

**DERLEME**

# Yarış atlarında kullanımı suistimal edilen bazı non-steroidal antienflamatuvar ilaçların biyolojik örneklerden kromatografik yöntemlerle miktar tayini

Esra Tatar<sup>1</sup>, Sibel Topçu<sup>2</sup>, İlkyay Küçükgülzel<sup>1</sup>

**ÖZET:** Dünya Anti-Doping Ajansı (WADA) tarafından hazırlanan ve güncellenen, yarışmalar sırasında ve/veya serbest zamanlarda kullanımı yasaklı ilaç gruplarını ve yöntemlerini içeren listelerde yer almayan, ancak atlarda kullanımı suistimal edilen bazı non-steroidal antienflamatuvar ilaçların (asetilsalisilik asit, benzidamin, bufeksamak, diklofenak sodyum, diflunisal, eltenak, etodolak, etorikoksib, felbinak, fenilbutazon, flufenamik asit, fluniksın, flurbiprofen, ibuprofen, indometazin, indoprofen, karprofen, ketoprofen, ketorolak, meklofenamik asit, mefenamik asit, meloksikam, mofebutazon, naproksen, niflumik asit, nimesulid, oksifenbutazon, piroksikam, ramifenazon, selekoksib, sulindak, tenoksikam, tiaprofenik asit, tolfenamik asit, tolmetin, valdekoksib ve vedaprofen) atlara ait biyolojik örneklerden hareketle kromatografik yöntemlerle gerçekleştirilen nicel ve nitel analizleri ana hatları ile derlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Kromatografi, ilaç izlenmesi, non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar, atlar.

## ATLARDA AĞRI VE TEDAVİSİ

Yarış atlarının aniden gelişen ve açıklanamayan nedenlerle veya yarışlar ve antrenmanlar sırasında meydana gelen yaralanmalar sebebiyle öldüğü bilinmektedir. Ağırlıkları, mensup oldukları ırklara göre 350-1000 kg arasında değişen ve bu ağırlığı taşıyan ayak bileklerinin kalınlığı bir insanınkinden çok da farklı olmayan atlar, kas-iskelet sistemleri gelişimini tamamlamadan yarışlarda ve antrenmanlarda saatte yaklaşık 30 mil hızla koşmaya zorlanmakta ve meydana gelen yaralanmaların tedavisinde yüksek dozda narkotik analjezikler ve temini kontrole tabi reçetelere bağlı olmadığı için kolaylıkla satın alınabilen non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar kullanılmaktadır (1).

Yarışlar ya da antrenmanlar sırasında atlarda meydana gelen yaralanmaların nedeni olarak gösterilen dış faktörler; çevresel şartlar ve beslenmeye bağlı koşullar, yarış pistinin uzunluğu, yarış pisti zemininin fiziksel koşulları, atın koştuğu yarışların sıklığı ve antrenman yöntemi olarak belirlenirken bazı iç faktörler; atın yaşı, ırkı, hastalık hikayesi başlıkları altında toplanmıştır. Ya-

ışlar sırasında meydana gelen bir yaralanma ata ötenazi uygulanmasını gerektirecek kadar ağırsı katastrofik, atın tedavi ile sağlıklı hale getirilebileceği düşünülüyorsa non-katastrofik olarak tanımlanmıştır. Örneğin; 1 Ocak 1995'ten 31 Aralık 1996'ya kadar Kentucky'de yapılan yarışlarda meydana gelen 210 yaralanmanın 84'ü katastrofik olarak değerlendirilirken 126'sı yani %60'ı non-katastrofik olarak değerlendirilmiştir (2).

WADA (3) tarafından hazırlanan ve güncellenen listelerde, yarışmalar sırasında kullanımı yasaklı olan ilaç gruplarından biri de narkotiklerdir. Bununla birlikte, non-steroidal antienflamatuvarların bu listede yer almaması bu ilaçların kötüye kullanılmasına neden olmaktadır. Yasaklı maddeler listesinde yer almayan non-steroidal antienflamatuvar ilaçların kullanımına sınırlama getirmek amacıyla Amerikan Ulusal Binicilik Gönüllülerini Koruma Birliği (National Horsemen's Benevolent & Protective Association) tarafından 2003 yılında yayınlanan bildiri (4) yarışmalar sırasında yapılacak doping kontrollerinde kıstas alınmak üzere non-steroidal antienflamatuvar ilaçların idrar ve plazmada tayin alt limitleri açıklanmıştır. Buna

## KURUM

<sup>1</sup>Marmara Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi,  
Farmasötik Kimya Anabilim  
Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Mustafa Nevzat İlaç A.Ş.,  
İstanbul, Türkiye

## İLETİŞİM

Esra Tatar  
E-posta:  
etatar@marmara.edu.tr

Gönderilme:  
26.10.2011

Revizyon:  
22.02.2012

Kabul:  
24.02.2012

rağmen, Uluslararası At Yarışı Yetkilileri Federasyonu (International Federation of Horseracing Authorities) 2007 yılında yayınladığı raporunda (5) 13 ülkede sürdürdüğü doping kontrolleri kapsamında yapılan 517 analizden 229'unda fenilbutazon, 63'ünde ise flunüksin tespit edildiğini bildirmiştir. Plazma tayin alt limitleri oldukça geniş bir aralığa sahip olan flunüksin (1-500 ng/ml) ve fenilbutazon'un (5-700 ng/ml) atlara ait biyolojik örneklerde sıklıkla tespiti non-steroidal antienflamatuvar ilaçların yarışı atlarında tedavi amaçlı değil de prostaglandin sentezini baskılamaları nedeniyle enflamasyonlu dokunun oluşturduğu ağrıya karşı aşırı duyarlılığı azaltarak ya da ortadan kaldırarak atların fiziksel performansını arttırmak için kullanıldığının çarpıcı bir göstergesidir (2).

Uluslararası Ağrı Araştırmaları Teşkilatı'na (International Association For The Study of Pain, IASP) göre ağrı; "Var olan veya olası doku hasarına eşlik eden veya bu hasar ile tanımlanabilen hoş gitmeyen duysal ve duygusal deneyim ve bir korunma mekanizması" olarak tanımlanmaktadır (6-7).

Hayvanların ağrıyı lobotomi uygulanan insanların hissettikleri ağrıya benzer şekilde hissettikleri öne sürülmüş ve hayvanlarda ağrının; doku hasarı ile ağrının algılanması arasında oluşan elektrokimyasal olayların bir bütünü, yani nosisepsiyon olarak tanımlandığı bildirilmiştir. Bu varsayımlar, hayvanların hoş gitmeyen duysal ve duygusal deneyimleri insanların bilinç düzeyinde yaşamamaları ile temellendirilmiştir (8). Uluslararası Ağrı Araştırmaları Teşkilatı bünyesinde 2003 yılında kurulan Uluslararası Veteriner Ağrı Kontrolü Akademisi (International Academy of Veterinary Pain Management, IVAPM); çalışma alanını hayvanlarda ağrı teşhisi ve tedavisi olarak belirlemiştir. 2010 Yılında yayınlanan bir makalede hayvanlarda ağrının daha geniş kapsamlı bir tanımı yapılmış ve ağrı hayvanı yaralanmadan veya vücut bütünlüğünün bozulmasına yol açacak herhangi bir durumdan haberdar eden, hayvanın fizyolojisini ve tepkilerini hasarı azaltmak, kendinden uzaklaştırmak, tekrarlama olasılığını azaltmak ve iyileşmeyi teşvik etmek için değiştiren caydırıcı bir duysal etken ve duygusal deneyim olarak tanımlanmıştır. Aynı araştırmada, atlarda ağrının endişe, isteksizlik, topallama, belirli bir ayağa ağırlığını vererek basma, yürürken zemine takılma gibi klinik açıdan önemli işaretlerle kendini belli ettiği bildirilmiş ve bu işaretlerin nedenlerinin araştırılmaması sonucunda ağrı kronikleşirse ya da şiddetli hale ge-

lirse tedavi edilemez bir tablo olan hastalık sendromuna dönüşebileceği uyarısı yapılmıştır (9).

İnsanlarda olduğu gibi atlarda da; kızarıklık, şişme, ateş, ağrı ve işlev kaybının temel belirtileri olduğu ifade edilen enflamasyon tablosunda ağrıya karşı aşırı duyarlılığın (hiperaljezi) da enflamasyonla eş zamanlı olarak oluştuğu ve doku zedelenmesi ve onarılmasından sorumlu aracı bileşiklerin de bu durumu tetiklediği bildirilmiştir (1). Hiperaljezi oluşumunda, hücre zarının bozulmasını takiben araşidonik asitten hareketle üretilen ve özellikle fibroblastlardan ve sinoviyositlerden serbestleştirilen prostaglandinler anahtar rolü oynamaktadır. Prostaglandinlerin oluşum mekanizması incelendiğinde; siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) olmak üzere iki izoformu bulunan siklooksijenazların (COX) tartışılmaz etkisini görmek mümkündür. Bu nedenle ağrı tedavisi de bu iki enzimin inhibe edilmesi üzerine kurulmuştur (1).

Atlarda; ağrı, süreye göre sınıflandırılmakta, akut ağrı ve kronik ağrı olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır (1):

Atlarda akut ağrıların genellikle cerrahi girişimler sonrası geliştiği bildirilmiştir. Cerrahi girişimin yapıldığı bölgeye göre akut ağrılar; genel ağrılar, kas-iskelet sisteminden kaynaklanan ağrılar ve visseral (iç organlarla ilgili) ağrılar olarak sınıflandırılmıştır (1, 8).

Atlarda genel ağrıların ve kas-iskelet sisteminden kaynaklanan ağrıların tedavisinde non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAID) tercih edilen ilk ilaç grubu iken atlarda karşılaşılan en yaygın visseral ağrı örneği olan koliklerin tedavisinde  $\alpha_2$  agonistler, lidokain ve butilskopolamin'den sonra non-steroidal antienflamatuvar ilaçların tercih edildikleri bildirilmiştir (1,10). Atlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda  $\mu$  (morfin) reseptörüne bağlanan narkotik analjeziklerin tedavi dozlarında lokomotor ve otonom uyarımlar oluşturduğu ve bununla birlikte analjezi düzeyinin ihmal edilebilecek düzeyde düşük olduğu buna karşın kappa reseptör agonistlerinin atlarda daha yüksek analjezik etkinlik gösterdiği bildirilmesine rağmen cerrahi girişim sonrası ağrı tedavisinde  $\mu$  reseptörüne bağlanan uzun etki süreli bir kısmi agonist opioid olan *buprenorfin*'in tercih edildiği bildirilmiştir (8, 11).

Atlarda akut ağrıların tedavisinde kullanılan ilaçlar Tablo 3.1.1'de verilmiştir.

**TABLO 3.1.1.** Atlarda akut ağrıların tedavisinde kullanılan ilaçlar.

Genel Ağrılar	Kas-İskelet Sisteminden Kaynaklanan Ağrılar	Visseral Ağrılar
Non-steroidal Antienflamatuvar İlaçlar	Non-steroidal Antienflamatuvar İlaçlar	$\alpha_2$ -Agonistleri
Opioidler Morfin Metadon Meperidin Butarfanol Buprenorfin Tramadol	$\alpha_2$ -Agonistleri	Lidokain
$\alpha_2$ -Agonistleri Ksilazin Detomidin Medetomidin Romifidin	Opioidler	Butilskopolamin
Lokal anesteziçiler Ketamin	Lokal anesteziçiler Morfin Fentanil	Non-steroidal Antienflamatuvar İlaçlar Opioidler Butarfanol

**TABLO 3.1.2.** Atlarda kronik ağrıların tedavisinde kullanılan ilaçlar.

Kas-İskelet Sisteminden Kaynaklanan Ağrılar	Visseral Ağrılar
Non-steroidal Antienflamatuvar İlaçlar	Non-steroidal Antienflamatuvar İlaçlar
Lokal anestezipler (özellikle Lidokain)	Lidokain
Morfin	Butilskopolamin
Butarfanol	$\alpha$ 2-Agonistleri (özellikle Ksilazin)
Fentanil	Butarfanol
Ketamin	

**TABLO 3.1.3.** Atlarda ağrı tedavisinde sıklıkla kullanılan non-steroidal antienflamatuvar ilaçların dozları, doz rejimleri ve uygulama yolları.

	Doz (mg/kg)	Doz Aralığı (saat)	Uygulama Yolu
Flunixin meglumin	0,2-1,1	8-12	iv, im, po
Fenilbutazon	2,2-4,4	12-24	iv, po
Dipiron (Metamizol)	10-20	8-12	iv, im
Asetilsalisilik asit	5-20	24-48	po
Naproksen	5	24	iv, po
Ketoprofen	2,0-2,5	24	iv, im
Karprofen	0,7-1,4	12-24	iv, po
Vedaprofen	1	12-24	iv
Meloksikam	0,6	12-24	iv
Etodolak	23	12-24	iv, im, po
Eltenak	0,5	12-24	iv

Atlarda kronik ağrıların, kas-iskelet sisteminden kaynaklandığı veya visseral tipte ağrılar olduğu ve kronik ağrıların tedavisinde non-steroidal antienflamatuvar ilaçların tercih edilen ilk ilaç grubu olduğu bildirilmiştir (1).

Atlarda kronik ağrıların tedavisinde kullanılan ilaçlar Tablo 3.1.2'de verilmiştir.

Atlarda ağrı tedavisinde sıklıkla kullanılan non-steroidal antienflamatuvar ilaçların dozları, doz rejimleri ve uygulama yolları Tablo 3.1.3'te verilmiştir.

Yarış atlarında, ağrı kontrolü amacıyla kullanılan narkotik analjeziklerin ve non-steroidal antienflamatuvar ilaçların doping amacıyla kötüye kullanılabilirdiği bilinmektedir. Yirminci yüzyılın başlarında doping terimi yarış atlarına verilen afyon ve benzeri narkotik karışımları tanımlamak için kullanılmıştır (12). Narkotik analjezikler, kuvvetli ağrı kesici etkilerinden dolayı ağrı eşiğini yükselttiklerinden yarış atlarının ağrıları duyumsamamaları ve yüksek fiziksel performans gerektiren antrenman ve/veya yarışma koşullarında sakinlik hali oluşturmaları nedeniyle tercih edilmişlerdir. Gerek dünyanın çeşitli ülkelerinde gerekse de ülkemizde narkotik analjeziklerin reçete edilmelerinin ve kullanılmalarının kontrole tabi olması reçetesiz olarak da edinilebilen non-steroidal antienflamatuvar ilaçların narkotik analjezikler yerine doping olarak kullanılmasının yolunu açmıştır.

Uluslararası At Yarışı Yetkilileri Federasyonu tarafından yapılan araştırmada, yarışmalar sırasında yarış atlarından alınan numunelerde diklofenak sodyum, dimetil sülfoksit, etodolak, fenilbutazon, flunixin, flufenamik asit, flurbiprofen, ibuprofen, indometazin, ketoprofen, naproksen, oksifenbutazon, ramifenazon ve tolfenamik asit gibi antienflamatuvar ilaçların tespit edildiği bildirilmiştir. 1983-2007 yılları arasında, gerek yarışmalar sırasında gerekse yarışma dışı koşullarda yarış at-

larından alınan numunelerde tespit edilen non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar ve bazı non-steroidal antienflamatuvar ilaçlara ait metabolitler Tablo 3.1.4'te verilmiştir (5).

2003 yılında yayınlanan bir bildiri (4) yarış atlarından alınan kan ve idrar numunelerinde sıklıkla tespit edilen ancak yarış atlarının performanslarını çok fazla etkilemedikleri düşünülen ve daha çok tedavi amacıyla kullanılan bazı non-steroidal antienflamatuvar ilaçların kullanımına sınırlamalar getirilmiş ve bu bileşiklerin atlara ait biyolojik örneklerde ölçüm alt sınırları açıklanmıştır. Yarışmalar sırasında kullanılmaları sınırlandırılan non-steroidal antienflamatuvar ilaçlara ait tayin alt sınırları Tablo 3.1.5'te verilmiştir.

#### **GAZ KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (GC-MSN), SIVI KROMATOĞRAFİSİ-UV SPEKTROSKOPİSİ (LC-UV) VE SIVI KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (LC-MSN) YÖNTEMLERİ KULLANILARAK YAPILAN DOPİNG KONTROLÜ VE BİYÖİZLEME ÇALIŞMALARI**

GC-MS tekniğinin, günümüzde uçucu olan zenobiyotiklerin tayini için kullanılmakta olan çok hassas ve özgül bir yöntem olduğu bilinmektedir. Sistemik toksikolojik analizlerde elektron çarpıtma (EI) yöntemi ile çalışıldığında kapsamlı taramaların yapılabilirdiği ve bu yöntemin 6.400'den fazla toksik maddenin ve 200.000'den fazla kimyasalın kütle spektrumlarının birbirleriyle karşılaştırılabildiği bildirilmiştir. EI yöntemi ile bir molekül iyonu piki elde edilemediğinde, pozitif iyon kimyasal iyonlaştırma (PCI) yöntemi ile çalışılarak molekül iyonu pikinin oluşturulduğu ifade edilmiştir. Negatif iyon kimyasal iyonlaştırma (NICI) yönteminin ise PCI ve EI tekniklerine göre elektronegatif gruplar (örneğin halojenler) taşıyan bileşiklerin veya türevlendirme sonucunda yapılarına özellikle halojenlerin kazandırıldığı bileşiklerin analizi için daha duyarlı bir yöntem olduğu açıklanmıştır. NICI yöntemi ile yapı-

**TABLO 3.1.4.** 1983-2007 yılları arasında yarış atlarından alınan numunelerde tespit edilen non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar ve metabolitleri.

Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar	Bazı non-steroidal antienflamatuvar ilaçlara ait metabolitler
Asetilsalisilik asit	Ketorolak
Benzidamin	Meklofenamik Asit
Bufeksamak	Mefenamik Asit
Diklofenak Sodyum	Meloksikam
Diflunisal	Mofebutazon
Dimetil sülfoksit	Naproksen
Eltenak	Niflumik Asit
Etodolak	Nimesulid
Etorikoksib	Piroksikam
Felbinak	Ramifenazon
Fenilbutazon	Selekoksib
Flufenamik Asit	Sulindak
Flunixin	Tenoksikam
Flurbiprofen	Tiaprofenik Asit
İbuprofen	Tolfenamik Asit
İndometazin	Tolmetin
İndoprofen	Valdekoksib
Karprofen	Vedaprofen
Ketoprofen	

**TABLO 3.1.5.** Yarışmalar sırasında kullanılmaları sınırlandırılan non-steroidal antienflamatuvar ilaçlara ait tayin alt sınırları.

Non-steroidal Antienflamatuvar İlaçlar	Tayin Alt Sınırı (ng/ml)		
	İdrar	Kan	Plazma
Dimetilsülfoksit	5	-	1
Fenilbutazon	165	5	5-700
Flunixin	-	-	1-500
İndometazin	-	-	50
Ketoprofen	-	-	50-100
Meklofenamik Asit	-	1	1-2,5
Naproksen	-	5	-
Oksifenbutazon	165	5	5
Salisilatlar ve Salisilik Asit	750	-	6,5

lacak bir analizde negatif iyonun oluşturulabilmesi için nötral bir molekül tarafından bir elektronun yakalanmasının sağlandığı ve elektron yakalama için gereken özgül enerjinin analitin molekül yapısına bağlı olduğu bildirilmiştir. Elektronun eklenmesi endotermik bir tepkime olduğundan, moleküler anyonun fazla enerjiyle yüklenmesi ile elektron kaybını takiben fragment anyonlar oluşturmak üzere parçalanacağı bildirilmiştir. NICI yöntemi ile çalışıldığında genellikle metan gazının (bazı durumlarda amonyak ve izobütanın) reaktif gaz olarak seçildiği ve metanın seçilme nedeninin elektronları yavaşlatıp analit molekül tarafından tutulmalarını sağlaması olduğu belirtilmiştir (13-17).

Benzodiazepin veya klorpirifos gibi bileşiklerin elektronegatif gruplar taşımaları nedeniyle *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroasetamit ve trimetilklorosilan (BSTFA-TMCS) veya *N*-metil-*N*-(ter-butildimetilsilil)trifluoroasetamit gibi ajanlarla sililat türevlerine dönüştürüldükleri bildirilmiştir. Diğer tüm bileşiklerin, trifluoroasetik anhidrit (TFA), pentafluoropropiyonik anhidrit (PFP), heptafluorobütirik anhidrit (HFB), pentafluoro-1-propanol (PFPOH), hekzafluoro-2-propanol (HFPOH), pentafluorobenzil bromür/klorür (PFB) veya bor triflorür (BF<sub>3</sub>) gibi ajanlar kullanılarak halojenli türevlerine dönüştürülebildiği, şiral reaktifler kullanılarak da şiral analitlerin enantiyomerlerinin diastereoizomere dönüştürülerek aşiral kolonlar (ge-

nellikle silika kaplı kılcal kolonlar) vasıtasıyla ayrılabilirdiği bildirilmiştir (13-17).

Atina olimpiyatları kapsamında 2004 yılında hizmet veren doping kontrol laboratuvarında GC-NPD (azot-fosfor detektörü) kromatografi sistemi kullanılarak uçucu özellikteki uyarıcıların ve narkotiklerin, GC-kuadripol kütle spektrometrisi kromatografi sistemi kullanılarak uyarıcılar, narkotikler, steroidler ve diüretikler gibi yüksek molekül ağırlıklı uçucu moleküllerin, <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C izotop oranını ölçebilen GC-C-IRMS kromatografi sistemi kullanılarak testosteron gibi endojen olarak üretilen ancak sentetik türevleri vücuda alınmak suretiyle kötüye kullanılan bileşiklerin, GC-HRMS kromatografi sistemi kullanılarak ise anabolik ajanların izlendiği ve miktar tayini çalışmalarının yapıldığı bildirilmiştir (18).

Atlar üzerinde yapılan çalışmaların oluşturduğu literatürler incelendiğinde ilaçların canlı dokularından alınan örneklerde biyoizlenmesi ve/veya doping kontrolü amacıyla GC-MS<sup>n</sup> yöntemiyle yapılan çalışmaların çok sayıda olduğu görülebilir.

Atlarda gerek tedavi amacıyla gerekse doping olarak kullanılan ilaç etken maddelerinin biyoizlenmesinin yapıldığı laboratuvarlarda yüksek basınçlı sıvı kromatograf-UV detektör ve yüksek basınçlı sıvı kromatograf-fluoresans detektörden oluşan kromatografi sistemlerinin kullanımı, yüksek basınçlı sıvı kromatograf-PDA detektörden ve yüksek basınçlı sıvı kroma-

tograf-kütle detektöründen oluşan kromatografi sistemlerinin yaygınlaşması ile eski önemini yitirmiş, özellikle de yüksek basınçlı sıvı kromatograf-kütle detektöründen oluşan kromatografi sistemlerinin ve APCI (atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırma), EI (elektrosprey iyonlaştırma) gibi yumuşak iyonlaştırma yöntemlerinin kullanıldığı sistemlerin ön plana çıktığı bildirilmiştir. Yumuşak iyonlaştırma yöntemlerinin geliştirilmesiyle diğer kromatografik yöntemlerle zorlukla tespit edilen veya hiç tespit edilemeyen yasaklı ilaçların tanımlanması mümkün olmuştur. Yumuşak iyonlaştırma yöntemlerinin, zaman alan, iş gücü gerektiren türevlendirme işlemlerini gereksiz kıldığı ve analizden önce hidroliz edilmesi gereken konjuge metabolitleri de hidrolize uğratmaksızın tayin edebilme kolaylığı sağladığı bildirilmiştir. Sıvı kromatografisinin; özellikle de çok yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Ultra Performance Liquid Chromatography; UPLC) cihazlarının tandem kütle spektrometrisiyle (LC-MS<sup>2</sup>) birlikte kullanımının; analiz süresini çok kısaltması, analiz maliyetini düşürmesi ve daha duyarlı analiz sonuçları vermesi nedeniyle çok çabuk benimsendiği bildirilmektedir (14, 19-23).

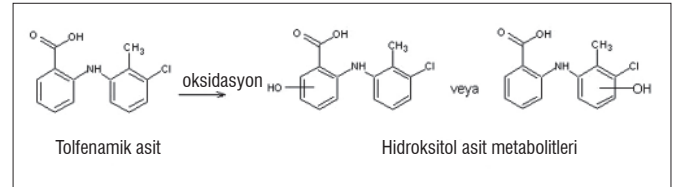
İlaçların canlı dokularından alınan örneklerde biyoizlenmesi ve/veya doping kontrolü gibi amaçların dışında atın besin üreten bir çiftlik hayvanı olarak yetiştirildiği bazı ülkelerde at serumunda ve plazmasında non-steroidal antiinflamatuvar ilaç kalıntılarının tespiti için de LC-MS ve/veya LC-MS<sup>2</sup> yöntemi kullanılmaktadır. İtalya Sağlık Bakanlığı'nın desteği ile 2006 yılında Vinci ve arkadaşları tarafından (24) besin üreten çiftlik hayvanlarının (sığır, domuz, at ve tavşan) serum ve plazmalarındaki non-steroidal antiinflamatuvar ilaç kalıntılarının LC-MS ve/veya LC-MS<sup>2</sup> yöntemi ile kalitatif/kantitatif analizi için ilgili parametreler ve ilaç kalıntısının teşhisini kolaylaştıran iyonlar belirlenmiştir. LC-MS-ESI yöntemi ile çalışıldığında; karprofen, meklofenamik asit ve salisilik asidin sadece negatif iyon modunda izlenebilir olduğu, flurbiprofen ve ibuprofen'in hem pozitif hem de negatif iyon modunda izlenebilir olduğu ancak pozitif iyon modunda ilgili iyonun sodyum artışı ile birlikte tespit edildiği, oksifenbutazon ve süksibutazonla çalışıldığında pozitif iyon modunun daha iyi sonuçlar verdiği, ketoprofen, fenilbutazon, naproksen, niflumik asit, diklofenak, tolfenamik asit ve mefenamik asit analizi söz konusu olduğunda ise gerek negatif gerekse pozitif iyon modu ile çalışıldığında benzer sonuçlar alındığı açıklanmıştır. Doping kontrolü amacı ile yapılmasa da, bu çalışma kapsamında çalışılacak olan non-steroidal antiinflamatuvar bileşiğe göre seçilecek iyon izleme yönteminin ve izlenmesi gereken iyonların tespit edilmiş olmasının biyoizleme ve doping kontrolü amacıyla yapılan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

De Jong ve arkadaşlarının (25) 1989 yılında yayımlanan çalışmalarında at idrarında ibuprofen, ibufenak, aklofenak, diklofenak, fenoprofen, ketoprofen ve naproksen'in miktar tayini için tayin alt sınırı 0,5 µg/ml olan GC-MS yöntemi yerine tayin alt sınırını 5 ng/ml'ye kadar indiren GC-MS<sup>2</sup> yöntemini önerilerek at idrarının karışık matrisinden gelebilecek iyonların ilk detektörde tutulmasının ve seçilmiş reaksiyon izleme (SRM) yöntemi ile çalışılmasının analizi kolaylaştırdığını belirtmiştir.

Atlarda bazı non-steroidal antiinflamatuvar ilaçların (fluniksın, naproksen, indometazin, fenilbutazon ve mefenamik asit) kötüye kullanımının tespiti amacıyla Singh ve arkadaşları (26) tarafından 1991 yılında yapılan bir çalışmada, HPLC-UV ve HPLC-

fluoresans detektör sistemlerinin kullanıldığı miktar tayini yöntemleri geliştirmişlerdir. İlaç suistimali açısından pozitif olarak tespit ettikleri örnekleri ise analizi doğrulama amacıyla bir kez de geliştirdikleri GC-MS-SIM yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda tek dalga boyunda tarama yapan UV detektörün PDA detektöre kıyasla daha hassas sonuçlar verdiğini, naproksen ve fenilbutazon' içeren örneklerde UV ya da PDA detektörle çalışıldığında daha hassas sonuçlar alındığını, GC-MS yöntemi ile asidik ilaç etken maddeleri içeren örnekler analiz edildiğinde elde edilen sonuçların hassasiyetinin örneğe göre değişkenlik gösterdiği, naproksen'in at plazması ve idrarında yapılan miktar tayini çalışmalarında en hassas tayin sonucunun fluoresans detektörle alındığı bildirilmiştir. GC-MS yöntemi ile asidik ilaç etken maddeleri içeren örnekler analiz edildiğinde elde edilen sonuçların hassasiyetinin örneğe ve örneğin derişimine göre değişiklik gösterdiği ve bu yöntemin doğrulama amacıyla örnek belirli derişime zenginleştirildikten sonra uygulanırsa daha hassas sonuçlar verdiği açıklanmıştır

Beşeri tedavide kullanılan tolfenamik asidin 1990'larda veteriner tıbbın kullanımına sunulması ile bileşiğin atlarda topallamayıcı maskeleyici ve bu nedenle doping amacıyla kullanıldığına tespitini üzerine Jaussaud ve arkadaşları (27) doping kontrollerinde kullanılmak üzere bir GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışma sonucunda incelenen plazma örneklerinde tolfenamik asidin insanlarda olduğu gibi atlarda da hidroksilasyona uğradığı, incelenen idrar örneklerinde ise tolfenamik asit ve metaboliti olan hidroksi türevinin tolfenamik asidin oral uygulamasını takip eden 48. ve 24. saatler içerisinde tespit edilebilir olduğu sonucuna varılmıştır. Şekil 1'de tolfenamik asidin hidroksitolfenamik aside biyodönüşümü gösterilmiştir.

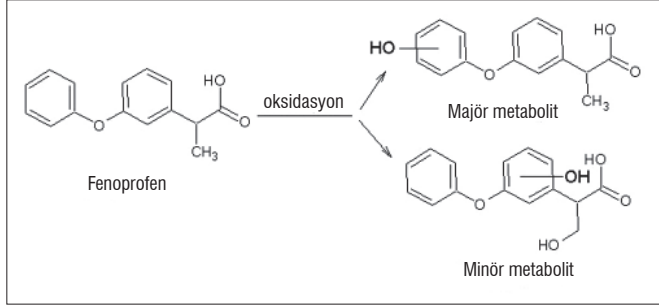


ŞEKİL 1. Tolfenamik asidin hidroksitolfenamik aside biyodönüşümü.

Laakkonen ve arkadaşları (28) doping kontrolü için geliştirdikleri GC-MS yönteminin; hem at hem de insan idrarında; asetaminofen, diklofenak, diflunisal, fenoprofen, flufenamik asit, fluniksın, ibuprofen, indometazin, ketoprofen, mefenamik asit, naproksen, oksifenbutazon, fenilbutazon, salisilik asit ve tolfenamik asidin miktar tayini amacıyla uygulabileceğini bildirmişlerdir.

Delbeke ve Debackere (29), atlara ağız yoluyla 3 g fenoprofen kalisyum uygulanmasını takiben, fenoprofen'in, 24 saat içerisinde idrarda, 9 saat içerisinde de plazmada tayin edilebilir düzeyde bulunduğu bildirilmişlerdir. Aynı araştırma grubu tarafından yapılan bir başka çalışmada (30), HPLC-UV yöntemine ek olarak kullanılan GC-MS yöntemi yardımıyla da fenoprofen'in ağız yoluyla uygulanmasını takip eden bir saat içerisinde analiz edilen tüm idrar örneklerinde değişmeden atılan fenoprofen'in ve konjuge metabolitlerinin tespit edildiği bildirilmiştir. Alkali hidrolize tabi tutulan idrar örneklerinde fenoprofen'in 48 saate kadar 0,2 µg/ml tayin alt sınırına sahip olduğu bildirilmiştir. Enzimatik hidrolize tabi tutulmuş idrarda ve hidroliz işlemi uygulanmayan idrar örneklerinde fenoprofen'in sırasıyla 24-36 ve 12-24 saate ka-

dar tespit edilebilir olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışma kapsamında metillenerek türevlendirilmiş idrar örneklerinin GC-MS yöntemi ile incelenmesi sonucunda fenoprofen'in temel metabolitinin monohidroksifenoprofen olduğu tespit edilirken, yapılarında ikişer hidroksil grubu taşıyan iki izomerik minör metabolite de rastlandığı bildirilmiştir. Fenoprofen'in major ve minör metabolitleri Şekil 2'de gösterilmiştir.



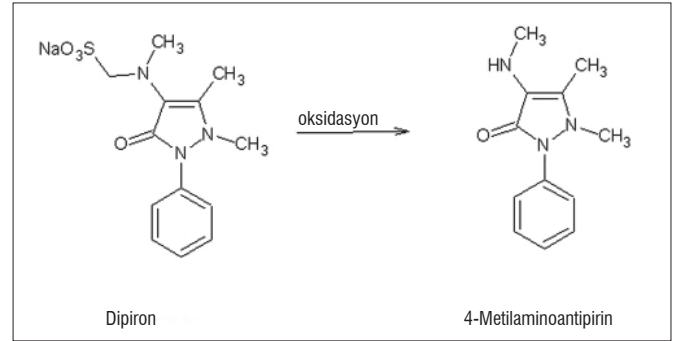
ŞEKİL 2. Fenoprofen'in major ve minör metabolitleri .

González ve arkadaşları tarafından (31) at idrarında ve plazmasında on yedi farklı non-steroidal antienflamatuvar bileşiğin metil iyodür ile türevlendirme yapıldıktan sonra GC-MS-SIM yöntemi kullanılarak miktar tayinleri yapılmıştır. Ayrıca bu çalışma kapsamında non-steroidal antienflamatuvar ajanların metil iyodürle aseton içerisinde ve potasyum karbonat varlığında türevlendirme kinetiği de çalışılmıştır: Propifenazon dışında yukarıda adı geçen tüm non-steroidal antienflamatuvar ajanların kolayca türevlendirildiği, fenilbutazon ve oksifenbutazon için metilasyonun hem karboksilli asit hem de enol işlevli grupları üzerinden gerçekleştiği, bahsi geçen iki işlevli gruptan birini ya da her ikisini, taşıyan diklofenak, fluniksın, naproksen ve fenilbutazon'un tamamen türevlendirilebilmesi için inkübasyon sürecine ihtiyaç duyulmadığı bildirilmiştir. Türevlendirme için 60°C'de 90 dakika inkübasyona tabi tutulan oksifenbutazon ve salisilik asidin fenolik gruplarından hareketle metil eterlerinin oluştuğu, ibuproksam molekülünde hidroksiamit artışı üzerinden bis veya mono metillenme gerçekleştiği izlenmiştir.

Yarış atlarından alınan idrar ve kan örneklerinin GC ve/veya LC yöntemleri ile analiz edilmesinden önce örnek hazırlama ve türevlendirme süreçlerini (32-39) kısaltmak amacıyla Cárdenas ve arkadaşları tarafından (40) gaz kromatografa bağlı özel bir düzenek geliştirilmiştir: Düzenğin ön-derişim basamağında pH 9,5 amonyak tamponu içerisindeki 0,2 mol/l derişimdeki non-steroidal antienflamatuvar standart çözeltisi veya 1 ml idrar veya sitrat tamponu ile pH'sı ayarlandıktan sonra dietilelerle tüketilmiş plazma örnekleri cihaza yüklenerek birinci enjeksiyon birimi içine yerleştirilmiş Amberlite XAD-2 kolondan (hidrofobik, çapraz bağlı polistiren kopolimer reçine) 1 ml pH 9,5 amonyak tamponu ile geçirilmiştir. Non-steroidal antienflamatuvar ajanlar kolonda tutulurken matristeki istenmeyen bileşenlerin atığa geçtiği, aynı anda ikinci enjeksiyon birimi asetonitril içerisindeki %20 asetik anhidrit ve %25 metil iyodür ile doldurulduğu ve her iki enjeksiyon valfi de açıkken türevlendirme ajanının hekzan buharı içine enjekte edildiği ve buharın non-steroidal antienflamatuvar ajanların tutulduğu reçine kolondan geçmesini sağladığı ifade edilmiştir. Elde edilen fraksiyonun, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> içeren kolonda 5 dakika alıkonarak türevlendirme işleminin tamamlanmasının sağlandığı, bu süre sonunda sistemde tekrar akış sağlanarak

kolondan çıkan analiz örneğinin susuz sodyum sülfat içeren cam tüplere 1 dakika boyunca toplandığı ve bu çözeltinin 1 µl'sinin gaz kromatografa enjekte edildiği belirtilmiştir. Oluşturulan deney düzeneği ile çalışıldığında boş plazma örneklerine tüketme basamağı öncesinde eklenen non-steroidal antienflamatuvar ajanların %86-110 arasında değişen değerlerde geri kazanıldığı bildirilmiştir. Aynı amaçla hareket eden Vonaparti ve arkadaşları (41), basit inorganik tuzlardan yüksek molekül ağırlıklı proteinlere kadar birbirinden çok farklı bileşenleri ihtiva eden at idrarını 900 kat seyrelterek ESI kaynağı eklenerek düzenlenmiş bir LC-MS-TOF sistemine uygulamışlar ve salisilik asidin miktar tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Salisilik asidin taşıdığı karboksilik asit işlevli grubunun kolaylıkla protonunu kaybetmesi nedeniyle negatif iyonlaştırma yönteminin benimsendiği çalışmada asetonitril-su karışımından oluşan hareketli faza, en yüksek duyarlılığın sağlanabilmesi ve en düzgün pik şeklinin eldesi için formik asit, buzlu asetik asit, amonyum format ve amonyum asetat ilaveleri yapılmış ve salisilik asit tayini için en uygun modifiye edici ajanın asetik asit olduğu belirlenmiştir.

Klaus ve arkadaşları tarafından (42), tek doz i.v. dipiron uygulamasını takiben at plazmasında temel metabolit olarak izlenen 4-metilaminoantipirin'in eliminasyon yarı-ömrünün yaklaşık 5 saat olarak GC-MS yöntemi ile tespit edildiği bildirilmiştir. Dipiron'un, 4-metilaminoantipirin'e yükseltgenme tepkimesi Şekil 3'te gösterilmiştir.



ŞEKİL 3. Dipiron'un, 4-metilaminoantipirin'e yükseltgenme tepkimesi.

1997 yılında yayınlanan bir çalışma kapsamında (43) tek doz i.m. fluniksın meglumin uygulamasını takiben bileşiğin at plazmasından temizlenme süresi GC-MS-SIM yöntemi ile N,O-bis-(trimetilsilyl)trifluoroasetamid (BSTFA) türevlendirme belirteci kullanılarak tespit edilmiştir Kas içine uygulandığında enjeksiyon bölgesinden hızla emilen fluniksın meglumin'in yaklaşık 30-90 dakika aralığında en yüksek plazma derişimine eriştiği ve ilacın uygulanmasını takip eden 24. saat içerisinde bile plazmada saptanabilir olduğu bildirilirken fluniksın meglumin'in i.v. veya p.o. uygulamasını takip eden 24. saat içerisinde plazmada tespit edilemediği üzerinde durulmuştur. 1970'lerden beri atlarda ağrı tedavisinde ilk seçenек olan fluniksın'ın tek doz, p.o. ve i.v. uygulamasını takiben 48 saat içerisinde GC-elektron yakalama detektörü yöntemi ile idrarda tespit edilebildiği, GC-MS yöntemi ile çalışıldığında ise, fluniksın'ın, tek doz i.v. uygulamasını takip eden 175. saat içerisinde dahi idrarda tespit edilebildiği bildirilmiştir. Tek doz fluniksın'ın, i.m. uygulamasını takiben 32-42 saat içerisinde GC-azot fosfor detektörü ile idrarda tespit edilebildiği bilgisinden hareketle; 1999 yılında yapılan bir çalışmada, fluniksın'ın 1,1 mg/kg günlük doz rejimine sadık kalınarak sağlıklı atlara beş

gün i.m. veya i.v. yoldan uygulanmasının sonucunda alınan idrar örneklerini İTK, HPLC-UV ve GC-MS yöntemleri ile incelemiştir. İdrar örneğinin bazik ortamda hidrolizini takiben yapılan tüketme sonrasında elde edilen çözelti 0,25 mm kalınlığında ve fluoresans indikatör taşıyan silikajel plağa uygulanmış ve etil asetat:metanol:derişik amonyumhidroksit çözeltisi (85:10:5 h/h/h)'nden oluşan çözücü karışımını içeren tanka yerleştirilerek çözücünün 5 cm yürütmesine izin verilmiştir. Plağa önce Dragen-dorff sonra %5 sodyum nitrit belirteçleri püskürtülmüş ve Rf değeri 0,20 olarak hesaplanan kahverengi lekenin fluniksine ait olduğu belirlenmiştir. Kalitatif İTK çalışmasını takiben uygulanan HPLC-UV yöntemi kapsamında sabit faz olarak C18 kolon (150mm x 4,6mm, 5 µm), hareketli faz olarak 0,03M fosforik asit:metanol karışımı (35:65 h/h) kullanıldığı ve detektörün 327 nm dalga boyuna ayarlandığı bildirilmiştir. HPLC-UV yöntemi ile yapılan analizlerde fluniksine'in tayin limiti 50 ng/ml olarak belirlenirken fluniksine'in incelenen bazı idrar örneklerinde son i.m. dozu takip eden 9. günde dahi tespit edilebilir olduğu bildirilmiştir. GC-MS yöntemi ile yapılan analizlerde incelenen 64 örneğin 51'inde son i.m. ve i.v. dozu takip eden 15. günde dahi fluniksine'in tespit edilebilir düzeyde olduğu bildirilmiştir (44-46).

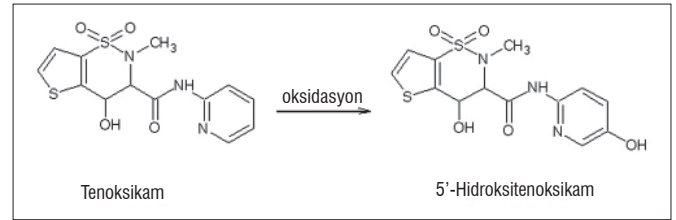
Bazı non-steroidal antiinflamatuar ilaçların GC-MS ve GC-MS<sup>2</sup> yöntemleri ile miktar tayinlerine ait parametreler Tablo 3.2.1'de verilmiştir.

Atlarda osteoartrit tedavisinde tercih edilen bir ön-ilaç olan suksibuzon'un ve etkin metabolitleri olan fenilbutazon ve oksifenbutazon'un miktar tayinlerinin HPLC-UV yöntemi ile plazmada ve sinoviyal sıvıda yapıldığı bildirilmiştir. Suksibuzon'un i.v. enjeksiyonu takip eden 20. dakikadan sonra plazmada tayin edilebilir olmadığı, suksibuzon'un 4,4 mg/kg terapötik dozda i.v. enjeksiyonunu takiben fenilbutazon ve oksifenbutazon'un plazma yarılanma ömürlerinin sı-

rasıyla 6,9 ve 10,65 saat olarak tespit edildiği bildirilmiştir. Suksibuzon'un aynı terapötik dozda i.v. enjeksiyonunu takiben fenilbutazon ve oksifenbutazon'un sinoviyal sıvıdaki yarılanma ömürlerinin sırasıyla 2,4 ve 9 saat olarak tespit edildiği ve sinoviyal sıvıda suksibuzon tespit edilemediği bildirilmiştir (47, 48).

Delbeke ve arkadaşları tarafından (49), atlara p.o. ve i.m. yoldan 1 g tiaprofenik asit uygulamasını takip eden ilk 12 saat içerisinde tiaprofenik asidin sırasıyla %38 ve % 34 oranında değişmeden idrarla atıldığı ve uygulamayı takip eden ilk 24 saat içerisinde idrarda tayin edilebilir düzeyde bulunduğu bildirilmiştir.

1999 yılında yapılan bir çalışmada (50), atlara ağız yoluyla 200 mg tenoksikam uygulanmasını takiben HPLC-UV yöntemi kullanılarak tenoksikam ve metaboliti olan hidroksitenoksikam'ın atılım profili incelenmiştir. Tenoksikam'ın ve konjuge hidroksitenoksikam'ın 29-31 saat içerisinde idrarda, tenoksikam'ın ise uygulamayı takip eden ilk 24 saat içerisinde de serumda tayin edilebilir düzeyde bulunduğu bildirilmiştir. Tenoksikam'ın, 5'-hidroksitenoksikam'a yükseltgenme tepkimesi Şekil 4'te verilmiştir.



ŞEKİL 4. Tenoksikam'ın, 5'-hidroksitenoksikam'a yükseltgenme tepkimesi.

**TABLO 3.2.1.** Bazı non-steroidal antiinflamatuar ilaçların GC-MS, GC-MS<sup>2</sup> yöntemleri ile miktar tayinleri.

Biyolojik Örnek	Kolon	Türevlendirme Ajanı	Deteksiyon Yöntemi	Tayin Alt Limiti	Lit.
Aklofenak					
İdrar	DB-5 (25mx0.25mm, 0.25 µm)	metil iyodür	CI-SRM	5ng/ml	[25]
Asetaminofen					
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	200µg/ml	[28]
Diflunisal					
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	50µg/ml	[28]
Diklofenak					
İdrar	DB-5 (25mx0.25mm, 0.25 µm)	metil iyodür	CI-SRM	5ng/ml	[25]
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	10µg/ml	[28]
Plazma, idrar	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5ng/ml	[31]
Fenilbutazon					
Plazma, idrar	Econocap kılcal kolon, SE-54 (30mx0.25mm)	BSTFA (bis(trimetilsilyl)trifluoroasetamit)	EI-SIM	20-50ng/ml	
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	10µg/ml	[28]
Plazma	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	25ng/ml	[31]
Fenilbutazon					
İdrar	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	10ng/ml	[31]
Fenoprofen					
İdrar	DB-5 (25mx0.25mm, 0.25 µm)	metil iyodür	CI-SRM	5ng/ml	[25]
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5µg/ml	[28]
Flufenamik asit					
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5µg/ml	[28]

**TABLO 3.2.1. (DEVAMI):** Bazı non-steroidal antiinflamatuar ilaçların GC-MS, GC-MS<sup>2</sup> yöntemleri ile miktar tayinleri.

Biyolojik Örnek	Kolon	Türevlendirme Ajanı	Deteksiyon Yöntemi	Tayin Alt Limiti	Lit.
Flurbiprofen					
Plazma	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5ng/ml	[31]
İdrar				10ng/ml	
Fluniksin					
Plazma, idrar	Econocap kılcal kolon, SE-54 (30mx0.25mm)	BSTFA	EI-SIM	20-50ng/ml	[26]
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	10µg/ml	[28]
Plazma, idrar	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	<5ng/ml	[31]
Fluniksin					
İdrar	DB-1 (15mx0.25mm, 0.25 µm)	BSTFA	EI	50ng/ml	[46]
İbuprofen					
İdrar	DB-5 (25mx0.25mm, 0.25 µm)	metil iyodür	CI-SRM	5ng/ml	[25]
İbuprofen					
İdrar	DB-5 (25mx0.25mm, 0.25 µm)	metil iyodür	CI-SRM	5ng/ml	[25]
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5µg/ml	[28]
İbuprofen					
Plazma	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5ng/ml	[31]
İdrar				10ng/ml	
İbuproksam					
Plazma, idrar	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5ng/ml	[31]
İndometazin					
Plazma, idrar	Econocap kılcal kolon, SE-54 (30mx0.25mm)	BSTFA	EI-SIM	20-50ng/ml	[26]
İndometazin					
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	1000µg/ml	[28]
Plazma, idrar	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5ng/ml	[31]

**TABLO 3.2.1. (DEVAMI):** Bazı non-steroidal antiinflamatuar ilaçların GC-MS, GC-MS<sup>2</sup> yöntemleri ile miktar tayinleri.

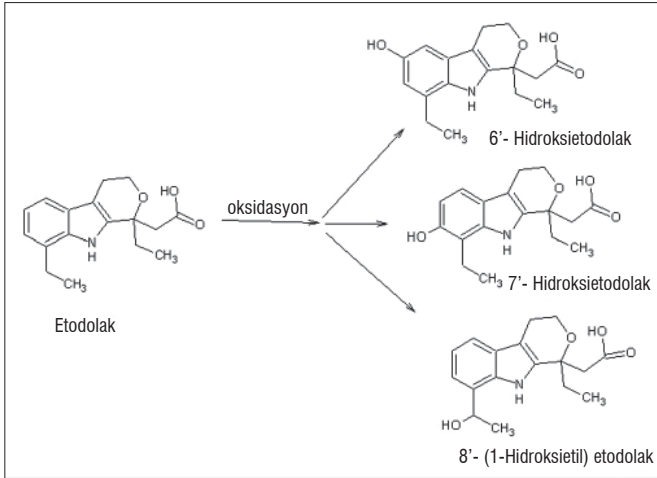
Biyolojik Örnek	Kolon	Türevlendirme Ajanı	Deteksiyon Yöntemi	Tayin Alt Limiti	Lit.
Ketoprofen					
İdrar	DB-5 (25mx0.25mm, 0.25 µm)	metil iyodür	CI-SRM	5ng/ml	[25]
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	50µg/ml	[28]
Plazma, idrar	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	10ng/ml	[31]
Mefenamik asit					
Plazma, idrar	Econocap kılcal kolon, SE-54 (30mx0.25mm)	BSTFA	EI-SIM	20-50ng/ml	[26]
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	10µg/ml	[28]
Plazma	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	25ng/ml	[31]
İdrar				10ng/ml	
Meklofenamik asit					
Plazma, idrar	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5g/ml	[31]
Naproksen					
İdrar	DB-5 (25mx0.25mm, 0.25 µm)	metil iyodür	CI-SRM	5ng/ml	[25]
Plazma, idrar	Econocap kılcal kolon, SE-54 (30mx0.25mm)	BSTFA	EI-SIM	20-50ng/ml	[26]
Naproksen					
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	10µg/ml	[28]
Naproksen					
Plazma, idrar	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5ng/ml	[31]
Niflumik asit					
Plazma, idrar	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5ng/ml	[31]



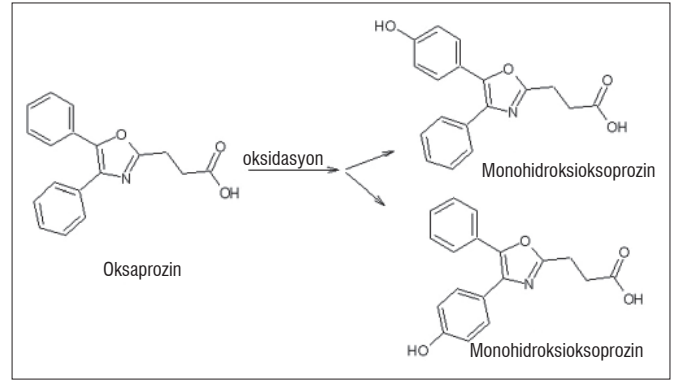
**TABLO 3.2.1. (DEVAMI):** Bazı non-steroidal antiinflamatuar ilaçların GC-MS, GC-MS<sup>2</sup> yöntemleri ile miktar tayinleri.

Biyolojik Örnek	Kolon	Türevlendirme Ajanı	Deteksiyon Yöntemi	Tayin Alt Limiti	Lit.
Oksifenbutazon					
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	100µg/ml	[28]
Plazma	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	10ng/ml	[31]
Propifenazon					
Plazma, idrar	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5ng/ml	[31]
Tolfenamik asit					
İdrar	HP-5 (12.5mx0.2mm, 0.33 µm)	metil iyodür	EI-SIM	10µg/ml	[28]
Plazma, idrar	HP-çapraz bağlı metil silikon türü silika (25mx0.2mm, 0.11 µm)	metil iyodür	EI-SIM	5ng/ml	[31]

Koupai-Abyazani ve arkadaşları tarafından (51) HPLC-UV yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada, atlara ağız yoluyla 2 g etodolak uygulanmasını takiben etodolak'ın 79 saat içerisinde idrarda, 48 saat içerisinde de serumda tespit edilebilir olduğu bildirilmiştir. Etodolak'ın p.o. uygulanmasını takip eden 2-4 saat içerisinde bileşiğin major metabolitleri olan 6'-hidroksietodolak, 7'-hidroksietodolak ve 8'-(1-hidroksietil)etodolak at idrarında serbest ya da konjuge formda LC-MS-APCI yöntemi kullanılarak tespit edildiği bildirilmiştir. Etodolak'ın, major metabolitlerine biyodönüşümü Şekil 5'te gösterilmiştir.

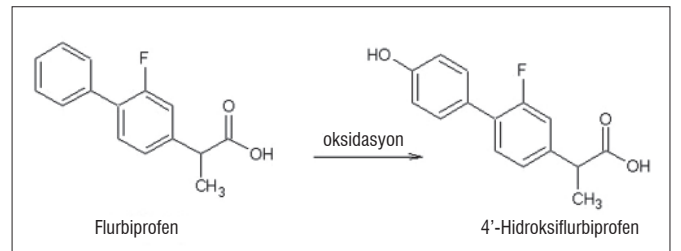
**ŞEKİL 5.** Etodolak'ın major metabolitlerine biyodönüşümü.

Marland ve arkadaşları tarafından (52), HPLC-UV yöntemi kullanılarak at serumunda ve idrarında oksaprozin miktar tayini yapılmıştır. Atlara ağız yoluyla 4,8 g oksaprozin uygulanmasını takiben bileşiğin 119-121 saat içerisinde idrarda, 120 saat içerisinde de serumda tespit edilebilir olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışma kapsamında idrar örneklerinin analizi sonucunda oksaprozin'in ester tipi glukuroniti ve idrar örneklerinin bazık ortamda hidrolizini takiben metil iyodür kullanılarak yapılan türevlendirme sonucunda ve monohidroksi metabolitleri GC-MS, LC-MS<sup>2</sup> ve proton NMR yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir. Oksaprozin'in biyodönüşümü ile açığa çıkan oksidasyon ürünleri Şekil 6'da gösterilmiştir.

**ŞEKİL 6.** Oksaprozin'in biyodönüşümü ile açığa çıkan oksidasyon ürünleri.

Bazı non-steroidal antiinflamatuar ilaçların LC-UV yöntemiyle miktar tayinlerine ait parametreler Tablo 3.2.2'de verilmiştir.

Tsitsimpikou ve arkadaşları tarafından (32), 2001 yılında yayınlanan bir çalışma kapsamında doping kontrolü amacıyla, at idrarında flurbiprofen ve metabolitleri GC-MS yöntemi ile N-metil-N-trimetilsililtrifluoroasetamit (MSTFA) türevlendirme belirteci kullanılarak tespit edilmiş ve miktar tayinleri yapılmıştır. İlacın uygulanmasını takip eden 24. saat içerisinde toplam dozun %26'sı oranında flurbiprofen'in değişmeden atıldığı tespit edilmiştir. Uygulamadan sonraki 1.- 5. saatler aralığında en yüksek derişimde saptanan 4'-hidroksiflurbiprofen'in uygulandıktan 50 saat sonra bile saptanabilmesi nedeniyle atlarda flurbiprofen kullanımı suistimalini tespit edebilmek için izlenmesi gereken metabolitin 4'-hidroksiflurbiprofen olabileceği üzerinde durulmuştur. Flurbiprofen'in, 4'-hidroksiflurbiprofene biyodönüşümü Şekil 7'de gösterilmiştir.

**ŞEKİL 7.** Flurbiprofen'in, 4'-hidroksiflurbiprofene biyodönüşümü.

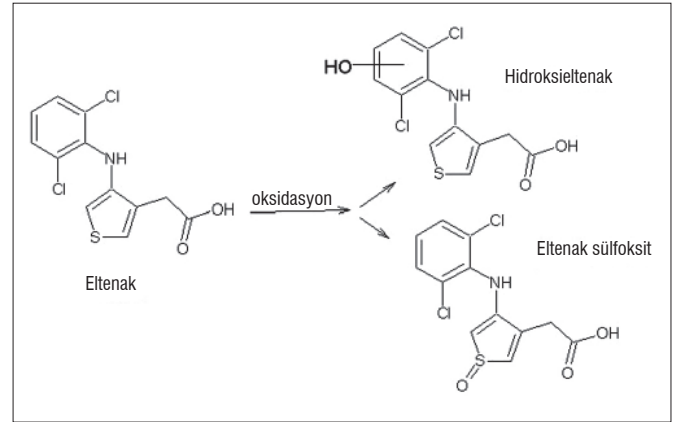
**TABLO 3.2.2.** Bazı non-steroidal antienflamatuvar ilaçların LC-UV yöntemi ile miktar tayinleri.

Biyolojik Örnek	Kolon	Mobil Faz	Tayin Alt Limiti	Lit.
Fenil butazon				
Plazma, idrar	Supelcosil LC-8 (7.5cm x 4.6mm, 3µm)	0.05 M fosforik asit: ACN(55:45 h/h)	50-150 ng/ml	[26]
Firokoksib				
Plazma	Inertsil™ ODS-3 (15cm x 4.6mm, 5µm)	ACN : su : trifluoroasetik asit (45:55:0.025 h/h/h)	10 ng/ml	[34]
Flunüksin				
Plazma, idrar	Supelcosil LC-8 (7.5cm x 4.6mm, 3µm)	0.05 M fosforik asit: ACN(55:45 h/h)	50-150 ng/ml	[26]
İndometazin				
Plazma, idrar	Supelcosil LC-8 (7.5cm x 4.6mm, 3µm)	0.05 M fosforik asit: ACN(55:45 h/h)	50-150 ng/ml	[26]
Mefenamik asit				
Plazma, idrar	Supelcosil LC-8 (7.5cm x 4.6mm, 3µm)	0.05 M fosforik asit: ACN(55:45 h/h)	50-150 ng/ml	[26]
Naproksen				
Plazma, idrar	Supelcosil LC-8 (7.5cm x 4.6mm, 3 µm)	0.05 M fosforik asit: ACN(55:45 h/h)	50-150 ng/ml	[26]
Oksaprozin				
Serum	Phenomenex Luna oktil (15cm x 4.6 mm, 5 µm)	%1 Asetik asit: ACN(50:50 h/h)	0.11 µg/ml	[52]
İdrar			0.11 µg/ml	
Tenoksikam				
Serum	Phenomenex Luna oktil (15cm x 4.6 mm, 5 µm)	%1 Asetik asit: ACN(70:30 h/h)	5.7 µg/ml, 7.3 µg/ml	[50]
İdrar			0.3 µg/ml, 0.4 µg/ml	

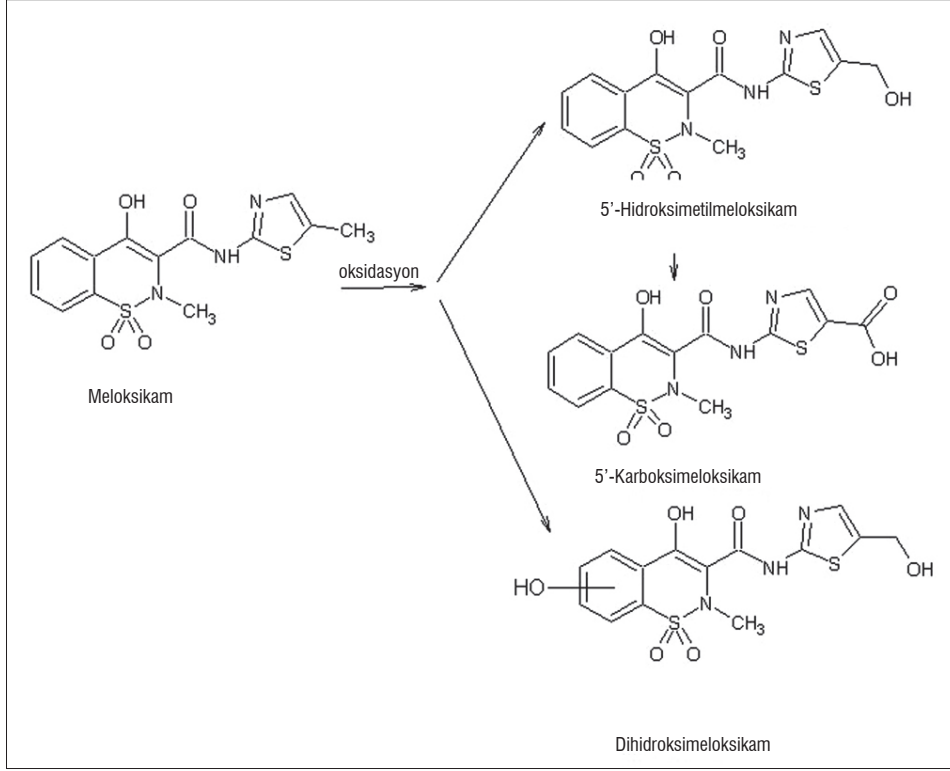
2001 yılında yayınlanan bir çalışmada ise atlarda osteoartrit ve sinovit tedavisinde etkin bir ilaç olan ketoprofen'in at idrarında miktar tayini GC-MS-SIM (seçilmiş iyon izleme) yöntemi ile yapılmıştır. Ketoprofenin at idrarında tayin alt sınırının yaklaşık 10 ng/ml olarak saptandığı, ketoprofenin tek doz uygulanmasını takip eden 8. saat içerisinde plazmada en yüksek derişime ulaştığı ve ilacın kullanılmasını takip eden 16 gün içerisinde idrarda tayin edilebilir olduğu bildirilmiştir (53). Rase-mik karışım halinde bulunan ketoprofenin plazma ve sinoviyal sıvıda enantiospesifik farmakokinetiğinin çalışılması sonucunda her iki biyolojik sıvıda da ketoprofen S(+) izomerinin baskın olduğu ve ketoprofenin R(-) izomerinin S(+) izomerine dönüştüğü bildirilmiştir (54-55). Baeyens ve arkadaşları (56-57), atlardan alınan biyolojik sıvılarda ketoprofen'in miktar tayini ve enantiyomerlerinin LC-UV yöntemi ile ayrımının gerçekleştirilebilmesi, örnek hazırlama basamaklarını kısaltmak ve biyolojik protein matrisi etkisini ortadan kaldırmak amacıyla alkil-diol bağlı silika ile kaplı ön kolon ile sırasıyla C18 kolon ve şiral-HSA (insan serum albümini) bağlı kolon kullanılmasını önermişlerdir.

Broome ve arkadaşları (58), atlara i.v. yoldan asetilsalisilik asit uygulanmasını takiben, bileşğin plazmada altıncı saatin sonunda tespit edilemeyecek düzeye düştüğü, metaboliti olan salisilik asit'in ise uygulamayı takip eden 36 saat boyunca plazmada izlenebildiği bildirilmiştir. Asetilsalisilik asit'in rektal uygulamasını takiben ise plazmada asetilsalisilik asit'in dördüncü saatin sonunda tespit edilemeyecek derişime düştüğü, salisilik asit'in plazmada tespit edilebilme süresinin ise i.v. uygulama ile aynı olduğu bildirilmiştir. Atların mide-bağırsak kanalından emilimi düşük olan ve i.v. uygulamadan sonra plazma yarılanma ömrü 0,1 saat olarak bildirilen asetilsalisilik asit'in, iki saatte bir 35 mg/kg dozda oral yoldan uygulanması gerektiği için atlarda enflamatuvar hastalıkların tedavisinde değil de laminit, endotoksemi, intravasküler koagülasyon ve tromboembolik kolik gibi patogeneğinde arteriyel tromboz olan hastalıkların tedavisinde kullanılmasını önerilmiştir.

Dumasia ve arkadaşları tarafından (60), yapılan bir çalışmada at idrarında eltenak, hidroksieltenak ve eltenak sülfoksit yapı-lı metabolitleri ile metil ya da trimetilsilil eter türevlerine dönüştürüldükten sonra GC-MS yöntemi tespit edilmiştir. Eltenak'ın uygulanmasını takip eden 24 saat içerisinde idrarla tamamen atıldığı bildirilmiştir. Eltenak'ın, hidroksieltenak ve eltenak sülfoksite biyodönüşümü Şekil 8'de gösterilmiştir.

**ŞEKİL 8.** Eltenak'ın, hidroksieltenak ve eltenak sülfoksite biyodönüşümü.

Toutain ve arkadaşları tarafından (61), 2004 yılında yapılan çalışmanın ilk basamağında atlara meloksikam i.v. ya da oral yoldan tek doz halinde uygulanırken çalışmanın ikinci basamağında 0,6 mg/kg günlük dozda 14 gün boyunca uygulanan meloksikam'ın idrar ve plazmadaki düzeyleri HPLC-UV ve LC-MS-ESI yöntemleri kullanılarak saptanmıştır. Plazma yarılanma ömrü 8,54 saat olarak tespit edilen meloksikam'ın birbirini takip eden dozlarda kullanıldığında plazmada birikmediği ancak son dozu takip eden 3. günde plazma ve idrar tayin alt limitlerinden (sırasıyla 10 ng/ml, 20 ng/ml) daha düşük bir derişime indiği bildirilmiştir. 2009 yılında yapılan bir çalışmada (62) ise dihidroksimeloksikam at idrarında ilk kez tespit edilmiş ve meloksikam'ın bilinen metabolitlerinden olan



ŞEKİL 9. Meloksikam'ın biyodönüşümü.

5'-hidroksimetilmeloksikam'ın, meloksikam'ın uygulanmasını takip eden 14. günde alınan bazı idrar örneklerinde dahi tespit edilebilir düzeyde olduğu bildirilmiştir. Baeyens ve arkadaşları (63) ise at plazmasında meloksikam miktar tayini için geliştirdikleri LC-UV yönteminde örnek hazırlama basamağını ortadan kaldırıp plazmanın doğrudan sisteme enjeksiyonunu sağlayabilmek amacıyla alkil-diol bağlı silika ile kaplı ön kolon kullanılmasını önermişlerdir. Spesifik ön kolon kullanımı ile biyolojik protein matris etkisini analitin kantitatif olarak geri kazanımını da sağlayarak ortadan kaldıran araştırmacılar bu kritik basamağı takiben bileşenlerin ayrılması için C8 kolon kullandıklarını bildirmişlerdir. Meloksikam'ın biyodönüşümü sonucunda açığa çıkan ürünler Şekil 9'da gösterilmiştir.

Atlara i.v. yoldan 0,7 mg/kg dozda uygulanan rasemik karprofen'in R(-) ve S(+) enantiyomerlerinin plazma derişimleri HPLC-UV yöntemiyle tespit edilmiştir. Sabit faz olarak (R)-1-naftilfenilglisin'in 3,5-dinitrobenzoik asit türevi ile kaplı şiral kolonun (250 mm x 2 mm) kullanıldığı çalışmada hareketli fazın 0,72 M amonyum asetat tamponu ve metanol karışımından oluştuğu ve detektörün 242 nm dalga boyuna ayarlandığı bildirilmiştir. Çalışma sonucunda plazmada R(-) enantiyomerin baskın olduğu ve yüksek derişimde bulunduğu için daha uzun süre tespit edilebilir olduğu belirtilmiş; bunun nedeni olarak S(+) enantiyomerin klirensinin saatte 21-57ml/kg iken R(-) enantiyomerin klirensinin saatte 8-9 ml/kg olması gösterilmiştir (64-66).

Oftalmik bir analjezik-antienflamatuvar bileşik olan rasemik pranoprofen'in at plazmasında ve idrarında enantiyomerik bileşiminin LC-MS<sup>2</sup>-SRM yöntemi ile tayininin yapıldığı bir ça-

lışmada plazmada R(-) enantiyomerin S(+) enantiyomere kıyasla düşük derişimde bulunurken idrarda R(-) enantiyomerin S(+) enantiyomerden 2,5 kat daha fazla derişimde bulunduğu gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, rasemik karışım halinde bulunan non-steroidal antienflamatuvar ajanların hangi enantiyomerinin plazma ya da idrada baskın derişimde bulunduğu tespit edilmesi konusuna doping kontrollerinde karşılaşılabilecek yanıltıcı pozitiflik parametresini ortadan kaldırmak amacıyla özellikle önem verildiği bildirilmiştir (67).

Kvaternick ve arkadaşları tarafından (34), LC-UV yöntemi kullanılarak at plazmasında firokoksib miktar tayini yapılmıştır. Firokoksib'in at plazmasında tayin alt sınırı 25 ng/ml olarak saptanmış; ayrıca yapılan örnek stabilitesi çalışmaları kapsamında firokoksibin at plazmasında hazırlanan örnekleri -20°C'de 2 yıldan daha uzun süre bekletilmiş ve bunun sonucunda hiçbir bozunma oluşmadığı belirtilmiştir. Letendre ve arkadaşları tarafından da (68), LC-MS<sup>2</sup>-ESI yöntemi kullanılarak at plazması ve idrarında firokoksib miktar tayini yapılmasını takiben gerçekleştirilen bir başka çalışmada (69) 0,1 mg/kg günlük dozda 12 gün süreyle p.o. uygulanan ve 0,2 mg/kg günlük dozda 9 gün süreyle i.v. uygulanan firokoksib'in atlardaki farmakokinetik profili incelenmiştir. Tek doz p.o. uygulanan firokoksibin plazma yarılanma ömrü yaklaşık 29,6 saat, tek doz i.v. uygulanan firokoksibin plazma yarılanma ömrü yaklaşık 33,8 saat olarak tespit edilirken tekrarlayan dozlarda p.o. ve i.v. uygulanan firokoksibin plazma yarılanma ömrü son dozu takiben yaklaşık 36,5 ve 44,2 saat olarak belirtilmiştir.

**TABLO 3.2.3.** Bazı non-steroidal antienflamatuvar ilaçların LC-MS2 yöntemi ile miktar tayinleri.

Biyolojik Örnek	Kolon	Mobil Faz	Deteksiyon Yöntemi	Tayin Alt Limiti	Lit.
<b>Derakoksib, Meloksikam</b>					
Plazma	Supelcosi™ ABZ-PLUS (3.3cm x 2.1mm, 3 µm)	%1 Asetik asit: ACN, gradient	ESI-SRM	10 pg/ml	[70]
<b>Etorikoksib</b>					
Plazma	Supelcosi™ ABZ-PLUS (3.3cm x 2.1mm, 3 µm)	%1 Asetik asit: ACN, gradient	ESI-SRM	5 pg/ml	[70]
<b>Firokoksib</b>					
Plazma	Phenomenex Luna Fenil-Hekzil kolon (10cm x 2mm, 3 µm)	ACN: 2mM amonyum format tamponu (45:55 h/h)	ESI	0.25 ng/ml	[68]
İdrar				1 ng/ml	
<b>İzoksikam</b>					
Plazma	Supelcosi™ ABZ-PLUS (3.3cm x 2.1mm, 3 µm)	%1 Asetik asit: ACN, gradient	ESI-SRM	40 pg/ml	[70]
<b>Lornoksikam, Piroksikam</b>					
Plazma	Supelcosi™ ABZ-PLUS (3.3cm x 2.1mm, 3 µm)	%1 Asetik asit: ACN, gradient	ESI-SRM	200 pg/ml	[70]
<b>Selekoksib</b>					
Plazma	Supelcosi™ ABZ-PLUS (3.3cm x 2.1mm, 3 µm)	%1 Asetik asit: ACN, gradient	ESI-SRM	20 pg/ml	[70]
<b>Valdekoksib</b>					
Plazma	Supelcosi™ ABZ-PLUS (3.3cm x 2.1mm, 3 µm)	%1 Asetik asit: ACN, gradient	ESI-SRM	80 pg/ml	[70]

Selekoksib, derakoksib, etorikoksib, valdekoksib, izoksikam, lornoksikam, meloksikam ve piroksikamın at plazmasında miktar tayinlerinin yapıldığı kapsamlı bir çalışmada LC-MS<sup>2</sup> yönteminin ve alkil-amit bağlı ters faz silika kolonun kullanıldığı bildirilmiştir (70). 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada ise, atlara ağız yoluyla derakoksib uygulanmasını takiben HPLC-UV yöntemi kullanılarak bileşiğin yarılanma ömrünün 12,49 saat, en yüksek plazma derişiminin 0,54 µg/ml olarak tespit edildiği bildirilmiştir (71).

Bazı non-steroidal antienflamatuvar ilaçların LC-MS<sup>2</sup> yöntemi ile miktar tayinlerine ait parametreler Tablo 3.2.3'te verilmiştir.

Barker (72), Louisiana Hipodromu içindeki ahırların zemininden, yemlerin depolandığı bölmelerin kirşilerinden ve duvarlarından ve hipodroma ait su ünitesinden aldığı örnekleri GC-MS yöntemiyle incelediği çalışmada analiz ettiği tüm örneklerde kafein ve nikotin'in temel metaboliti olan kotinin'i tespit ettiğini bildirmiştir. Duvarlardan alınan örneklerin tüketilmesi ile kazanılan 20 çözeltinin incelenmesi sonucunda 76 ng/ml kafein, 47 ng/ml fluniksın ve daha düşük miktarlarda fenilbutazon ve naproksen tespit edildiği bildirilmiştir. Ahır ve ambarlardan alınan toz örneklerinde ise 3,2-46,2 ng/g aralığında fenilbutazon ve fluniksın'e rastlandığı bildirilmiştir. Hayvansal artıklardan temizlenmiş ve kuru durumdaki ahırların zeminlerinden alınan örneklerde ise yüksek derişimde fluniksın'e (251,1 ng/ml) ve naproksen'e (97,5 ng/g) rastlandığı bildirilmiştir.

İncelenen literatürlerde, ilaçların biyoizlenmesi ya da doping kontrolü amacıyla atlar üzerinde yapılan çalışmalarda biyolojik örnek olarak kan ve idrarın tercih edildiği görülmüştür. Ancak, 1980'li yılların ortalarından bu yana insan saçından veya hayvanların tüylerinden hareketle yapılan toksikolojik analizler ile adli tıp ya da doping kontrollerine yönelik analiz-

ler hızla artmaktadır ve ilaç istismarının tespitinde saç ve tüy analizlerinin alternatif ve tamamlayıcı bir yaklaşım oluşturduğu düşünülmektedir (73, 74).

19. Yüzyılın ortalarında arsenik zehirlenmesini araştırmak üzere saçtan hareketle analizler yapan Casper'dan sonra 1954 yılında spektrofotometrik yöntemlerle guinea pig cinsi kemirgenlerin tüylerinde organik bir bileşiğin varlığını ilk kez tespit eden Goldblum ve arkadaşlarının çalışmasına kadar saç ve/veya tüylerden hareketle yapılan analiz çalışmaları pek ilgi görmemiştir. Fakat, saç ve tüy örneklerinin toplandıktan sonra oda koşullarında kaldığı sürece hemen analiz edilmesine gerek olmaması, analiz veriminin yüksek olması, idrardan hareketle yapılan analizlere göre deteksiyon aralığının geniş olması ve saçın/tüyün uzunluğuna bağlı olarak bir haftadan birkaç aya kadar uzayan deteksiyon zamanı sağlanması kıldan hareketle yapılan analizlerin avantajlı yönlerini oluşturmaktadır (73).

Biyolojik örnek olarak atların tüylerinin kullanıldığı çok az çalışma olmasına rağmen atların kuyruk ve yelelerinden alınan tüy örnekleri ile yapılan çalışmaların; at tüylerine kozmetik maddeler uygulanmaması, atların vücut tüylerinin mevsimsel olarak dökülmesine rağmen kuyruk ve yele tüylerinin dökülmemesi nedeniyle hayvana tedavi veya doping amacıyla uygulanan tüm farmasötik ajanların çok uzun zamanı kapsayacak bir listesini sunması ve insan saçı ile kıyaslandığında at tüylerinin yoğunluğu daha yüksek olduğundan daha fazla örnek elde edilebildiği için daha yüksek analitik duyarlılıkla çalışılabilmesi gibi bazı üstünlüklere sahip olduğu bildirilmiştir (74).

At tüylerinin biyolojik örnek olarak kullanıldığı çalışmalarda özellikle deksametazon gibi antienflamatuvar kortikosteroidler ve non-steroidal antienflamatuvar ajanlar arasında kullanım suistimali sıklıkla saptanan ve 1950'lerden beri atlarda

ağrı tedavisinde yaygın olarak kullanılan non-steroidal bir anti-inflamatuar bileşik olan fenilbutazon tespit edildiği bildirilmiştir (44, 75). WADA tarafından hazırlanan ve güncellenen, yarışmalar sırasında ve/veya serbest zamanlarda kullanımı yasaklı ilaç gruplarından olan anabolik ve androjenik steroidlerin (76-80) ve klenbuterol (81, 82) ile diazepam'ın (83) tespitini konu alan çalışmalarda at tüylerinin biyolojik örnek olarak kullanımının non-steroidal anti-inflamatuar ajanları konu alan çalışmalara göre daha fazla tercih edildiği görülmüştür.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu derleme kapsamında atlarda kullanımı suistimal edilen bazı non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların atlara ait biyolojik örneklerde kromatografik yöntemlerle gerçekleştirilen nicel ve nitel analizleri analizleri ana hatları ile derlenmiştir.

WADA tarafından hazırlanan ve güncellenen, yarışmalar sırasında kullanımı yasaklı olan ilaç grupları listesinde non-steroidal anti-inflamatuarların yer almaması kullanımlarının suistimal edilmesine neden olmaktadır. Yasaklı maddeler listesinde yer almayan non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların kullanımına sınırlama getirmek amacıyla Amerikan Ulusal Binicilik Gönüllülerini Koruma Birliği (National Horsemen's Benevolent & Protective Association) tarafından 2003 yılında yayınlanan bildiriye yarışmalar sırasında yapılacak doping kontrollerinde kıstas alınmak üzere non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların idrar ve plazmada tayin alt sınırları belirlenmiştir.

Atlarda gerek tedavi amacıyla gerekse doping olarak kullanılan ilaç etken maddelerinin biyoizlenmesinin yapıldığı laboratuvarlarda UV ve floresans detektörlü HPLC sistemlerinin kullanımı, HPLC ile bağlantılı olarak UV-PDA detektörden ve HPLC-kütle detektöründen oluşan kromatografi sistemlerinin yaygınlaşması ile eski önemini yitirmiş, özellikle de yüksek basınçlı sıvı kromatograf-kütle detektöründen oluşan kromatografi sistemlerinin ve yumuşak iyonlaştırma yöntemlerinin kullanıldığı yöntemlerin ön plana çıktığı bildirilmiştir. Yumuşak iyonlaştırma yöntemlerinin, diğer kromatografik yöntemlerle zorlukla tespit edilen veya hiç tespit edilemeyen yasaklı ilaçların tanımlanmasını mümkün hale getirdiği ve zaman alan, iş gücü gerektiren türevlendirme işlemlerini gereksiz kıldığı, analizden önce hidrolizi gerçekleştirilen konjuge metabolitleri de hidrolize uğratmaksızın tayin edebilme kolaylığı sağladığı bildirilmiştir. Çok yüksek başarımlı sıvı kromatografların (UPLC) tandem kütle spektrometrisiyle birlikte kullanımının; analiz süresini çok kısaltması, analiz maliyetini düşürmesi ve daha duyarlı analiz sonuçları vermesi nedeniyle çok çabuk benimsendiği saptanmıştır.

UV detektör ile kombine edilmiş kromatografik sistemlerle yapılan analizlerde tayin alt limitleri µg/ml düzeyinde belirlenirken kütle detektörün LC ya da GC ile birlikte kullanılması durumunda daha duyarlı analizler yapılabildiği ve tayin alt limitleri ng/ml ve pg/ml düzeyinde ölçüldüğü bildirilmiştir.

## Determination of non-steroidal antiinflammatory drugs in equine biological samples by chromatographic methods.

**ABSTRACT:** In the knowledge that non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) which are not included in the WADA's (World Anti-Doping Agency) list enacting doping substances and methods, have been abused in horse racing; a review on qualitative and quantitative determination of some of these non-steroidal antiinflammatory drugs (acetylsalicylic acid, benzydamine, bufexamac, diclofenac sodium, diflunisal, eltenac, etodolac, etoricoxib, felbinac, phenylbutazone, flufenamic acid, flunixin, flurbiprofen, ibuprofen, indometacin, indoprofen, carprofen, ketoprofen, ketorolac, meclofenamic acid, mefenamic acid, meloxicam, mofebutazon, naproxen, niflumic acid, nimesulide, oxyphenbutazone, piroxicam, ramifenazone, selecoxib, sulindac, tenoxicam, tiaprofenic acid, tolfenamic acid, tolmetin, valdecoxib and vedaprofen) from biological samples of horses was gathered within the context of this work.

**KEYWORDS:** Chromatography, drug monitoring, non-steroidal antiinflammatory drugs, horse.

## KAYNAKLAR

1. Driessen B. Pain: Systemic and local/regional drug therapy. Clin Tech Equine Pract 2007; 6:135-44.
2. Dirikolu L, Woods WE, Boyles J, Lehner AF, Harkins JD, Fischer M, Schaeffer DJ, Tobin T. Nonsteroidal anti-inflammatory agents and musculoskeletal injuries in thoroughbred racehorses in Kentucky. J Vet Pharmacol Therap 2008; 32:271-79.
3. Bowers LD. The international antidoping system and why it works. Clin Chem 2009; 55:1456-61.
4. National horsemen's benevolent and protective association proposed national policy on drug testing and therapeutic medication. J Equine Vet Sci 2003; 23:18-40.
5. Nicolas-Frey H. International federation of horseracing authorities annual report on prohibited substance. PDF Dokümanı [Erişim Tarihi: 22 Şubat 2012; [http://www.ifhaonline.org/resources/2007\\_Annual\\_doping\\_control\\_annual\\_report.pdf](http://www.ifhaonline.org/resources/2007_Annual_doping_control_annual_report.pdf)]
6. Erdine S. Ağrı. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, 2007.
7. Yücel A, Çimen A. Nöropatik Ağrı: Mekanizmalar, tanı ve tedavi. Ağrı 2005; 17:5-13.
8. Flecknell P. Analgesia from a veterinary perspective. Br J Anaesth 2008; 101:121-24.
9. Muir WW. Pain: Mechanisms and management in horses. Vet Clin Equine 2010; 26:467-80.
10. Kızıl Ö. Atlarda sancı ve sancılı atlarda muayene parametreleri. FÜ Sağ Bil Derg 2007; 21:285-90.

11. Kamerling S, Wood T, DeQuick D, Weckman TJ, Tai C, Blake JW, Tobin T. Narcotic analgesics, their detection and pain measurement in the horse: A review. *Equine Vet J* 1989; 21:4-12.
12. Anti-Doping Eğitim ve Doping Kontrolünün Kanuni Yönleri. Editörler: Hıncal AA, Dalkara S, Hacettepe Üniversitesi ISBN 975-491-022-7, Ankara 1991, pp: 83-8.
13. Maurer HH. Role of gas chromatography-mass spectrometry with negative ion chemical ionization in clinical and forensic toxicology, doping control and biomonitoring. *Ther Drug Monit* 2002; 24:247-54.
14. Maurer HH. Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control. *J Chromatogr B* 1999; 733:3-25.
15. Van Eenoo P, Delbeke FT. Criteria in chromatography and mass spectrometry-a comparison between regulations in the field of residue and doping analysis. *Chromatographia* 2004; 59-Suppl.: 39-44.
16. El Haj BM, Al Ainri AM, Hassan MH, Bin Khadem RK, Marzouq MS. The GC/MS analysis of some commonly used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pharmaceutical dosage forms and in urine. *For Sci Int* 1999; 105:141-53.
17. Segura J, Ventura R, Jurado C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *J Chromatogr B* 1998; 713:61-90.
18. Fragkaki AG, Leontiou IP, Kioukia-Fougia N, Tsvivou M, Spyridaki MHE, Georgakopoulos CG. Organization of doping control laboratory in the Athens 2004 olympic games. A case study. *Technovation* 2006; 26:1162-69.
19. Stanley SD, Kollias-Baker C. Review of equine drug testing. *AAEP Proceedings* 1997; 43:211-14.
20. Thevis M, Schanzer W. Current role of LC-MS(/MS) in doping control. *Anal Bioanal Chem* 2007; 388:1351-58.
21. Moulard Y, Bailly-Chouriberry L, Boyer S, Garcia P, Popot MA, Bonnaire Y. Use of benchtop exactive high resolution and high mass accuracy orbitrap mass spectrometer for screening in horse doping control. *Anal Chim Acta* 2011; 700:126-36.
22. Peters RJB, Stloker AAM, Mol JGJ, Lommen A, Lyris E, Angelis Y, Vonaparti A, Stamou M, Georgakopoulos C, Nielsen MWF. Screening in veterinary drug analysis and sports doping control based on full-scan, accurate-mass spectrometry. *Trends in Anal Chem* 2010; 29:1250-68.
23. You Y, Uboh CE, Soma LR, Guan F, Li X, Liu Y, Chen J, Tsang D. Simultaneous determination of testosterone and testosterone enanthate in equine plasma by UHPLC-MS-MS. *Chromatographia* 2010; 72:1097-06.
24. Vinci F, Fabbrocio S, Fiori M, Serpe L, Gallo P. Determination of fourteen non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal serum and plasma by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20:3412-20.
25. DeJong EG, Kiffers J, Maes RAA. The determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs by GC-MS-MS in equine urine. *J Pharm Biomed Anal* 1989; 7:1617-22.
26. Singh AK, Jang Y, Mishra U, Granley K. Simultaneous analysis of flunixin, naproxen, ethacrynic acid, indomethacin, phenylbutazone, mefenamic acid and thiosalicylic acid in plasma and urine by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1991; 568:351-61.
27. Jaussaud P, Guieu D, Courtot D, Barbier B. Identification of a tolfenamic acid metabolite in the horse by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1992; 573:136-40.
28. Laakkonen UM, Leinonen A, Savonen L. Screening of non-steroidal anti-inflammatory drugs, barbiturates and methyl xanthines in equine urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst* 1994; 119:2695-96.
29. Delbeke FT, Debackere M. A liquid chromatographic method for the determination of fenoprofen in equine plasma and urine. *Biomed Chromatogr* 1994; 8:29-31.
30. Delbeke FT, Landuyt J, Debackere M. Disposition of human drug preparations in the horse. IV. Orally administered fenoprofen. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 13:1041-47.
31. González G, Ventura R, Smith AK, de la Torre R, Segura J. Detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in equine plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1996; 719:251-64.
32. Tsitsimpikou C, Spyridaki MHE, Georgoulakis I, Kouretas D, Konstantinidou M, Georgakopoulos CG. Elimination profiles of flurbiprofen and its metabolites in equine urine doping analysis. *Talanta* 2001; 55:1173-80.
33. Kim JY, Kim SJ, Paeng KJ, Chung BC. Measurement of ketoprofen in horse urine using gas chromatography-mass spectrometry. *J Vet Pharmacol Therap* 2001; 24:315-19.
34. Kvaternick V, Malinski T, Wortmann J, Fischer J. Quantitative HPLC-UV method for the determination of firocoxib from horse and dog plasma. *J Chromatogr B* 2007; 854:313-19.
35. Wynne PM, Batty DC, Vine JH, Simpson NJK. Approaches to the solid-phase extraction of equine urine. *Chromatographia* 2004; 59-Suppl.: 51-60.
36. Spyridaki MHE, Lyris E, Georgoulakis I, Kouretas D, Konstantinidou M, Georgakopoulos CG. Determination of xylazine and its metabolites by GC-MS in equine urine for doping analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35:107-16.
37. Leung GNW, Chung EW, Ho ENM, Kwok WH, Leung DKK, Tang FPW, Wan TSM, Yu NH. High-throughput screening of corticosteroids and basic drugs in horse urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2005; 825:47-56.
38. Machnik M, Due M, Parr M, von Kuk C, Schanzer W. Case study: Doping substances in equestrian food supplements. *Chromatographia* 2004; 59: 131-35.
39. Leung GNW, Leung DKK, Wan TSM, Wong CHF. High-throughput screening sub-ppb levels of basic drugs in equine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2007; 1156:271-79.
40. Cárdenas S, Gallego M, Valcárcel M, Ventura R, Segura J. A partially automated pretreatment module for routine analyses for seventeen non-steroid antiinflammatory drugs in race horses using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 1996; 68:118-23.

41. Vonaparti A, Lyris E, Panderi I, Koupparis M, Georgakopoulos C. Direct injection horse urine analysis for the quantification and identification of treshold substances for doping control.III. Determination of salicylic acid by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2009; 395:1403-10.
42. Klaus AM, Schlingloff Y, Kleinitz U, Böttcher M, Hapke HJ. Pharmacokinetic study of dipyrone metabolite 4-MAA in the horse and possible implications for doping control. *J Vet Pharmacol Therap* 1997; 20:204-08.
43. Dyke TM, Sams RA, Cosgrove SB. Disposition of flunixin after intramuscular administration of flunixin meglumin to horses. *J Vet Pharmacol Therap* 1997; 20:330-32.
44. Sinclair MD, Mealey KL, Matthews NS, Peck KE, Taylor TS, Bennett BS. Comparative pharmacokinetics of meloxicam in clinically normal horses and donkeys. *Am J Vet Res* 2006; 67:1082-85.
45. Jaussaud P, Courtot D, Guyot JL, Paris J. Identification of a flunixin metabolite in the horse by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1987; 423:123-130.
46. Sams RA, Gerken DF, Ashcraft SM. Detection and identification of flunixin after multiple intravenous and intramuscular doses to horses. *J Anal Toxicol* 1999; 23:372-79.
47. Sabaté D, Homedes J, Salichs M, Sust M, Monreal L. Multicentre, controlled, randomised and blinded field study comparing efficacy of suxibuzone and phenylbutazone in lame horses. *Equine Vet J* 2009; 41:700-5.
48. Jaraiz MV, Dodriguez C, San Andres MD, Gonzalez F, San Andres MI. Disposition and tolerance of suxibuzone in horses. *Equine Vet J* 1999; 31:411-16.
49. Delbeke FT, Baert K, De Backer P. Disposition of human drug preparations in the horse. VI. Tiaprofenic acid. *J Chromatogr B* 1997; 704:207-14.
50. Marland A, Sarkar P, Leavitt R. The elimination profiles of tenoxicam and hydroxytenoxicam in equine urine and serum after a 200-mg oral dose. *J Anal Toxicol* 1999; 23:237-41.
51. Koupai-Abyazani MR, Esaw B, Laviolette B. Etodolac in equine urine and serum: Determination by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, confirmation and metabolite identification by atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1999; 23:200-9.
52. Marland A, Sarkar P, Leavitt R, Lee-Ruff E, Ramnauth J. The elimination profiles of oxaprozin in equine urine and serum after a 4.8-g oral dose. *J Anal Toxicol* 1999; 23:242-46.
53. Goodrich LR, Nixon AJ. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J* 2006; 171: 51-69.
54. Verde CR, Simpson MI, Frigoli A, Landoni MF. Enantiospecific pharmacokinetics of ketoprofen in plasma and synovial fluid of horses with acute synovitis. *J Vet Pharmacol Ther* 2001; 24:179-85.
55. Aboul-Enein HY, Van Overbeke A, Vander Weken G, Baeyens W, Oda H, Deprez P, De Kruif A. HPLC on chiralcel OJ-R for enantiomer separation and analysis of ketoprofen, from horse plasma, as the 9-aminophenanthrene derivative. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50:291-96.
56. Baeyens WR, Van der Weken G, Haustraete J, Aboul-Enein HY, Corveleyn S, Remon JP, Garcia-Campaña AM, Deprez P. Application of the restricted-access precolumn packing material alkyl-diol silica in a column-switching system for the determination of ketoprofen enantiomers in horse plasma. *J Chromatogr A* 2000; 871:153-61.
57. Baeyens WR, Van der Weken G, Haustraete J, Aboul-Enein HY, Corveleyn S, Remon JP, Garcia-Campaña AM, Deprez P. Direct HPLC analysis of ketoprofen in horse plasma applying an ADS-restricted access-phase. *Biomed Chromatogr* 1999; 13:450-54.
58. Broome TA, Brown MP, Gronwall RR, Casey MF, Meritt KA. Pharmacokinetics and plasma concentrations of acetylsalicylic acid after intravenous, rectal and intragastric administration to horses. *Can J Vet Res* 2003; 67: 297-02.
59. Van Eenoo P, Delbeke FT, Roels K, Baert K. Detection and disposition of tolmetin in the horse. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 31:723-30.
60. Dumasia MC, Morelli I, Teale P. Detection of eltenac in the horse: Identification of phase I metabolites in urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry and the determination of excretion profile by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 2004; 59:115-21.
61. Toutain PL, Reymond N, Laroute V, Garcia P, Popot MA, Bonnaire Y, Hirsch A, Narbe R. Pharmacokinetics of meloxicam in plasma and urine of horses. *Am J Vet Res* 2004; 65:1542-47.
62. Tevell Aberg A, Olsson C, Bondesson U, Hedeland M. A mass spectrometric study on meloxicam metabolism in horses and the fungus *Cunninghamella elegans* and the relevance of this microbial system as a model of drug metabolism in the horse. *J Mass Spectrom* 2009; 44:1026-37.
63. Baeyens WR, Van der Weken G, D'haeninck E, Garcia-Campaña AM, Vankeirsbilck T, Vercauteren A, Deprez P. Application of an alkyl-diol silica precolumn in a column-switching system for the determination of meloxicam in plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 32:839-46.
64. Armstrong S, Tricklebank P, Lake A, Freaan S, Lees P. Pharmacokinetics of carprofen enantiomers in equine plasma and synovial fluid—a comparison with ketoprofen. *J Vet Pharmacol Ther* 1999; 22:196-01.
65. Lees P, Landoni MF. Pharmacodynamics and enantioselective pharmacokinetics of racemic carprofen in the horse. *J Vet Pharmacol Ther* 2002; 25:433-48.
66. Mealey KL, Matthews NS, Peck KE, Burchfield ML, Bennett BS, Taylor TS. Pharmacokinetics of R(-) and S(+) carprofen after administration of racemic carprofen in donkeys and horses. *Am J Vet Res* 2004; 65:1479-82.
67. Yu J, Han KS, Lee G, Paik MJ, Kim KR. Enantiomeric composition analysis of pranoprofen in equine plasma and urine by chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry in selected reaction monitoring mode. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; 878:3249-54.
68. Letendre L, Kvaternick V, Teclé B, Fischer J. Automated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of firoxocib in urine and plasma from horse and dog. *J Chromatogr B* 2007; 853:333-45.
69. Letendre LT, Tessman RK, McClure SR, Kvaternick VJ, Fischer JB, Hanson PD. Pharmacokinetics of firocoxib after administration of multiple consecutive daily doses to horse. *Am J Vet Res* 2008; 69:1399-05.

- 70.** Yu NH, Ho ENM, Tang FPW, Wan TSM, Wong ASY. Comprehensive screening of acidic and neutral drugs in equine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2008; 1189:426-34.
- 71.** Davis JL, Marshall JF, Papich MG, Blikslager AT, Campbell NB. The pharmacokinetics and in vitro cyclooxygenase selectivity of deracoxib in horses. *J Vet Pharmacol Ther* 2011; 34:12-16.
- 72.** Barker SA. Drug contamination of the equine racetrack environment: a preliminary examination. *J Vet Pharmacol Therap* 2008; 31: 466-71.
- 73.** Mushoff F, Madea B. Analytical pitfalls in hair testing. *Anal Bioanal Chem* 2007; 388:1475-94.
- 74.** Dunnett M, Lees P. Hair analysis as a novel investigative tool for the detection of historical drug use/misuse in the horse: a pilot study. *Equine Vet J* 2004; 36:113-17.
- 75.** Dunnett M, Lees P. Trace element, toxin and drug elimination in hair with particular reference to the horse. *Res Vet Sci* 2003; 75:89-101.
- 76.** Anielski P, Thieme D, Schlupp A, Grosse J, Ellendorff F, Mueller RK. Detection of testosterone, nandrolone and precursors in horse hair. *Anal Bioanal Chem* 2005; 383:903-08.
- 77.** Anielski P. Hair analysis of anabolic steroids in connection with doping control-results from horse samples. *J Mass Spectrom* 2008; 43: 1001-08.
- 78.** Soma LR, Uboh CE, Guan F, McDonnell S, Pack J. Pharmacokinetics of boldenone and stanozolol and the results of quantification of anabolic and androgenic steroids in race horses and nonrace horses. *J Vet Pharmacol Ther* 2007; 30:101-08.
- 79.** Soma LR, Uboh CE, You Y, Guan F, McDonnell S. Plasma concentrations of testosterone and nandrolone in racing and nonracing intact male horses. *J Vet Pharmacol Ther* 2011; doi: 10.1111/j.1365-2885.2011.01295.x.
- 80.** Boyer S, Garcia P, Popot MA, Steiner V, Lesieur M. Detection of testosterone propionate administration in horse hair samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 852:684-88.
- 81.** Schlupp A, Anielski P, Thieme D, Müller RK, Meyer H, Ellendorff F. The beta-agonist clenbuterol in mane and tail hair of horses. *Equine Vet J*. 2004; 36:118-22.
- 82.** Popot MA, Boyer S, Maciejewski P, Garcia P, Bonnaire Y, Beyet L, Lesage D, Tabet JC. Determination of clenbuterol in horse hair by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia* 2001; 53-Suppl.: 375-79.
- 83.** Jouvel C, Maciejewski P, Garcia P, Bonnaire Y, Horning S, Popot MA. Detection of diazepam in horse hair samples by mass spectrometric methods. *Analyst* 2000; 125:1765-69.