	10,11
6	0,99	5,09	10,22
Ortalama	0,98	5,25	10,30
%Ort. Geri Kazanım	98	105	103
Standart Sapma	0,011	0,121	0,128
%RSD	1,12	2,30	1,24

t-testi : (Bkz. Eş. 2.4)

$$t = \frac{(1,02-1)}{0,087 / 4,24} = 0,98 \quad t = 0,98 < t_{\text{tablo}} = 2,11$$

Çizelge 4.13. *Niketamid*'e ait geri kazanım verileri

Analiz Sayısı	Bulunan Derişim (Spike: 1,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 5,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 10,0 ng/mL)
1	0,97	4,86	10,29
2	0,98	4,92	10,07
3	0,95	4,81	10,13
4	0,97	4,93	10,14
5	0,96	4,85	10,42
6	0,98	4,78	10,32
Ortalama	0,97	4,86	10,23
%Ort. Geri Kazanım	97	97,2	102,3
Standart Sapma	0,012	0,059	0,135
%RSD	1,24	1,21	1,32

t-testi : (Bkz. Eş. 2.4)

$$t = \frac{(1-0,99)}{0,069 / 4,24} = 0,61 \quad t = 0,61 < t_{\text{tablo}} = 2,11$$

Çizelge 4.14. *Klorpromazin*'e ait geri kazanım verileri

Analiz Sayısı	Bulunan Derişim (Spike: 1,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 5,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 10,0 ng/mL)
1	0,97	4,75	9,78
2	0,95	4,86	10,08
3	0,95	4,92	9,92
4	0,97	4,81	9,66
5	0,96	5,04	10,16
6	0,95	4,95	9,53
Ortalama	0,96	4,89	9,86
%Ort. Geri Kazanım	96	97,8	98,6
Standart Sapma	0,010	0,104	0,244
%RSD	1,04	2,13	2,47

t-testi : (Bkz. Eş. 2.4)

$$t = \frac{(1-0,975)}{0,119 / 4,24} = 0,89 \quad t = 0,89 < t_{\text{tablo}} = 2,11$$

Çizelge 4.15. *Flufenamik asit*'e ait geri kazanım verileri

Analiz Sayısı	Bulunan Derişim (Spike: 1,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 5,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 10,0 ng/mL)
1	1,02	5,11	9,45
2	0,96	5,27	9,63
3	0,97	4,96	9,70
4	0,97	5,35	9,38
5	1,03	5,42	9,82
6	0,96	5,19	9,29
Ortalama	0,985	5,22	9,54
%Ort. Geri Kazanım	98,5	104,4	95,4
Standart Sapma	0,031	0,167	0,204
% RSD	3,15	3,20	2,14

t-testi : (Bkz. Eş. 2.4)

$$t = \frac{(1-0,99)}{0,134 / 4,24} = 0,32 \quad t = 0,32 < t_{\text{tablo}} = 2,11$$

4.2.5. Kesinlik (tekrarlanabilirlik-tekrar üretilebilirlik)

Boş at idrarına *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* eklenerek üç farklı derişimde (1,0; 5,0; 10,0 ng/mL) ve her bir derişim için 6'şar adet hazırlanan numunelerin aynı günde analiz edilmesiyle elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan %RSD değerleri yöntemin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için kullanılmıştır. %RSD değerlerinin kabul edilebilirliği %15'den küçük olup olmadığına göre değerlendirilmiştir [97]. Hesaplanan %RSD değerleri Çizelge 4.16.'da yer almaktadır.

Çizelge 4.16. Tekrarlanabilirlik parametresine ait %RSD değerleri

Madde Adı	%RSD (Spike: 1,0 ng/mL)	%RSD (Spike: 5,0 ng/mL)	%RSD (Spike: 10,0 ng/mL)
<i>Prokain</i>	1,24 < 15	1,73 < 15	1,53 < 15
<i>İzoksuprin</i>	1,12 < 15	2,30 < 15	1,24 < 15
<i>Niketamid</i>	1,24 < 15	1,21 < 15	1,32 < 15
<i>Klorpromazin</i>	1,04 < 15	2,13 < 15	2,47 < 15
<i>Flufenamik asit</i>	3,15 < 15	3,20 < 15	2,14 < 15

Yöntemin tekrar üretilebilirliği için laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik (ara kesinlik) çalışması yapılmıştır. Bu amaçla boş at idrarına iki farklı derişimde (1,0 ve 10,0 ng/mL) *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* eklenerek uzun zaman aralığındaki farklı günlerde her bir derişim için toplamda 10’ar adet numune çalışılmış ve analiz sonuçlarından elde edilen verilerle %RSD değerleri hesaplanmıştır. Analiz sonuçlarından kesinliğin belirlenmesinde HorRat değeri kullanılmıştır (Bkz. Eş. 2.5 ve Eş. 2.6). Tekrar üretilebilirlik parametresine ait kesinlik için yapılan HorRat değeri hesaplamaları ve değerlendirmeler Çizelge 4.17- 4.21.’de yer almaktadır.

Çizelge 4.17. *Prokain*’e ait tekrar üretilebilirlik verileri

Analiz Sayısı (Gün)	Bulunan Derişim (Spike: 1,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 10,0 ng/mL)
1	0,92	10,42
2	0,95	9,76
3	1,01	9,87
4	1,06	10,16
5	0,91	10,57
6	0,96	9,64
7	0,93	9,70
8	0,96	10,24
9	1,03	9,47
10	0,97	9,36
Ortalama	0,97	9,92
Standart Sapma	0,05	0,41
%RSD	5,16	4,13
%PRSD (Horwitz eşitliği ile bulunan)	45	32
HorRat = %RSD / %PRSD	0,12 < 2	0,13 < 2

Çizelge 4.18. *İzoksuprin*'e ait tekrar üretilebilirlik verileri

Analiz Sayısı (Gün)	Bulunan Derişim (Spike: 1,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 10,0 ng/mL)
1	0,87	9,57
2	0,92	9,83
3	0,98	10,32
4	1,02	10,18
5	0,93	9,69
6	0,95	9,63
7	0,98	9,48
8	0,89	10,09
9	1,04	9,76
10	0,96	10,46
Ortalama	0,95	9,90
Standart Sapma	0,054	0,34
%RSD	5,68	3,43
%PRSD (Horwitz eşitliği ile bulunan)	45	32
HorRat = %RSD / %PRSD	0,13 < 2	0,11 < 2

Çizelge 4.19. *Niketamid*'e ait tekrar üretilebilirlik verileri

Analiz Sayısı (Gün)	Bulunan Derişim (Spike: 1,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 10,0 ng/mL)
1	0,89	9,61
2	0,94	9,83
3	0,97	10,25
4	1,05	10,47
5	0,96	9,89
6	0,93	9,52
7	1,02	10,54
8	0,91	9,78
9	0,95	9,69
10	0,97	9,89
Ortalama	0,96	9,95
Standart Sapma	0,048	0,35
%RSD	5	3,52
%PRSD (Horwitz eşitliği ile bulunan)	45	32
HorRat = %RSD / %PRSD	0,11 < 2	0,11 < 2

Çizelge 4.20. Klorpromazin'e ait tekrar üretilebilirlik verileri

Analiz Sayısı (Gün)	Bulunan Derişim (Spike: 1,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 10,0 ng/mL)
1	0,91	9,72
2	0,90	9,61
3	0,93	9,52
4	0,95	9,41
5	0,98	10,39
6	0,96	10,17
7	1,04	10,45
8	0,93	9,89
9	1,02	9,47
10	0,97	10,09
Ortalama	0,96	9,87
Standart Sapma	0,045	0,38
%RSD	4,69	3,85
%PRSD (Horwitz eşitliği ile bulunan)	45	32
HorRat = %RSD / %PRSD	0,10 < 2	0,12 < 2

Çizelge 4.21. *Flufenamik asit*'e ait tekrar üretilebilirlik verileri

Analiz Sayısı (Gün)	Bulunan Derişim (Spike: 1,0 ng/mL)	Bulunan Derişim (Spike: 10,0 ng/mL)
1	0,93	9,47
2	0,97	9,84
3	1,06	10,38
4	1,05	9,77
5	0,95	9,35
6	0,96	9,75
7	1,03	9,23
8	0,87	10,13
9	0,94	9,34
10	0,93	10,27
Ortalama	0,97	9,75
Standart Sapma	0,060	0,41
%RSD	6,19	4,21
% PRSD (Horwitz eşitliği ile bulunan)	45	32
HorRat = %RSD / %PRSD	0,14 < 2	0,13 < 2

4.2.6. Sağlamlık

Sağlamlık parametresi için, pH'daki küçük bir değişimin ve üretim tarihi farklı kloroform çözücüleri kullanımının analiz sonucuna etkisi belirlenmiştir. pH'daki küçük bir değişime karşı yöntemin sağlamlığını kontrol etmek için; boş at idrarına *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* eklenerek 5,0 ng/mL derişiminde, 10'ar adet hazırlanan numunelerin pH: 6,0 ve pH: 5,9'da paralel çalışılmasıyla elde edilen veriler kullanılmıştır. Üretim tarihi farklı kloroform çözücüleri kullanımına karşı yöntemin sağlamlığını kontrol etmek için ise boş at idrarına *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* eklenerek 10,0 ng/mL derişiminde, 10'ar adet hazırlanan numunelerin iki farklı kloroform ile paralel çalışılıp analiz edilmesiyle elde edilen veriler kullanılmıştır. Elde edilen veriler ve F-testi Çizelge 4.22 - 4.26.'da yer almaktadır.

Çizelge 4.22. Prokain'e ait sağlamlık verileri

Analiz Sayısı	Kloroform 1 (10,0 ng/mL)	Kloroform 2 (10,0 ng/mL)	pH:5,9 (5,0 ng/mL)	pH:6,0 (5,0 ng/mL)
1	9,80	9,72	5,01	5,15
2	9,68	10,34	5,10	5,18
3	9,51	10,46	4,81	5,07
4	9,69	10,32	4,74	4,84
5	9,75	9,91	4,97	5,09
6	9,56	10,33	4,92	5,06
7	9,83	10,21	5,04	5,11
8	9,72	9,55	5,13	4,89
9	9,53	9,98	4,79	4,94
10	9,46	10,35	4,82	5,15
F-testi	$F=0,175383 < F_{\text{kritik}}=0,314575$		$F=1,376729 < F_{\text{kritik}}=3,178893$	

Çizelge 4.23. İzoksuprin'e ait sağlamlık verileri

Analiz Sayısı	Kloroform 1 (10,0 ng/mL)	Kloroform 2 (10,0 ng/mL)	pH:5,9 (5,0 ng/mL)	pH:6,0 (5,0 ng/mL)
1	10,05	10,16	4,74	4,68
2	10,51	9,70	4,69	4,80
3	10,43	10,04	4,81	4,87
4	9,48	9,75	4,92	4,70
5	10,13	9,41	4,94	4,90
6	9,79	9,66	5,09	4,83
7	10,63	10,29	4,70	5,08
8	9,81	9,53	4,84	4,91
9	9,47	10,07	5,04	4,75
10	9,62	9,85	4,76	4,81
F-testi	$F=2,21564 < F_{\text{kritik}}=3,178893$		$F=1,442774 < F_{\text{kritik}}=3,178893$	

Çizelge 4.24. *Niketamid*'e ait sağlamlık verileri

Analiz Sayısı	Kloroform 1 (10,0 ng/mL)	Kloroform 2 (10,0 ng/mL)	pH:5,9 (5,0 ng/mL)	pH:6,0 (5,0 ng/mL)
1	9,57	9,47	5,14	4,78
2	9,69	10,17	5,25	4,85
3	9,95	9,87	5,11	4,92
4	10,34	9,64	5,08	4,76
5	10,21	10,36	4,87	4,89
6	10,53	10,12	5,19	5,05
7	9,86	9,73	4,79	4,95
8	9,92	9,81	4,93	5,09
9	10,18	10,27	4,82	4,72
10	9,58	9,77	5,04	4,90
F-testi	$F=1,237249 < F_{\text{kritik}}=3,178893$		$F=1,787031 < F_{\text{kritik}}=3,178893$	

Çizelge 4.25. *Klorpomazin*'e ait sağlamlık verileri

Analiz Sayısı	Kloroform 1 (10,0 ng/mL)	Kloroform 2 (10,0 ng/mL)	pH:5,9 (5,0 ng/mL)	pH:6,0 (5,0 ng/mL)
1	9,66	10,14	4,83	5,09
2	10,23	9,54	4,95	4,88
3	9,87	9,86	4,92	4,92
4	9,57	9,49	5,06	4,78
5	9,84	10,32	4,78	4,85
6	10,18	9,73	5,1	5,03
7	9,52	10,25	4,88	4,95
8	10,36	9,65	5,15	4,81
9	9,78	10,21	4,85	4,75
10	10,51	9,81	4,73	4,92
F-testi	$F=1,26117 < F_{\text{kritik}}=3,178893$		$F=1,688268 < F_{\text{kritik}}=3,178893$	

Çizelge 4.26. *Flufenamik asit*'e ait sağlamlık verileri

Analiz Sayısı	Kloroform 1 (10,0 ng/mL)	Kloroform 2 (10,0 ng/mL)	pH:5,9 (5,0 ng/mL)	pH:6,0 (5,0 ng/mL)
1	10,08	9,58	5,09	4,86
2	10,46	9,94	5,04	4,79
3	9,93	9,83	5,13	4,68
4	9,89	9,67	4,95	4,94
5	9,76	9,81	4,91	4,88
6	10,24	10,12	5,16	4,72
7	9,81	9,74	4,79	4,96
8	10,32	10,23	4,83	4,71
9	9,7	9,86	4,86	4,85
10	10,13	9,55	5,02	5,07
F-testi	$F=1,354969 < F_{\text{kritik}}=3,178893$		$F=1,090436 < F_{\text{kritik}}=3,178893$	

4.2.7. Ölçüm belirsizliği hesaplamaları

Ölçüm belirsizliği hesaplamaları yapılırken validasyon çalışmasındaki tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve geri kazanım verilerinden elde edilen sonuçlar kullanılmıştır. *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* için yapılan ölçüm belirsizliği hesapları Çizelge 4.27.- 4.31'de verilmiştir.

Çizelge 4.27. *Prokain*'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları

Geri kazanımdan gelen standart belirsizlik	$\frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0,086}{\sqrt{18}} = 0,020$
Geri kazanımdan gelen relatif standart belirsizlik (RSD1)	$0,020/101=0,00020$
Tekrarlanabilirlikten hesaplanan RSD_{pool} (RSD2)	0,015
Tekrar üretilebilirlikten hesaplanan RSD_{pool} (RSD3)	0,047
$U_{\text{birleştirilmiş}} = \sqrt{RSD1^2 + RSD2^2 + RSD3^2}$	0,049
$U_{\text{genişletilmiş}} = U_{\text{birleştirilmiş}} \times k$ (%95 güven aralığı için $k=2$)	0,098

Çizelge 4.28. *İzoksuprin*'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları

Geri kazanımdan gelen standart belirsizlik	$\frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0,087}{\sqrt{18}} = 0,021$
Geri kazanımdan gelen relatif standart belirsizlik (RSD1)	0,021/102=0,00021
Tekrarlanabilirlikten hesaplanan RSD_{pool} (RSD2)	0,016
Tekrar üretilebilirlikten hesaplanan RSD_{pool} (RSD3)	0,047
$U_{birleştirilmiş} = \sqrt{RSD1^2 + RSD2^2 + RSD3^2}$	0,05
$U_{genişletilmiş} = U_{birleştirilmiş} \times k$ (%95 güven aralığı için k=2)	0,1

Çizelge 4.29. *Niketamid*'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları

Geri kazanımdan gelen standart belirsizlik	$\frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0,069}{\sqrt{18}} = 0,016$
Geri kazanımdan gelen relatif standart belirsizlik (RSD1)	0,016/99=0,00016
Tekrarlanabilirlikten hesaplanan RSD_{pool} (RSD2)	0,012
Tekrar üretilebilirlikten hesaplanan RSD_{pool} (RSD3)	0,043
$U_{birleştirilmiş} = \sqrt{RSD1^2 + RSD2^2 + RSD3^2}$	0,045
$U_{genişletilmiş} = U_{birleştirilmiş} \times k$ (%95 güven aralığı için k=2)	0,090

Çizelge 4.30. *Klorpromazin*'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları

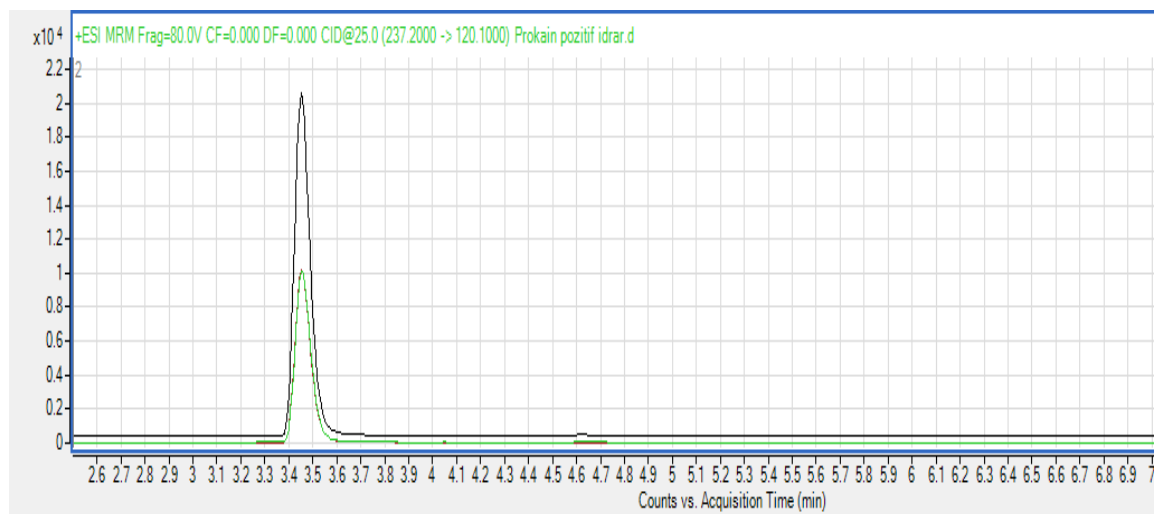
Geri kazanımdan gelen standart belirsizlik	$\frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0,119}{\sqrt{18}} = 0,028$
Geri kazanımdan gelen relatif standart belirsizlik (RSD1)	0,028/97,5=0,00029
Tekrarlanabilirlikten hesaplanan RSD_{pool} (RSD2)	0,020
Tekrar üretilebilirlikten hesaplanan RSD_{pool} (RSD3)	0,043
$U_{birleştirilmiş} = \sqrt{RSD1^2 + RSD2^2 + RSD3^2}$	0,047
$U_{genişletilmiş} = U_{birleştirilmiş} \times k$ (%95 güven aralığı için k=2)	0,094

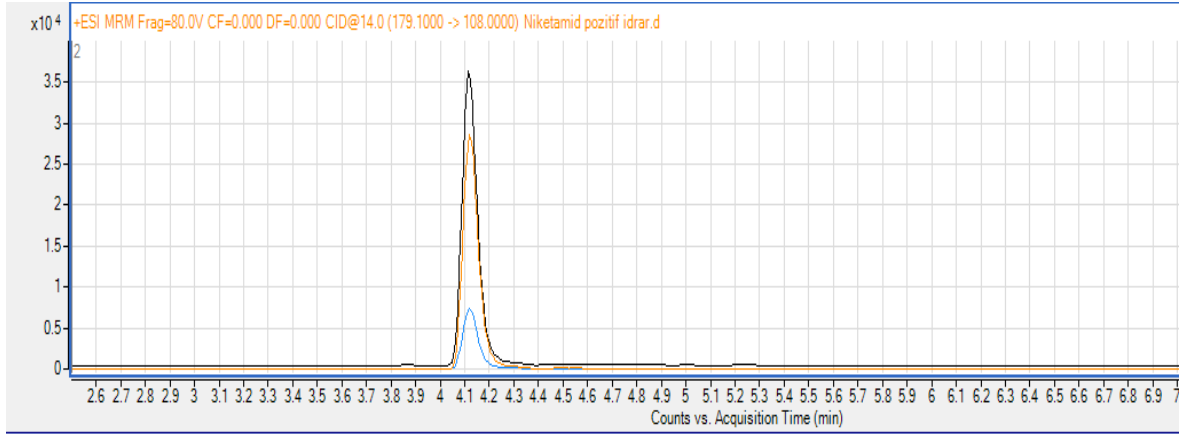
Çizelge 4.31. *Flufenamik asit*'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları

Geri kazanımdan gelen standart belirsizlik	$\frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0,134}{\sqrt{18}} = 0,032$
Geri kazanımdan gelen relatif standart belirsizlik (RSD1)	0,032/99=0,00032
Tekrarlanabilirlikten hesaplanan RSD_{pool} (RSD2)	0,029
Tekrar üretilebilirlikten hesaplanan RSD_{pool} (RSD3)	0,053
$U_{birleştirilmiş} = \sqrt{RSD1^2 + RSD2^2 + RSD3^2}$	0,060
$U_{genişletilmiş} = U_{birleştirilmiş} \times k$ (%95 güven aralığı için k=2)	0,12

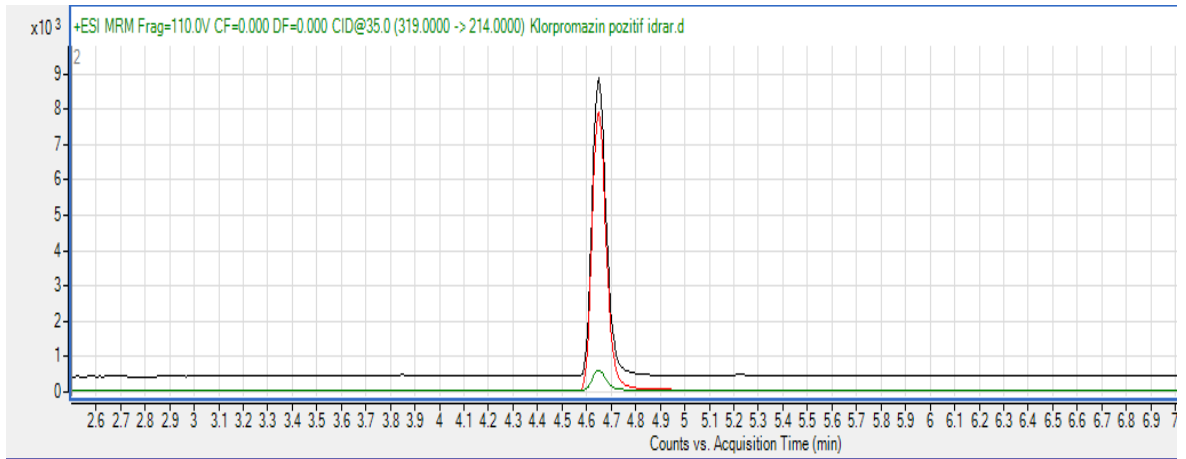
4.3. Geliştirilen Yöntemin Dopingli Atların İdrar Numunelerine Uygulanması

Geliştirilen ve valide edilen dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyon yöntemi, ilgili doping maddeleri açısından pozitif (dopingli) olan 10 adet at idrarı numunesine uygulanmıştır. Numunelerin daha sonra LC-MS/MS yöntemiyle tayin edilmiştir. Pozitif at idrarı numuneleri Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Doping Kontrol Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Temin edilen idrar numuneleri arasında *İzoksuprin* yönünden pozitif olan at idrarı numunesi mevcut olmadığından, yöntem sadece *Prokain*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* içeren numuneler açısından değerlendirilmiştir. Analiz sonucu elde edilen kromatogramlara örnekler Şekil 4.24 - 4.27'de verilmiştir.

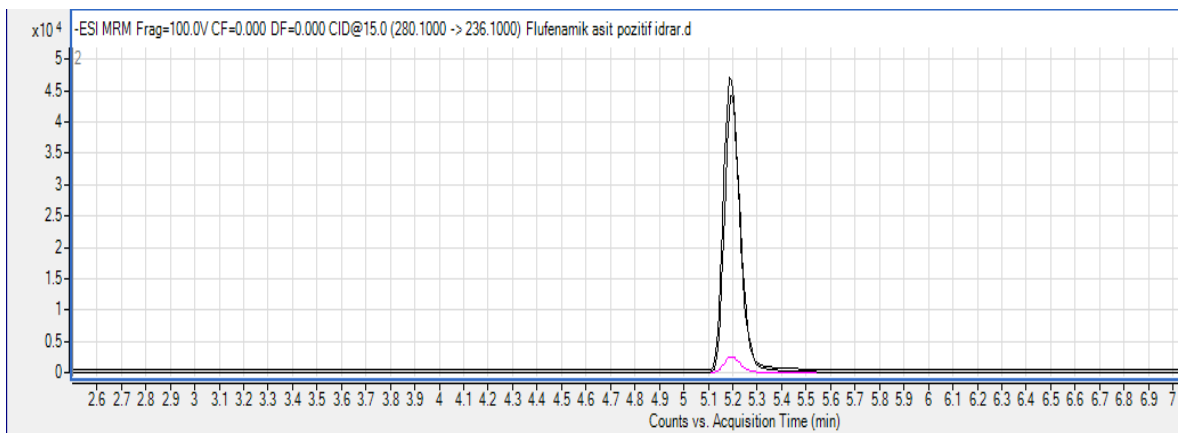
Şekil 4.24. *Prokain* yönünden pozitif at idrarı numunesine ait kromatogram



Şekil 4.25. *Niketamid* yönünden pozitif at idrarı numunesine ait kromatogram



Şekil 4.26. *Klorpromazin* yönünden pozitif at idrarı numunesine ait kromatogram



Şekil 4.27. *Flufenamik asit* yönünden pozitif at idrarı numunesine ait kromatogram

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsanlardaki doping kontrolü için WADA (Dünya Anti-Doping Ajansı) tarafından yayınlanmış bir liste olmasına karşın atlardaki doping kontrolü için IFHA (Uluslararası At Yarışı Otoriteleri Federasyonu) tarafından yayınlanmış, yasaklı maddeleri içeren bir liste yoktur. Atlardaki doping kontrolünde atların vücutlarında, herhangi bir zamanda bir eylem veya etkiye sebep olabilecek bütün maddelere odaklanılır. Bu maddelerin pek çoğu yasaklı maddeler sınıfına girdiğinden her ne sebeple olursa olsun, kullanılmaması gereken maddelerdir ve idrar, kan gibi doping şüpheli numunelerde, bu maddeler için “Sıfır Tolerans” söz konusudur. Bu nedenle bu maddelerin çok duyarlı ve doğru bir şekilde oldukça düşük derişimlerde tespiti büyük bir önem arz etmektedir. Ülkemizde at yarışlarında doping kontrolü Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’na bağlı Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Doping Kontrol Laboratuvarı ile Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Doping Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmektedir. Her iki laboratuvar da at idrarında doping maddelerinin analizleri için katı faz ekstraksiyon (SPE) ve sıvı faz ekstraksiyon (LLE) yöntemlerini takiben kromatografik yöntemler kullanılmaktadır.

Son yıllarda hızla yaygın kullanım alanı bulan mikroekstraksiyon tekniklerinin bilinen ekstraksiyon yöntemlerine (sıvı-sıvı ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyon vb.) göre birçok açıdan üstünlükleri bulunmaktadır. Bu tekniklerin en büyük avantajı kullanılan kimyasal miktarını ve harcanan zamanı en ekonomik düzeye indirmesidir. Son yıllarda analitik cihazların duyarlılıklarının çeşitli şekillerde geliştirilmesi klasik ekstraksiyon yöntemlerinden mikroekstraksiyon tekniklerine geçişi kolaylaştırmaktadır.

Tez çalışması için; Türkiye’de ve Dünya’da, yarış atlarında son 5 yılda kullanılan doping maddeleri incelenmiş ve bu maddelerden sıfır tolerans olanlar üzerinde durulmuştur. Daha sonra maddeler asidik-bazik özelliklerine ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmış ve bir taraftan da kaynak araştırması yapılmıştır. Başlangıçta asidik ve bazik doping maddeleri için 2 farklı dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyon yöntemi geliştirilmesi hedeflenmiş, fakat yapılan ön çalışmalar sonucunda asidik ve bazik doping maddelerinin at idrarından optimum bir pH değerinde birlikte analiz edilebildiği görülmüş ve tek bir dispersif sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi geliştirmeye karar verilmiştir. Kaynak araştırması esnasında *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit*’in at idrarından eş zamanlı analizi

için herhangi bir dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyon yönteminin uygulamasına rastlanmamıştır. Bu nedenle *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit*'in at idrarından eş zamanlı analizi için bir dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon ve sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi geliştirilmesi ve bu yöntemin validasyon çalışmaları yapılarak dopingli olduğu tespit edilen atların idrar numunelerinde uygulanması tez çalışmasının konusu olarak belirlenmiştir.

5.1. LC-MS/MS Yöntemi Optimizasyonu

LC-MS/MS yöntemi optimizasyonu sonucunda; iyon kaynağında meydana gelen iyonlaşma sonrası *Flufenamik asit*'in yapısından bir H^+ kaybederek negatif modda iyonlaştığı ve diğer dört doping maddesinin ise yapılarına birer H^+ katarak pozitif modda iyonlaştığı gözlenmiştir. Her bir doping maddesi için en yüksek intensiteye sahip 2'şer tane MRM geçişi belirlenmiş olup bu MRM geçişleri *Prokain* için 237,2→120,1 ve 237,2→100,2; *İzoksuprin* için 302,2→284,2 ve 302,2→150,1; *Niketamid* için 179,1→108 ve 179,1→72,2; *Klorpromazin* için 319→214 ve 319→86,2; *Flufenamik asit* için ise 280,1→236,1 ve 280,1→176'dır. MRM geçişlerinin oluşabilmesi için en önemli parametre olan çarpışma enerjisi (collision energy) voltajları optimize edilmiştir. Her bir madde için, ilgili MRM geçişlerinin en yüksek intensiteye sahip olduğu çarpışma enerjisi voltajları optimum voltaj değerleri olarak belirlenmiş olup, bu değerler *Prokain*'in 237,2→120,1 MRM geçişi için 25 V ve 237,2→100,2 MRM geçişi için 10 V, *İzoksuprin*'in 302,2→284,2 MRM geçişi için 15 V ve 302,2→150,1 MRM geçişi için 20 V, *Niketamid*'in 179,1→108 MRM geçişi için 14 V ve 179,1→72,2 MRM geçişi için 18 V, *Klorpromazin* 'in 319→214 MRM geçişi için 35 V ve 319→86,2 MRM geçişi için 20 V, *Flufenamik asit*'in 280,1→236,1 MRM geçişi için 15 V ve 280,1→176 MRM geçişi için 20 V'dur. Yapılan denemelerde uygun voltaj kullanılmadığı bazı çalışmalarda MRM geçişlerinin hiç oluşmadığı durumlar gözlenmiştir.

Gradient akışta yapılan değişikliğin ilgili analitlerin ayırımına etkisini belirlemek ve iyi bir kromatografik ayırım elde etmek için yapılan optimizasyon çalışmasında (Bkz. Şekil 3.1.) A mobil fazının gradient akıştaki yüzdesinin %5'e düştüğü zaman değiştirilmiş ve elde edilen kromatogramlara göre en iyi kromatografik ayırımın gerçekleştiği zaman 2,50 dak. olarak belirlenmiştir. Ayrıca kromatogramlar incelendiğinde üzerinde değişiklik yapılan zaman 2,90 dak.'dan 2,50 dak.'ya düştükçe seçicilik ve ayırıcılığın arttığı görülmüştür.

5.2. Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Optimizasyonu

Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon basamaklarının optimizasyonunda en önemli parametrelerden birisi olan pH için optimum değer 6,0 olarak bulunmuştur. Bu pH değeri, bu 5 maddenin eş zamanlı analizi için optimum pH değeri olup, herhangi bir tarama yönteminde at idrarı numunesinde bu maddelerden birinin, örneğin; bazik özellikteki *Prokain*'in tek başına bulunması halinde pH değeri daha yüksek değerlere (pH: 8-9) çekilerek ya da asidik özellikteki *Flufenamik asit*'in tek başına bulunması halinde pH değeri daha düşük değerlere (pH: 3-4) çekilerek çok daha hassas analiz gerçekleştirebilmek ve ilgili maddelerin at idrarındaki varlığının doğrulamasını yapmak mümkündür. İyon kaynağındaki iyonlaşmayı artırmak için kullanılan %0,1'lik formik asitin, ilgili maddelerin pH'sına ve dolayısıyla elde edilen kromatogramlara bir etkisi söz konusu değildir.

Dispersif çözücü hacmi bulutumsu çözelti oluşumunu doğrudan etkileyerek ekstraksiyon çözücüsünün sulu fazdaki dağılımına ve ekstraksiyon verimine etki ettiği için optimizasyonu oldukça önemli bir parametredir. Kaynaklarda, DLLME için genellikle 0,5-1,5 mL hacim aralığında dispersif çözücü kullanıldığından, 700,0 ve 1200,0 μ L aralığında bir optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda optimum dispersif çözücü (asetonitril) hacmi olarak 900,0 μ L belirlenmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimliliği kloroform ile sağlanmıştır. Mikroekstraksiyonda kullanılacak kloroform hacminin optimizasyonu sonucunda optimum değer 80,0 μ L olarak bulunmuştur. Bulunan sonuçlara göre ekstraksiyon esnasında harcanan toplam organik çözücü hacmi 980,0 μ L olup, klasik katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) yöntemleriyle karşılaştırıldığında oldukça düşük bir hacimdir.

5.3. Yöntemin Validasyonu

Seçicilik

Yöntemin geçerli kılınması için incelenen parametrelerden biri olan seçicilik için yapılan çalışmada, elde edilen kromatogramlarda boş at idrarında; *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* ile aynı alıkonma zamanına sahip herhangi bir pik gözlenmemiştir.

LOD ve LOQ

Yöntemde *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* için LOD değerleri sırasıyla 0,07, 0,06, 0,08, 0,09 ve 0,075 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen ekstraksiyon yöntemi, kaynaklarda mevcut olan çeşitli yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar ile karşılaştırılmış ve sonuçlar Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Çeşitli yöntemlerin kullanıldığı çalışmaların karşılaştırılması

Analit	Matriks	Analiz Yöntemi	LOD (ng/mL)	Ref. No
<i>Prokain</i>	İnsan idrarı	CE-TOF-MS (BGE ve suyla seyreltme)	20,0	17
<i>Prokain</i>	At idrarı	LC/Hibrit tandem MS (Direkt enjeksiyon)	10,0	24
<i>İzoksuprin</i>	Hayvan İdrarı	LC-MS/MS (Moleküler baskılanmış polimer)	42,0	38
<i>İzoksuprin</i>	İnsan idrarı ve farmasötikler	Spektrofotometrik yöntem (2 farklı pH’da 2 farklı kromojen ile)	170,0 ve 50,0	39
<i>Niketamid</i>	İnsan idrarı	UHPLC-HRMS (Direkt enjeksiyon)	50,0	44
<i>Niketamid</i>	İnsan idrarı	GC-MS (Sıvı-sıvı ekstraksiyon) LC-MS/MS (Katı faz ekstraksiyon)	1,0	45
<i>Klorpromazin</i>	İnsan idrarı	GC-FPD ve GC-FID (Oyuk fiber sıvı faz mikroekstraksiyon)	75,9 ve 9,9	56
<i>Klorpromazin</i>	Farmasötik atık su ve insan plazması	HPLC-UV (Tandem dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon)	1,0	59
<i>Flufenamik asit</i>	At idrarı	LC-MS (Katı faz ekstraksiyon)	0,25	63
<i>Flufenamik asit</i>	Su	GC-MS (Katı faz mikroekstraksiyon)	0,4	70
<i>Prokain</i> <i>İzoksuprin</i> <i>Niketamid</i> <i>Klorpromazin</i> <i>Flufenamik asit</i>	At idrarı	LC-MS/MS (Dispersif sıvı- sıvı mikroekstraksiyon)	0,07 0,06 0,08 0,09 0,075	Bu çalışma

Kaynaklarda at idrarı ile ilgili çok fazla çalışma yer almaması nedeniyle, tabloda farklı matrikslerden ilgili doping maddelerinin analizi için yapılan çalışmalara yer verilmiş ve bu çalışmalarda bulunan LOD değerleriyle bizim çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz LOD

değerleri karşılaştırılmıştır. Geliştirdiğimiz mikroekstraksiyon yönteminin zenginleştirme özelliğinden dolayı *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit* için oldukça düşük LOD değerleri elde edildiği görülmüştür. Kaynaklardaki çalışmaların bazılarında direkt enjeksiyon yönteminin (matriksin seyreltilerek doğrudan cihaza enjeksiyonu) kullanıldığı görülmüştür. Direkt enjeksiyon yöntemi geliştirilen mikroekstraksiyon yöntemi ile karşılaştırıldığında her ne kadar daha basit gibi görünse de matriks etkisini ortadan kaldırmak ve numunenin kirliliğini azaltmak için yüksek oranlarda seyreltme gerektiren bir yöntemdir. Fakat bu durumda ilgili analit derişimi de azalacağından, analitin çok düşük derişimlerde analizi mümkün olmayacaktır. Bu nedenle kaynaklarda direkt enjeksiyon yönteminin kullanıldığı çalışmalarda LOD değerinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Ölçüm aralığı ve doğrusallık

Ölçüm aralığı ve doğrusallık çalışmasında elde edilen sonuçlar doğrultusunda dedektör cevabıyla *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin*, *Flufenamik asit* standartlarını içeren spike numunelerinin analit derişimleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Prokain, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin*, *Flufenamik asit* için determinasyon katsayıları (R^2) sırasıyla 0,9995, 0,9995, 0,9998, 0,9993 ve 0,9992 olarak bulunmuştur. Determinasyon katsayısı değerlerinin 1,0000'e yakın bulunması çizilen kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğunu göstermektedir. ANOVA analizi yapılarak elde edilen F değerleri F_{tablo} değeriyle karşılaştırılmış ve her madde için $F > F_{\text{tablo}}$ olarak bulunduğundan kalibrasyon eğrilerini oluşturan noktaların regresyon doğrusuyla uyumlu olduğu, korelasyon katsayılarının tesadüfen bulunmuş değerler olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır. Ayrıca regresyon analizi sonucu kalibrasyon eğrilerindeki kesişim değerlerinin sıfıra eşit (önemsiz) ($p > 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar geliştirilen yöntemin doğrusal olduğunu kanıtlamaktadır.

Ayrıca kalibrasyon grafiğini oluştururken kullanılan 1 ng/mL derişimindeki spike idrar numunesinin, geliştirilen mikroekstraksiyon yöntemiyle hazırlanıp LC-MS/MS'e enjeksiyonu sonucu elde edilen *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit*'in MRM'lerine ait pikler (Bkz. Şekil 4.19-4.23) incelendiğinde, her bir

analite ait 2 MRM'in intensitelerinin birbirine oranlarının ve alıkonma zamanlarının doğru bir şekilde tespit edilebildiği gözlenmiştir.

Doğruluk (geri kazanım)

Yöntemin doğruluğunu belirlemek için yapılan geri kazanım çalışmasında, *Prokain*'in ortalama %geri kazanım değeri %101, *İzoksuprin*'in ortalama %geri kazanım değeri %102, *Niketamid*'in ortalama %geri kazanım değeri %98,8, *Klorpromazin*'in ortalama %geri kazanım değeri %97,5 ve *Flufenamik asit*'in ortalama %geri kazanım değeri %99,4 olarak bulunmuştur. Yapılan t-testi sonucunda beş madde için de $t < t_{\text{tablo}}$ olduğundan %geri kazanım değerleri arasında anlamlı bir fark ve yöntemin doğruluğunda bir sorun yoktur.

Keskinlik

Yöntemin keskinliğini değerlendirmek için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik (ara keskinlik) çalışmaları yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen verilerle hesaplanan %RSD değerlerinin tamamı %15'den küçük olduğu için yöntemin tekrarlanabilirliğinin uygun olduğu görülmüştür. Tekrar üretilebilirlik çalışmasında elde edilen verilerle hesaplanan %RSD değerlerinin uygunluğunu değerlendirebilmek için HorRat değeri kullanılmıştır. Hesaplanan HorRat değerleri 2'den küçük olduğu için yöntemin tekrar üretebilirliği de uygundur.

Sağlamlık

Sağlamlık çalışmasında üretim tarihi farklı kloroform çözücüler ve farklı pH değerleri (pH: 6,0 ve pH: 5,9) kullanılarak çalışma yapılmış ve elde edilen veriler arasında anlamlı bir fark olup olmadığı F-testi ile değerlendirilmiştir. F-testi sonucunda her bir madde için hesaplanan F değeri F_{kritik} değerden küçük olduğu için yöntem sağlamdır.

Ölçüm belirsizliği hesaplamaları

Ölçüm belirsizliği, ölçüm sonucunda elde edilen değerleri mantıklı kılacak dağılımları karakterize eden ve ölçümün sonucuyla bağlantılı olan bir parametre olduğundan oldukça

önemlidir. Yapılan ölçüm belirsizliği hesaplamalarında geri kazanımdan gelen belirsizliğin genişletilmiş belirsizliğe çok fazla bir katkısının olmadığı, tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizliğin ise genişletilmiş belirsizliğe en çok katkı sağlayan belirsizlik olduğu görülmektedir. Ayrıca hesaplamalar sonunda elde edilen genişletilmiş belirsizlik değerleri, tekrar üretilebilirlikten hesaplanan belirsizlik değerlerinin yaklaşık iki katı olduğundan, doğru ve uygun şartlarda yapılan bir validasyon çalışması için tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizliğin 2 katı olan değer, ölçüm belirsizliği olarak verilebileceği görülmüştür.

5.4. Yöntemin Dopingli Atların İdrar Numunelerine Uygulanması

Geliştirilen ve valide edilen mikroekstraksiyon yöntemi, ilgili maddelerin ata uygulanması sonucunda dopingli çıktığı rapor edilen at idrarı numunelerine uygulanmıştır. Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Doping Kontrol Laboratuvarı'ndan temin edilen ve mikroekstraksiyon yöntemiyle analiz edilen idrar numunelerinde ilgili analitlerin tespit edilebildiği görülmüştür. Böylece geliştirilen mikroekstraksiyon yönteminin gerçek dopingli idrar numuneleri üzerindeki etkinliği de ispatlanmıştır.

5.5. Geliştirilen Yöntemin Üstünlükleri

Geliştirilen Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon ve Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi ile *Prokain*, *İzoksuprin*, *Niketamid*, *Klorpromazin* ve *Flufenamik asit*'in at idrarından oldukça düşük seviyelerde analizi gerçekleştirilmiştir. Doping kontrol laboratuvarlarında yapılan analizlerin performansını belirlemek adına, içlerinde *Klorpromazin* ve *Niketamid*'in de bulunduğu bazı doping maddeleri için, IFHA tarafından belirlenen ve ilgili maddelerin at idrarından analizi için kullanılan analiz yönteminin çok düşük derişimlerde olmasa dahi, en azından belirlenen seviyelerde analizinin yapılabilir olmasını gerekli kılan derişim değerleri mevcuttur. Bu derişimler, ilgili maddeler için bir tarama değeri ya da eşik değeri olmayıp sadece söz konusu analit için kullanılan analiz yönteminin performansı için bir kriterdir. *Klorpromazin* ve *Niketamid*'in at idrarından analizi için bu değerler sırasıyla 20,0 ve 100,0 ng /mL olup geliştirilen yöntem bu kritere uymaktadır. Geliştirilen mikroekstraksiyon yöntemi sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) ve katı faz ekstraksiyon (SPE) gibi yöntemler gibi zahmetli ve zaman alıcı bir yöntem değildir ve bu yönüyle zamanın kritik olduğu durumlarda ilgili maddelerin analizi için oldukça avantaj sağlamaktadır. Aynı zamanda az miktarda çözücü kullanılması nedeniyle ekonomik olması

da diğer yöntemlere göre üstünlüklerinden bir diğeridir. Ayrıca idrar miktarının az olduğu durumlar için de oldukça avantajlı bir yöntemdir.

5.6. Öneriler

Doping analizlerinde tarama yöntemleri ve herhangi bir doping maddesi yönünden pozitif bulunan at idrarı için doğrulama (konfirmasyon) yöntemleri söz konusudur. Geliştirilen mikroekstraksiyon yöntemi bu 5 madde için bir doğrulama yöntemi olarak geliştirilmiş ve mümkün olan en az idrar hacmiyle (1,0 mL) çalışılarak doğruluk ve hassasiyeti yüksek bir yöntem olması hedeflenmiştir. Sonuçlardan görüldüğü gibi, önerilen mikroekstraksiyon yöntemi sonrası LC-MS/MS ile yapılan analizler, tüm validasyon parametreleri açısından geçerlidir. Yapılan tüm mikroekstraksiyon yöntemi ve LC-MS/MS yöntemi optimizasyon çalışmaları, benzer nitelikteki analitlere aynen, farklı analitlere ise modifiye edilerek uygulanabilir. Önerilen mikro ekstraksiyon yönteminin duyarlılığının yanı sıra en önemli üstünlükleri olan düşük numune ve çözücü hacmi ile çalışılabilirliği, sonraki çalışmalarda ve farklı analitlerin analizlerinde kullanılabileceğinin göstergesidir. Önerilen mikro ekstraksiyon yöntemi, çalışmamızda görüldüğü gibi, hem standartlara, hem analit içeren gerçek numunelere ve hem de spike edilen numunelere uygulanabilmektedir. Burada matriks at idrarıdır, ancak önerilen mikro ekstraksiyon tekniği, diğer matrikslerde, vücut sıvılarında vb. modifiye edilerek uygulanabilir. Ayrıca, önerilen mikro ekstraksiyon tekniği, bir kromatografik yöntemin numune hazırlanmasında kullanılabildiği gibi, diğer analiz yöntemleri öncesinde de kullanılabilir.

Geliştirilen dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin basamaklarında uygun değişikliklerin yapılması ile diğer doping maddelerinin de idrarda analizlerinin yapılabilir hale gelmesi geliştirilen yöntemin aynı zamanda tarama yöntemi halinde uygulanmasını mümkün kılabilir.

KAYNAKLAR

1. At Yarışları Yönetmeliği. (19.04.2011). *Resmi Gazete*, 27910.
2. KAYA, S. (2015). *At Yarışlarında Doping*. (Birinci Baskı). Ankara: Medisan Yayınevi, 5-37.
3. Wong, J.K.Y., Wan, T.S.M. (2014). Doping control analysis in horseracing: A Clinician's guide. *The Veterinary Journal*, 200, 8-16.
4. Kwok, W.H., Choi, T.L.S., Tsoi, Y.Y.K., Leung, G.N.W., Wan, T.S.M. (2017). Screening of over 100 drugs in horse urine using automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for doping control. *Journal of Chromatography A*, 1490, 89-101.
5. IFHA. (2016). International Agreement on Breeding and Racing and Wagering, Article 6A:Prohibited Substances, 26.
6. Moffat, A.C., Osselton, M.D., Widdop, B., Watts, J., (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. (4. Edition). London: Pharmaceutical Press.
7. Addis-Smith, L.F. (1961). The changing pattern of "doping" in horse racing and its control. *New Zealand Veterinary Journal*, 9(6), 121-128.
8. Farmilo, C.G., Genest, K. (1961). Alkaloids and related bases: Identification. *Toxicology*, 209-595.
9. Debackere, M., Laruelle, L. (1968). Isolation, detection and identification of some alkaloids or alkaloid-like substances in biological specimens from horses with special reference to doping. *Journal of Chromatography A*, 35(2), 234-247.
10. İnternet: IFHA-Feed Contaminants Environmental Substances Guidelines. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.ifhaonline.org%2Fresources%2FFeed_Contaminants_Environmental_Substances_Guidelines.pdf&date=2017-12-29, Son Erişim Tarihi: 29.12.2017.
11. İnternet: IFHA- International Screening Limits-Urine. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.ifhaonline.org%2Fdefault.asp%3Fsection%3DIABRW%26area%3D1&date=2018-01-04>, Son Erişim Tarihi: 04.01.2018.
12. İnternet: IFHA- International Screening Limits-Plasma. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.ifhaonline.org%2Fdefault.asp%3Fsection%3DIABRW%26area%3D6&date=2018-01-04>, Son Erişim Tarihi: 04.01.2018.
13. IFHA. (2013). Report on Prohibited Substances; Racing Medication and Testing Consortium, ABD, 3-10.
14. IFHA. (2014). Report on Prohibited Substances; Racing Medication and Testing Consortium, ABD, 3-14.

15. IFHA. (2015). Report on Prohibited Substances; Racing Medication and Testing Consortium, ABD, 3-13.
16. RX Media Pharma^(R). (2018). İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı.
17. Kohler, I., Schappler, J., Rudaz, S., (2013). Highly sensitive capillary electrophoresis-mass spectrometry for rapid screening and accurate quantitation of drugs of abuse in urine. *Analytica Chimica Acta*, 780, 101-109.
18. Kayaalp, S.O. (2012). *Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. (Onüçüncü Baskı). Ankara: Pelikan Yayıncılık.
19. KAYA, S., Pirinççi, İ., Bilgili, A. (2002). *Veteriner Hekimliğinde Farmakoloji*. (Üçüncü Baskı). Ankara: Medisan Yayınevi.
20. Moffat, A.C. (1986). *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*. (2. Edition). Londra: Pharmaceutical Press, 693.
21. Alshehri, S., Shakeel, F. (2017). Solubility measurement, thermodynamics and molecular interactions of flufenamic acid in different neat solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 240, 447-453.
22. Kioussi, M.K., Lyris, E.M., Angelis, Y.S., Tsivou, M., Koupparis, M.A., Georgakopoulos, C.G. (2013). A generic screening methodology for horse doping control by LC-TOF-MS, GC-HRMS nad GC-MS. *Journal of Chromatography B*, 941, 69-80.
23. Dhananjeyan, M.R., Bykowski, C., Trendel, J.A., Sarver, J.G., Ando, H., Erhardt, P.W. (2007). Simultaneous determination of procaine and para-aminobenzoic acid by LC-MS/MS method. *Journal of Chromatography B*, 847, 224-230.
24. Stanley, S.M.R., Foo, H.C. (2006). Screening for basic drugs in equine urine using direct-injection differential-gradient LC-LC coupled to hybrid tandem MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 836, 1-14.
25. Xu, L., Lee, H.K. (2009). Sulfonated polyvinyl chloride fibers for cation-exchange microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1216, 6549-6553.
26. Takeda, A., Tanaka, H., Shinohara, T., Ohtake, I. (2001). Systematic analysis of acid, neutral and basic drugs in horse plasma by combination of solid-phase extraction, non-aqueous partitioning and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 758, 235-248.
27. Kohler, I., Schappler, J., Sierro, T., Rudaz, S. (2013). Dispersive liquid-liquid microextraction combined with capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry for urine analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 73, 82-89.
28. Pavlović, D.M., Pinušić, T., Periša, M., Babić, S. (2012). Optimization of matrix solid-phase dispersion for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of 12 pharmaceuticals in sediments. *Journal of Chromatography A*, 1258, 1-15.

29. Wang, C.Y., Hu, X.Y., Jin, G.D., Leng, Z.Z. (2002). Differential pulse adsorption voltammetry for determination of procaine hydrochloride at a pumice modified carbon paste electrode in pharmaceutical preparations and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 131-139.
30. Xu, L.X., Shen, Y.X., Wang, H.Y., Jiang, J.G., Xiao, Y. (2003). Spectrometric determination of procaine hydrochloride in pharmaceutical products using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid as the chromogenic reagent. *Spectrochimica Acta Part A*, 59, 3103-3110.
31. Carretero, A.S., Cruces-Blanco, C., Peinado, S.F., El Bergmi, R., Gutiérrez A.F. (1999). Fluorimetric determination of procaine in pharmaceutical preparations based on its reaction with fluorecamine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 969-974.
32. Juan, W.X., Feng, ., Fei, D., Qing, L.W., Yu, C.Q., Gang, C.X., Bao, X.C. (2013). Simultaneous determination of 12 β -agonists in feeds by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1278, 82-88.
33. Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Shi, X., Ye, J. (2010). Determination of β -agonists in pig feed, pig urine, and pig liver using capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Meat Science*, 85, 302-305.
34. Kootstra, P.R., Kuijpers, C.J.P.F., Wubs, K.L., van Doorn, D., Sterk, S.S., van Ginkel, L.A., Stephany, R.W. (2005). The analysis of beta-agonists in bovine muscle using molecular imprinted polymers with ion trap LCMS screening. *Analytica Chimica Acta*, 529, 75-81.
35. Guo, C., Shi, F., Gong, L., Tan, H., Hu, D., Zhang, J. (2015). Ultra-trace analysis of 12 β -agonists in pork, beef, mutton, and chicken by ultrahigh-performance liquid-chromatography-quadrupole-orbitrap tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 107, 526-534.
36. Mauro, D., Ciardullo, S., Civitareale, C., Fiori, M., Pastorelli, A.A., Stacchini, P., Palleschi, G. (2014). Development and validation of a multi-residue method for determination of 18 β -agonists in bovine urine by UPLC-MS/MS. *Microchemical Journal*, 115, 70-77.
37. León, N., Roca, M., Igualada, C., Martins, C.P.B., Pastor, A., Yusá, V. (2012). Wide-range screening of banned veterinary drugs in urine by ultra high liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1258, 55-65.
38. Suo, D., Wang, R., Wang, P., Fan, X., Su, X. (2017). Pseudo template molecularly imprinted polymer for determination of 14 kind of β -agonists in animal urine by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1526, 23-30.

39. Tharpa, K., Basavaiah, K., Revanasiddappa, H.D., Vinay, K.B. (2010). Spectrophotometric determination of isoxsuprine hydrochloride using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride in spike human urine and pharmaceuticals. *Talanta*, 81, 1216-1223.
40. Alarfaj, N.A.A. (2002). Fluorimetric determination of isoxsuprine hydrochloride in pharmaceuticals and biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, 331-335.
41. Belal, F., AL-Malaq, H.A., AL-Majed, A.A. (2000). Voltammetric determination of isoxsuprine and fenoterol in dosage forms and biological fluids through nitrosation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23, 1005-1015.
42. Xiao, X., Yan, K., Xu, X., Li, G. (2015). Rapid analysis of ractopamine in pig tissues by dummy-template imprinted solid-phase extraction coupling with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Talanta*, 138, 40-45.
43. Musenga, A., Cowan, D.A. (2013). Use of ultra-high pressure liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for fast screening in high throughput doping control. *Journal of Chromatography A*, 1288, 82-95.
44. Girón, A.J., Deventer, K., Roels, K., Eenoo, P.V. (2012). Development and validation of an open screening method for diuretics, stimulants and selected compounds in human urine by UHPLC-HRMS for doping control. *Analytica Chimica Acta*, 721, 137-146.
45. Lu, J., Wang, S., Dong, Y., Wang, X., Yang, S., Zhang J., Deng, J., Qin, Y., Xu, Y., Wu, M., Ouyang G. (2010). Simultaneous analysis of fourteen tertiary amine stimulants in human urine for doping control purposes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. (2010). *Analytica Chimica Acta*, 657, 45-52.
46. Chen, L., Liao, L., Zuo, Z., Yan, Y., Yang, L., Fu, Q., Chen, Y., Hou, J. (2007). Simultaneous determination of nikethamide and lidocaine in human blood and cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 1757-1762.
47. Garces, N.R., Bojko, B., Pawliszyn, J. (2014). High throughput quantification of prohibited substances in plasma using thin film solid phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1374, 40-49.
48. Badoud, F., Grata, E., Perrenoud, L., Avois, L., Saugy, M., Rudaz, S., Veuthey, J.L. (2009). Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. I. Screening analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4423-4433.
49. Badoud, F., Grata, E., Perrenoud, L., Avois, L., Saugy, M., Rudaz, S., Veuthey, J.L. (2009). Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. II: Confirmatory analysis. *Journal of Chromatography A*, 1217, 4109-4119.

50. Thuyne, W. V., Eenoo, P.V., Delbeke, F.T. (2007). Comprehensive screening method for the qualitative detection of narcotics and stimulants using single step derivatisation. *Journal of Chromatography B*, 857, 259-265.
51. Kolmonen, M., Leinonen, A., Pelander, A., Ojanpera, I. (2007). A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 585, 94-102.
52. Leung, G.N.W., Tang, H.P.O., Tso, T.S.C., Wan, T.S.M. (1996). Separation of basic drugs with non-aqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 738, 141-154.
53. Moulard, Y., Chouriberry, L.B., Boyer, S., Garcia, P., Popot, M.A., Bonnaire, Y. (2011). Use of benchtop exactive high resolution and high mass accuracy orbitrap mass spectrometer for screening in horse doping control. *Analytica Chimica Acta*, 700, 126-136.
54. Song, S., Shi, X., Li, R., Lin, Z., Wu, A., Zhang, D. (2008). Extraction of chlorpromazine with a new molecularly imprinted polymer from pig urine. *Process Biochemistry*, 43, 1209-1214.
55. Yamini, Y., Faraji, M. (2014). Extraction and determination of trace amounts of chlorpromazine in biological fluids using magnetic solid phase extraction followed by HPLC. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(4), 278-285.
56. Xiao, Q., Hu, B. (2010). Hollow fiber-liquid phase microextraction combined with gas chromatography for the determination of phenothiazine drugs in urine. *Journal of Chromatography B*, 878, 1599-1604.
57. Li, J., Zhao, F., Ju, H. (2006). Simultaneous determination of psychotropic drugs in human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 575, 57-61.
58. Borges, N.C., Rezende, V.M., Santana J.M., Moreira, R.P., Moreira, R.F., Moreno, P., Borges, D.C., Donato, J.L., Moreno, R.A. (2011). Chlorpromazine quantification in human plasma by UPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Application to a comparative pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 879, 3728-3734.
59. Asghari, A., Fahimi, E., Bazregar, M., Rajabi, M., Boutorabi, L. (2017). Rapid determination of some psychotropic drugs in complex matrices by tandem dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1052, 51-59.
60. Zhang, G., Terry Jr, A.V., Bartlett, M.G. (2007). Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of the lipophilic antipsychotic drug chlorpromazine in rat plasma and brain tissue. *Journal of Chromatography B*, 854, 68-76.

61. Daniel, D., Gutz, I.G.R. (2005). Spectroelectrochemical determination of chlorpromazine hydrochloride by flow-injection analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37, 281-286.
62. Sales, M.G.F., Tomás, J.F.C., Lavandeira, S.R. (2006). Flow injection potentiometric determination of chlorpromazine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1280-1286.
63. Ho, E.N.M., Leung, D.K.K., Wan, T.S.M., Yu, N.H. (2006). Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1120, 38-53.
64. Helfer, A.G., Michely, J.A., Weber, A.A., Meyer, M.R., Maurer, H.H. (2017). Liquid chromatography-high resolution-tandem mass spectrometry using Orbitrap technology for comprehensive screening to detect drugs and their metabolites in blood plasma. *Analytica Chimica Acta*, 965, 83-95.
65. Dahane, S., Galera M.M., Marchionni, M.E., Viciano M.M.S., Derdour A., Garcia, M.D.G. (2016). Mesoporous silica based MCM-41 as solid-phase extraction sorbent combined with micro-liquid chromatography-quadrupole-mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals in waters. *Talanta*, 152, 378-391.
66. Huang, S., Zhu, F., Jiang, R., Zhou, S., Zhu, D., Liu, H., Ouyang, G. (2015). Determination of eight pharmaceuticals in an aqueous sample using automated derivatization solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 136, 198-203.
67. Mikami, E., Goto, T., Ohno, T., Matsumoto, H., Inagaki, K., Ishihara, H., Nishida, M. (2000). Simultaneous analysis of anthranilic acid derivatives in pharmaceuticals and human urine by high-performance liquid chromatography with isocratic elution. *Journal of Chromatography B*, 744, 81-89.
68. Hoshina, K., Horiyama, S., Matsunaga H., Haginaka, J. (2011). Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using molecularly imprinted polymers as a pretreatment column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 916-922.
69. Peters, R.J.B., Bolck, Y.J.C., Rutgers, P., Stolker, A.A.M., Nielen, M.W.F. (2009). Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography mass time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 8206-8216.
70. Araujo, L., Wild, J., Villa, N., Camargo, N., Cubillan, D., Prieto, A. (2008). Determination of anti-inflammatory drugs in water samples, by in situ derivatization, solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 75, 111-115.

71. Vázquez, M.M.P., Vázquez, P.P., Galera, M.M., García, M.D.G., Uclés, A. (2013). Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry for simultaneous analysis of pharmaceuticals in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1291, 19-26.
72. Muñoz de la Peña, A., Mora Díez, N., Bohoyo Gil, D., Oliveri, A.C., Escandar, G.M. (2006). Simultaneous determination of flufenamic and meclofenamic acids in human urine samples by second-order multivariate parallel factor analysis (PARAFAC) calibration of micellar-enhanced excitation-emission fluorescence data. *Analytica Chimica Acta*, 569, 250-259.
73. Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Sanz, A., Bravo, E. (1998). Determination of flufenamic, meclofenamic and mefenamic acids by capillary electrophoresis using β -cyclodextrin. *Journal of Chromatography B*, 708, 249-256.
74. Aly, F.A., Al-Tamimi, S.A., Alwarthan, A.A. (2000). Determination of flufenamic acid and mefenamic acid in pharmaceutical preparations and biological fluids using flow injection analysis with tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 416, 87-96.
75. Mahugo-Santana, C., Sosa-Ferrera, Z., Torres-Padron, M.E., Santana-Rodríguez, J.J. (2011). Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30, 731-748.
76. Liu, H., Dasgupta, P.K. (1996). Analytical chemistry in a drop. solvent extraction in a microdrop. *Analytical Chemistry*, 68, 1817-1821.
77. Yazdi, A.S., Amiri, A. (2010). Liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29, 1-14.
78. Tor, A., Aydin, M.E. (2006). Application of liquid-phase microextraction to the analysis of trihalomethanes in water. *Analytica Chimica Acta*, 575, 138-143.
79. Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A. (2004). Application of solvent microextraction in a single drop for the determination of new antifouling agents in waters. *Journal of Chromatography A*, 1049, 17-23.
80. Psillakis, E., Kalogerakis, N. (2002). Developments in single-drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21, 54-64.
81. Jeannot, M.A., Przyjazny, A., Kokosa, J.M. (2010). Single drop microextraction-Development, application and future trends. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2326-2336.
82. Theis, A. L., Waldack, A. J., Hansen, S. M., Jeannot, M. A. (2001). Headspace solvent microextraction. *Analytical Chemistry*, 73(23), 5651-5654.
83. Ma, M., Cantwell, F.F. (1998). Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: preconcentration into a single microdrop. *Analytical Chemistry*, 71, 388-393.

84. Yazdi, A.S., Mofazzeli, F., Es'haghi, Z. (2009). Determination of 3-nitroaniline in water samples by directly suspended droplet three-phase liquid-phase microextraction using 18-crown-6 ether and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5086-5091.
85. Liu, W., Lee, H.K. (2000). Continuous-flow microextraction exceeding 1000-fold concentration of dilute analytes. *Analytical Chemistry*, 72, 4462-4467.
86. Vidal, L., Chisvert, A., Canals, A., Salvador, A. (2010). Ionic liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface water samples. *Talanta*, 81, 549-555.
87. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, E.K. (1999). Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 71, 2650-2656.
88. Es'haghi Z. (2009). Determination of widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples by in situ derivatization, continuous hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detector. *Analytica Chimica Acta*, 641, 83-88.
89. Wu, Y., Hu, B. (2009). Simultaneous determination of several phytohormones in natural coconut juice by hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7657-7663.
90. Lee, J., Lee, H.K., Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S. (2008). Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: a review. *Analytica Chimica Acta*, 624, 253-268.
91. Khalili Zanjani, M.R., Yamini, Y., Shariati, S., Jönsson, J.A. (2007). A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Analytica Chimica Acta*, 585, 286-293.
92. Leong, M.I., Huang, S.D. (2009). Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extraction of organochlorine pesticides in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7645-7650.
93. Zang, X.H., Wu, Q.H., Zhang, M.Y., Xi, G.H., Wang, Z. (2009). Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37, 161-168.
94. Rezaee, M., Yamini, Y., Faraji, M. (2009). Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2342-2357.
95. Grob, B. (2015). Ionization efficiency of LC-(ESI)MS/MS & LC-MS/MS determination of beta-oxidation acyl-CoA intermediates in cultured fibroblasts (Master thesis, University of Amsterdam, 2015).
96. YILMAZ, A. (2012). Kimyasal analizlerde metod validasyonu ve verifikasyonu. *TURKLAB Rehber*, No:01.

97. FDA. (2013). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM).
98. EURACHEM (1998). The fitness for purpose of analytical methods. *EURACHEM Guide*.
99. Horwitz, W., Albert, R. (2006). The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International*, 89(4), 1095-1109.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇABUK, T. Zilhan
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 23/07/1982 İzmir
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (312) 326 00 90
 Faks : 0 (312) 321 17 55
 e-mail : zilhany@hotmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet
Doktora	G.Ü. Eczacılık Fakültesi/Analitik Kimya A.B.D.	Devam ediyor
Yüksek Lisans	G.Ü. Fen Fakültesi/Kimya Bölümü	2007
Lisans	G.Ü. Fen Fakültesi/Kimya Bölümü	2004
Lise	Fethiye Kemal Mumcu Anadolu Lisesi	1999

İş Deneyimi, Yıl

Yıl	Yer	Görev
2007- Devam ediyor	G.T.H.B. Etlik Vet. Kont. Mer. Araş. Enstitüsü	Kimyager
2006-2007	E.G.M. Kayseri Kriminal Polis Laboratuvarı	Kimyager

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Cabuk, T.Z., Sari, B., Unal, H.I. (2010). Preparation of novel polyindene/polyoxymethylene blends and investigation of their properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 117(6), 3659-3664.

Hobiler

Resim, yüzme



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

