

**BEYİN ARAŞTIRMALARINA
TEMEL OLUŞTURACAK MADDE
DÜZEYLERİ İÇİN HPLC YÖNTEMİ**

Nurcan TURAN CANDAN
Yüksek Lisans Tezi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Ocak-2001

Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.
Proje No: 990325

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nurcan TURAN CANDAN'ın "BEYİN ARAŞTIRMALARINA TEMEL OLUŞTURACAK MADDE DÜZEYLERİ İÇİN HPLC YÖNTEMİ" başlıklı Analitik Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 06.02.2004... tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye(Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Mustafa TUNCEL	
Üye	: Doç. Dr. Nurcan E. BAZU	
Üye	: Doç. Dr. Dilek DOĞRUKOL AK	
Üye	:
Üye	:

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 22.01.2004. tarih ve 02/1..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yusuf ÖZDEMİR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****BEYİN ARAŞTIRMALARINA TEMEL OLUŞTURACAK MADDE
DÜZEYLERİ İÇİN HPLC YÖNTEMİ****NURCAN TURAN CANDAN****Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı****Danışman: Prof. Dr. Muzaffer TUNCEL****Yardımcı Danışman: Doç. Dr. Dilek DOĞRUKOL-AK****2001**

Bu çalışmada, beyindeki katekolamin düzeylerinin tayini için floresans dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniğinin kullanıldığı bir yöntem tanıtılmaktadır. 0.030 M NaH₂PO₄.2H₂O, 2.4x10⁻³ M sodyum heptansulfonat, 6.0x10⁻⁵ M Na₂EDTA ve % 7.2 metanol (pH 4.11) den oluşan hareketli faz ortamında 3 mm x 150 mm, 3µ tanecik çaplı C₁₈ kolonlarda noradrenalin, adrenalin, 3,4-dihidroksibenzilamin (iç standart) ve dopamin sırasıyla 4.3 dk, 5.0 dk, 6.7 dk ve 10.0 dk alıkonma zamanlarında görülen pikleri ile ayrılmış ve tayin edilmiştir. Yöntemin tekrar edilebilirliği, seçiciliği, doğrusallığı ve geri kazanım oranı incelenmiştir. Asidik alumina kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemi ile noradrenalin, adrenalin ve dopamin için sırasıyla % 73.91, % 73.76 ve % 75.46 geri kazanım sağlanmıştır. Yöntem sıçan beyin dokusu homojenatındaki katekolamin düzeylerinin tayin edilmesi amacıyla uygulanmıştır.

**Anahtar Kelimeler: Katekolaminler, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi,
Beyin, Miktar tayini**

ABSTRACT**Master of Science Thesis****AN HPLC METHOD WHICH WILL BE FUNDAMENTAL OF BRAIN
RESEARCH FOR THE DETERMINATION OF SUBSTANCE LEVELS****NURCAN TURAN CANDAN****Anadolu University
Health Science Institute
Analytical Chemistry Program****Supervisor: Prof.Dr.Muzaffer TUNCEL****Second Supervisor: Assoc.Prof.Dilek DOĞRUKOL-AK****2001**

A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method with fluorescence detection is described for the determination of catecholamine levels in brain tissue. Catecholamines were separated in a mobile phase consisting of 0.030 M NaH₂PO₄·2H₂O, 2.4x10⁻³ M sodyum heptansulfonat, 6.0x10⁻⁵ M Na₂EDTA ve % 7.2 metanol (pH 4.11) using 3 mm x 150 mm, 3μ C₁₈ column. The retention times of noradrenaline, adrenaline, 3,4-dihidroxybenzylamine (internal standard) and dopamine were 4.3 min, 5.0 min, 6.7 min and 10.0 min, respectively. The reproducibility, selectivity, linearity and recovery of the method was investigated. Recoveries of catecholamines after asidic alumina extraction method for noradrenaline, adrenaline and dopamine were found to be 73.91 %, 73.76 % and 75.46 %, respectively. The method was applied to rat brain tissue homogenate for the determination of catecholamine levels.

Keywords: Catecholamines, High-performance Liquid Chromatography, Brain, Determination

TEŞEKKÜR

Bize özgür bir Türkiye’de bilimsel araştırma imkanını kazandıran yüce önderimiz Mustafa Kemal ATATÜRK’e

Bilgi, tecrübe ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Eczacılık Fakültesi Temel Bilimler Bölümü Başkanı Prof.Dr. Muzaffer TUNÇEL’e

Çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendiren, değerli fikirleri ve hoşgörüsü ile beni destekleyen çok değerli hocam Doç.Dr. Dilek DOĞRUKOL-AK’a

Çalışmanın gerçekleşmesinde lisanüstü tez projesi desteğini sağlayan Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanı Prof. Dr. Nezih VARGAN’a

İlgi ve yardımlarını esirgemeyen Araştırma Fonu eski başkanı Prof. Dr. Atilla BARKANA’ya

Deneysel çalışmalarım sırasında ilgi ve destekleri için Uzm.Dr. Nilüfer ERKASAP’a

Analitik Kimya Anabilim Dalı personeline,

Sevgili abim Faruk TURAN,ve ablam Esra TURAN’a,anne ve babama,ve eşim Mehmet CANDAN’a ,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLERDİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. Katekolaminlere Giriş.....	2
2.2. Katekolaminlerin Biyomedikal Önemi.....	3
2.3. Katekolaminlerin Biyosentezi.....	3
2.4. Katekolaminlerin Depolanması ve Salgılanması.....	5
2.5. Katekolaminlerin Metabolizması.....	6
2.6. Katekolamin Sentezinin Sinir İmpulslarıyla Düzenlenmesi.....	8
2.7. Katekolaminlerin Etki Mekanizmalarına göre Sınıflandırılması... ..	8
2.8. Katekolaminlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	9
2.8.1. Adrenalin(Epinefrin).....	9
2.8.2. Noradrenalin(Norepinefrin).....	9
2.8.3. Dopamin.....	10
2.9. Katekolaminlerin Etkileri ve Fonksiyonları.....	10
2.9.1. Adrenalin.....	10
2.9.2. Noradrenalin.....	12
2.9.3. Dopamin.....	13
2.10. Katekolaminlerin Eksik veya Fazla Sentezlenmesi Sonucunda Oluşan Farmakolojik ve Fizyolojik Etkiler.....	14
2.11. Katekolaminlerin Tayini ile İlgili Çalışmalar.....	17

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Kimyasallar.....	24
3.2. Aletler.....	24
3.3. Mobil Faz.....	24
3.4. Standart Çözeltiler.....	25
3.5. Beyin Dokusu Numunelerinin Hazırlanması.....	25
3.6. Asidik Alumina Hazırlanması.....	25
3.7. Katekolaminlerin Sıçan Beyin Dokusundan Ekstraksiyonu.....	25
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. Yöntemin Seçiciliği.....	29
4.2. Doğrusallık Aralığının İncelenmesi.....	33
4.3. Geri Kazanım Oranının Belirlenmesi.....	33
4.4. Saptama Sınırı ve Tayin Sınırı.....	36
4.5. Beyin Dokusundaki Katekolaminlerin Miktar Tayini İçin Uygulama.....	36
5. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	40

ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1.	Katekolaminlerin biyosentezi	4
2.2.	Katekolaminlerin metabolizyonu	7
2.3.a.	Adrenalinin açık kimyasal formülü	9
2.3.b.	Noradrenalinin açık kimyasal formülü	9
2.3.c.	Dopaminin açık kimyasal formülü	9
4.1.	Katekolaminler için elde edilen orijinal HPLC kromatogramı	29
4.2.	Seçiciliğin gösterilmesi için kaydedilen beyin dokusu homojenatı ekstresinin HPLC kromatogramı	32
4.3	Geri kazanım deneyleri sırasında standart katekolamin çözeltilerinin ekstraksiyonu ile elde edilen HPLC kromatogramı	34
4.4	Miktar tayini yapılan beyin dokusu homojenatının orijinal kromatogramı	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

4.1.	Tutunma zamanı tekraredilebilirliği	30
4.2.	Alan oranı (katekolamin alanı/ IS alanı) tekraredilebilirliği	30
4.3.	Düzeltilmiş alan oranı tekraredilebilirliği	31
4.4.	Katekolaminlerin kalibrasyon eşitlikleri	33
4.5.	Noradrenalinin geri kazanım değerleri	35
4.6.	Adrenalinin geri kazanım değerleri	35
4.7.	Dopamin geri kazanım değerleri	35
4.8.	Ekstraksiyon ile elde edilen kalibrasyon eşitlikleri	36
4.9.	Beyin dokusunda bulunan katekolamin miktarları	38

1. GİRİŞ

Katekolaminler, katekol halkası taşıyan önemli doğal moleküllerdir. Endojen olarak bulunan başlıca katekolaminler, adrenalin, noradrenalin ve dopamindir. Her üç aminde, psikolojik fonksiyonlar ve farmakolojik hareketlerden sorumludurlar. Dopamin ve noradrenalin, damar hareketleri üzerinde etkili iken adrenalin metabolik düzenlemelerde etkilidir [1,2].

Katekolaminlerin ve metabolitlerinin analizini hedefleyen çalışmalarda biyolojik sıvılarda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) tekniğini büyük ölçüde kullanan birçok analitik yöntem bildirilmiştir. Bunlar elektrokimyasal dedektörler [2-12] ve florimetrik dedektörlerin [13-18] kullanıldığı sabit fazı C₁₈ oktadesil kolonlar olan biyolojik sıvılardaki katekolamin tayinlerini kapsamaktadır.

Bu çalışmada, beyin dokusunda bulunan katekolaminlerin ayrılması ve miktarlarının belirlenmesi için bir yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Deneylede tekrar edilebilirliği arttırmak amacıyla internal standart olarak 3,4-dihidroksibenzilamin kullanılmıştır. Yöntem, tek bir deneyle 10 dakika içinde katekolaminlerin aynı anda tayinine olanak sağlamaktadır. Tayin için uygulanan işlemler, basit, duyarlı, seçici ve tekraredilebilir özelliktedir. Önerilen yöntem, klinik uygulamalar ve merkezi sinir sisteminin biyolojik numuneleri için kolayca kullanılabilir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Katekolaminler ile İlgili Genel Bilgi

Katekol halkası ve amin grubu taşıyan bileşiklere katekolamin adı verilir. Bir çok hücre membranında, biyokimyasal olayların oluşumunda veya sonlanmasında ya da psikolojik durumlarda (konsantrasyon sağlama, dinlenme, metabolik değişimler...vb) hormon veya nörotransmitter olarak görev alırlar [1]. Başlıca katekolamin türevleri adrenalin, noradrenalin ve dopamindir [19].

Katekolaminler, nörotransmitter olarak sinir aksonu ucundan salınırlar, bazen de hormon olarak vücudun bir yerinde yapılanarak nöronlar tarafından kan dolaşımına salınırlar ve bu yolla çeşitli organ ve dokulara götürülürler [1].

Simpatik-adrenal sistem, parasempatik, sempatik ve adrenal medulla olmak üzere üç grup içerir. Bunlardan parasempatik sinir sisteminde kolinerjik, pre- ve postgangliyonik sistem; sempatik sistemde ise adrenerjik ve polinerjik sinirler bulunmaktadır.

Adrenal medulla sistemi, gerçekte sempatik sinir sisteminin bir uzantısıdır, çünkü pre- ve postgangliyonik sinir uzantıları adrenal medullada sonlanırlar. Burada katekolaminlerin üretildiği yer olan kromaffin hücrelere etki ederler. Bu nedendir ki, adrenal medulla aksona uzantısı olmayan özelleşmiş bir sinir köküdür. Kromaffin hücreler uzak mesafelerde etkili olabilen ürünleri sentezler, depolar ve açığa çıkarırlar. Adrenal medulla da mükemmel bir endokrin organ gibi davranabilir [1].

Katekolaminler, potasyum dikromata maruz kalınca kırmızı kahverengimsi bir renk oluşturan granüller içerdikleri için bu şekilde adlandırılmış kromaffin hücrelerinde sentezlenir. Bu hücre toplulukları, kalp, karaciğer, böbrekler, cinsiyet bezleri, postgangliyonik sempatik sinirlerin adrenerjik nöronları ve santral sinir sisteminde de bulunurlar [20].

Adrenal medulladan salgılanan katekolaminlerin %80 i adrenalindir. Bu nörotransmitteri salan hücreler, medullada az yoğunlukta iri granüller taşırlar. Geriye kalan aminler ise noradrenalindir ve medullada bu nörotransmitteri sentezleyen hücreler küçüktür ancak çok granül taşırlar [1]. Adrenalin ve noradrenalin, adrenal medullada ve diğer kromaffin dokularında değişik

hücrelerde depolanırlar. Sempatik sinir uçlarından salgılanan katekolaminlerin büyük çoğunluğu noradrenalindir ve dopamin ile birlikte beyin çeşitli bölgelerinden sentezlenirler [3].

2.2. Katekolaminlerin Biyomedikal Önemi

Sempatoadrenal sistem hormonları, hayat için zorunlu olmamakla beraber akut ve kronik streslere adaptasyon için gereklidir. Ağır strese yanıtta adrenal, noradrenalin ve dopamin temel elemanlardır. Katekolaminlerin strese karşı verdikleri yanıt daha az fonksiyonu olan organlara göre (cilt, gastrointestinal sistem ve lenfoid doku); hayati olanlarda (beyin, kas, karaciğer ve kardiyopulmoner sistem) bir çok kompleks olayın akut ve bütünleştirilmiş bir uyumunun sağlanması ile ilişkilidir. Katekolaminler yalnız başlarına stres yanıtını kolaylaştırmazlar; bunlara glukokortikoidler, büyüme hormonu, vazopressin, anjiyotensin-2 ve glukagona yardımcı olur [20].

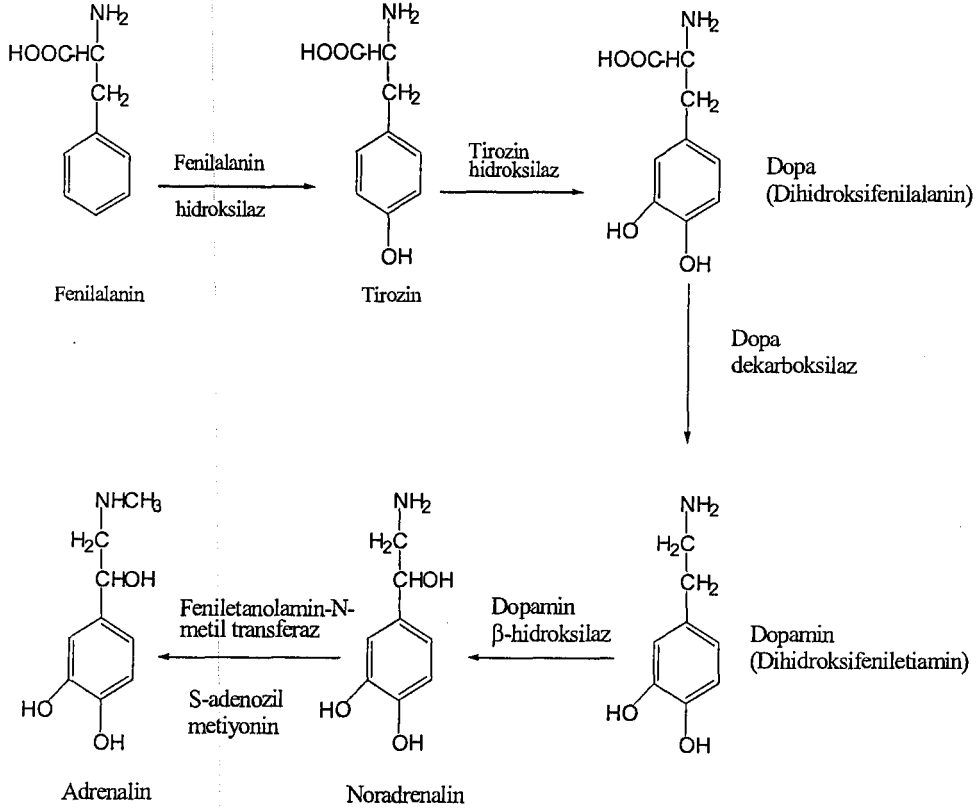
2.3. Katekolaminlerin Biyosentezi

Vücutta bulunan katekolaminlerin sentezi, fenilalanin ve tirozin aminoasitlerinin hidroksilasyonu ve dekarboksilasyonu ile oluşur ve her basamakta ayrı enzim reaksiyonları katalizler [19]. Katekolaminlerin biyosentez basamakları Şekil 2.1. de görülmektedir.

1. Fenilalanin, aminoasit oksidasyonu ile ortaya çıkan bir ara üründür ve katekolamin sentezinin temel maddesidir. Fenilalanin hidroksilaz, karaciğerde ve az miktar da böbreklerde bulunur. Fenilalanin, fenilalanin hidroksilaz yolu ile tirozine dönüşür [21].

2. Tirozin kanda bulunur [1] ve katekolamin salgılayan nöronlara ve adrenal medulla hücrelerine yoğunlaştırıcı bir mekanizma ile taşınır. Bu hücrelerin sitoplazmasında tirozin, tirozin hidroksilaz enzimi ile katalize edilen hidroksilasyon yolu ile dopaya çevrilir. Tirozin hidroksilazın kofaktörü tetrahidropterindir ve aynı reaksiyon sırasında bu madde dihidrobioptereine

dönüştürülür [19]. Tirozin hidroksilaz enzimi kromaffin hücrenin sitozolünde bulunur [1].



Şekil 2.1. Katekolaminlerin biyosentezi [19].

3. Sitozolde bulunan bir başka enzim olan dopa dekarboksilaz, dopayı üzerindeki karboksil grubunun ayrılmasını sağlayarak dopamine çevirir [1]. Bazı otonom sinirlerin gangliyonlarında ve beynin bazı bölgelerindeki nöronlarda, katekolamin sentezi dopamin evresinde durdurulur ve bu nöronların ucundan dopamin salınır (Dopaminerjik sinirler) [19].

4. Dopamini noradrenaline çevirecek olan enzim, dopamin-beta-hidroksilaz (DHB) dir ve sadece kromaffin hücreler içinde bulunur. Bu dönüşümün gerçekleşmesi için dopaminin granüllü vezikül içine girmesi gerekir [19]. Granül içinde sentezin devamı için ise askorbik aside (C vitamini) ihtiyaç vardır. Askorbik asit granüllerde bol miktarda bulunur ve tepkimede elektron verici görev yaptığı sanılmaktadır.

5. Son basamakta ise noradrenalin adrenaline çevrilir. Bu reaksiyonu katalize eden enzim feniletanolamin N-metil transferaz dır ve granül dışında sitozolde bulunur. Bu nedenle, noradrenalin granülden dışarı sızar, adrenaline dönüştürülür ve depo edilmek üzere tekrar granüle girer [1].

Simpatik nöronlarda katekolaminlerin sentezi noradrenalin basamağına kadardır. Adrenalin, sadece adrenal medullada noradrenalin-N-metil transferaz enzimi tarafından metillenerek biyosentezini tamamlar [22]. Adrenalin sentezi, ayrıca adrenal korteks hormonlarının etkisi altındadır ve korku, stres gibi salınımı arttıran etkenler korteks hormonlarının salınmasına neden olur [1].

2.4. Katekolaminlerin Depolanması ve Salgılanması

Depolama kromaffin granüllerde olur. Adrenal medullada, biyosentez, geri alım, depolama ve katekolamin salınımını başarabilen organeller olan kromaffin granüller yer alır. Bu granüller, katekolaminlerle ilgili görevleri yanı sıra ATP, Mg^{++} , Ca^{++} ve birçok proteini de depo ederler. Bu proteinler, sinir sistemi ve organlar üzerinde etkilidirler ve granülde bulunan proteinlerden bir tanesi de kromagranin A dır. Görevi ise, granüllerde bulunan katekolaminlerin ATP ye bağlanmasını sağlamaktır. Bir katekolamin, ATP ye bağımlı transport mekanizması ile granüle alınır ve noradrenalin bu granül içinde depolanır ancak N-metilasyona uğramak üzere granülü terk edebilir ve ondan sonra oluşan adrenalin yeni bir granül topluluğuna dahil olur [1,20].

Adrenal medullanın nöronal uyarılması, depolanma granüllerine ait membranların plazma membranıyla birleşmesine yol açar, bu da noradrenalinin ekzositoz yolu ile salınımına neden olur. Bu yol, nörotransmitterlerin salgılanmasındaki temel mekanizmadır ve Ca^{++} a bağımlı bir olaydır. Ekzositoz yolu ile salınma sırasında, simpatik sinirlerin impulsları adrenal medulladaki kromaffin hücrelerine gelince sinir uçlarındaki nörotransmitterler salınır ve hücre membranındaki reseptörü ile birleşerek kalsiyum kanallarını açarlar ve hücreye Ca^{++} girişi sağlanır. Olay için gerekli enerji, Mg^{++} tarafından aktive edilen ATP nin parçalanmasıyla oluşur.

Katekolaminlerin nöronal geri alımı, katekolamin hormonlarının muhafazası ve nörotransmitör aktivenin hızla sona ermesi, uyarılan nöronların tepkimeyi sonlandırmaları için gereklidir.

Sempatik sinirlerden farklı olarak adrenal medulla salıverilmiş katekolaminlerin depolanma ve gerialınımı ile ilgili bir mekanizmaya sahip değildir. Adrenal medulladan salınan adrenalın, karaciğer ve iskelet kasına gider fakat daha sonra hızla metabolize olur. Katekolaminler, plazma albumin ile gevşek bağlantı içinde dolaşıma katılırlar ve son derece kısa biyolojik ömürleri vardır [1,20].

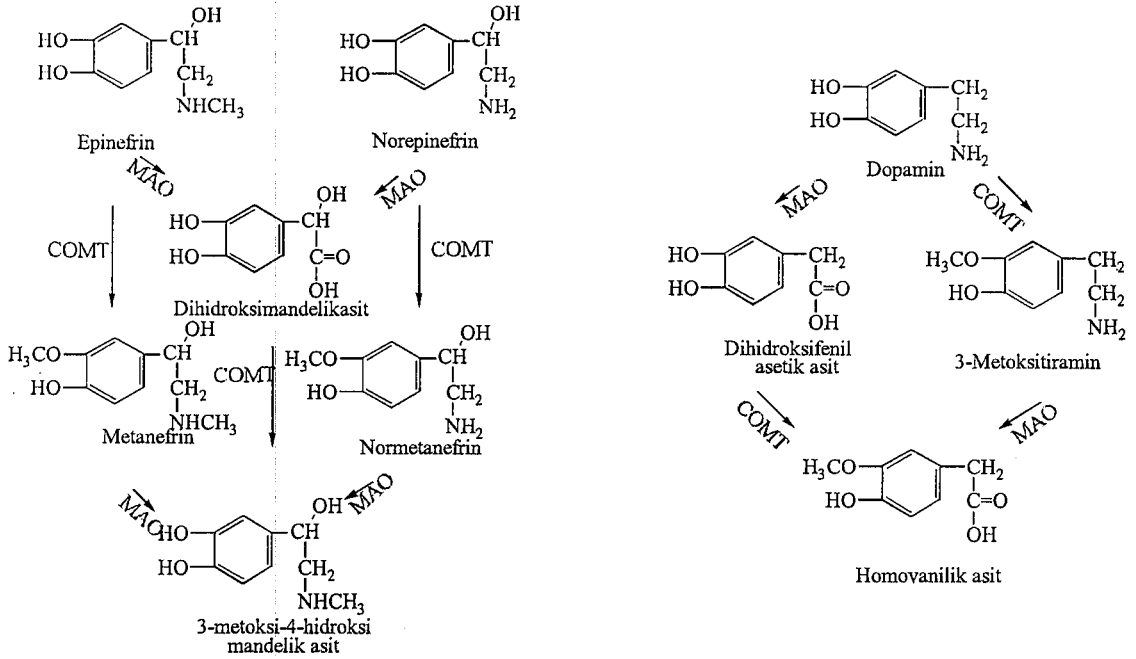
2.5. Katekolaminlerin Metabolizması

Katekolamin yapısındaki nörotransmitterler iki enzim tarafından yıkılırlar. Bu enzimler katekol-O-metil transferaz (COMT) ve monoamin oksidaz (MAO) dur. Katekolaminlerin metabolizması yolu Şekil 2.2. de gösterilmiştir.

Noradrenalin, dopamin ve adrenalın biyolojik olarak inaktif ürünlerine oksidasyon ve metilasyon yolu ile metabolize edilirler. Oksidasyon reaksiyonu MAO, metilasyon reaksiyonu ise COMT tarafından katalize edilir.

MAO, monoaminleri deamine eden bir oksidoredüktazdır. Katekolaminlerden ve birçok bileşikten amino grubunu uzaklaştırır. Vücutta geniş bir dağılım gösterir, en çok karaciğer, mide, böbrek ve bağırsaklarda bulunur. Bu enzim, özellikle katekolaminlerin salgılandığı sinir uçlarında oldukça boldur ve mitokondrinin dış yüzeyine yerleşiktir.

COMT ise, vücutta geniş bir dağılım gösterir, en çok karaciğer, böbrek ve düz kaslarda bulunur. Fakat sinir uçlarında bulunmayan sitozol (hücre içi) bir enzimdir. COMT, genellikle katekolaminlerin benzen halkasının 3. konumuna (meta pozisyonuna) bir metil grubunun ilavesini katalize eder. Bu reaksiyon, divalen bir katyonu gerektirir ve burada 5-adenozil metiyonin metil donörüdür. Substrata bağımlı olan bu reaksiyonun sonucunda homovanilik asit, normetanefrin ve metanefrin oluşur [19,20].



Şekil 2.2. Katekolaminlerin metabolizması [20].

Dolaşımda bulunan katekolaminlerin büyük bir bölümü O-metillenmiş haldedir. O-metil türevlerinin idrardaki yoğunluklarının ölçümü, adrenal ve noradrenalin miktarlarının bir göstergesidir. Aynı zamanda türevler sülfürik asit ve glukoronitler ile konjuge edilir.

O-metil türevleri, metanefrin ve normetanefrindir. Vücuttan atılmayan bu türevler büyük oranda okside edilirler. Bu türevler, MAO inhibitörlüğünde idrarda en çok bulunan ve bir katekolamin metaboliti olan vanil mandelik asite (VMA) dönüşürler. VMA, adrenal ve noradrenalinin O-metillenmiş deamin ürünüdür. Diğer taraftan, noradrenerjik sinir uçlarında noradrenalinin bir bölümü sürekli şekilde MAO tarafından fizyolojik olarak inaktif deamine türevlerine, 3,4-dihidroksimandelik asit ve bunun eşdeğer glikolüne dönüştürülür. Bu türevler dolaşıma girer ve daha sonra eşdeğerleri O-metil türevlerine, VMA ve 3-metoksi-4-hidroksi fenil glikole (MHPG) O-metillenebilirler.

Dopaminerjik sinirlerde ise, MAO ve COMT enzimleri dopamini inaktif hale getirirler. MAO nun katalizlediği deaminasyonlarda olduğu gibi önce

aldehitler oluşur ve sonra aldehit dehidrogenazlar varlığında karşılık gelen asitlere okside edilirler ve DOPAC ve homovanilik asite (HVA) dönüşür. Aldehitlerde 3,4-dihidroksi fenitanole (DOPET) ve 3-metoksi-4-hidroksi fenitanole indirgenir. Bu arada DOPAC ve HVA in bir bölümü sülfat konjüгатlarını oluştururlar. cAMP nin ise sinaptik transmisyonunda işe karıştığı sanılmaktadır [19].

2.6. Katekolamin Sentezinin Sinir İmpulslarıyla Düzenlenmesi

Adrenal medullanın pregangliyonik liflerini sağlayan splanknik sinirin uyarılması, katekolaminler, granül taşıyıcı protein ve dopamin beta hidroksilaz (DBH) ın farklı salınımı ile sonuçlanır.

Sinirlerin stimülasyonu da artmış katekolamin sentezi ile sonuçlanır. Noradrenalin sentezi akut stresten sonra artar ama burada tirozin hidroksilaz aktivesi artmakla beraber tirozin hidroksilaz miktarı değişmemektedir. Tirozin hidroksilaz, cAMP ye bağımlı protein kinaz için bir substrattır ve bundan dolayı bu aktivasyon fosforilasyon ile ilişkili olabilir. Kronikleşmiş sempatik sinir aktivesinin eşlik ettiği uzamış stres, tirozin hidroksilazın artmış miktarı ile sonuçlanır. DBH nin da benzer bir endüksiyonu bildirilmiştir. Katekolamin biyosentez yoluna ait enzimlerin endüksiyonu, fizyolojik strese bir çeşit uyum yolu olup nöral (tirozin hidroksilaz ve DBH artışı) ve endokrin (FNMT (feniletanolamin-N-metil transferaz) endüksiyon) faktörlere bağlıdır [20].

2.7. Katekolaminlerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması

Katekolaminlerin etki mekanizmasını reseptör biyolojisi ve hormon etkisi oluşturur. Katekolamin reseptörleri α -adrenerjik, β -adrenerjik ve D-dopaminerjiktir. Noradrenalin α -, adrenalin β - ve dopamin D- reseptörleriyle daha fazla etkileşirler [20].

Katekolamin reseptör aracılığı ile oluşan etkileri ve sınıflandırılması:

α - Adrenerjik reseptörü

α -1: Düz kas kasılması, kan damarları, genitoüriner traktüs

α -2: Düz kas gevşemesi, düz kas kasılması, bazı vasküler yataklar.

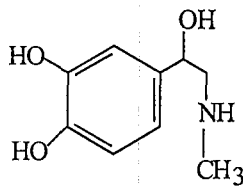
Kısıtlamalar: Lipoliz, renin açığa çıkışı, trombosit kümeleşmesi, insülin sekresyonu [20].

β -1: Kalbin hızlanması, kalp kasında gerilimin artması, lipolizin uyarılması,

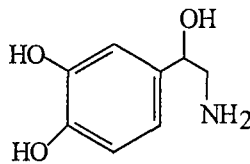
β -2: Vazodilasyon, bağırsaklarda gevşeme ve uterusu gevşeme, bronşlarda dilatasyon, kalori oluşumu, glikojenoliz, idrar torbasında gevşeme,

D: Çizgili kaslarda gevşeme ve kasılma hareketleri, beyin fonksiyonlarına göre noradrenalin ve adrenalin sentezini başlatma [1].

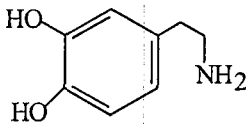
2.8. Katekolaminlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



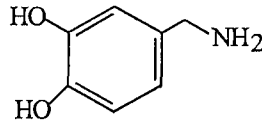
Adrenalin



Noradrenalin



Dopamin



3,4-dihidroksibenzil amin (IS)

Şekil 2.3. Katekolaminlerin açık kimyasal formülleri

2.8.1. Adrenalin (Epinefrin)

Adrenalinin kimyasal formülü 4-[1-hidroksi-2-(metilamino)etil]-1,2-benzendiol dür. Kapalı formülü, $C_9H_{13}NO_3$ dür. Açık kimyasal formülü Şekil 2.3. de verilmiştir. Molekül ağırlığı 183.20 dir. Adrenalin pirokateşin-etanol-metilamin yapısındadır. Beyaz ya da çok açık kahverengi, hava ve ışık etkisiyle yavaş yavaş koyulaşan kristallerdir. 212 °C dolayında bozularak erir. Suda az çözünür. Alkol, eter, aseton, kloroform ve yağlarda çözünmez. Asitlerle suda kolay çözünen tuzlar oluşturur. Tuzlarının sulu çözeltilerine amonyak veya alkali karbonat çözeltileri ilave edilirse adrenalin yeniden baz halinde çöker. Baz haldeki

adrenalin renksizdir, zamanla oksitlenerek adrenalon halini alır ve pembe renge dönüşür. Kuvvetli alkalilerle fenolatlarını yaparak çözünür. Özellikle nötral ve bazik çözeltilerinde oksijen varlığında yükseltgenir, oluşan kırmızı rengin nedeni adrenokromdur. Fenolik hidroksillerden dolayı redüktör özelliği vardır [23]. İnsan ve hayvanlarda l-formunda meydana gelen ve adrenal medulla tarafından üretilen temel sempatikomimetik nörotransmitterdir [3,23,24].

2.8.2. Noradrenalin (Norepinefrin)

Noradrenalinin kimyasal formülü, 4-(2-amino-1-hidroksietil)-1,2-benzendiol dür. Kapalı formülü $C_8H_{11}NO_3$ dir. Açık kimyasal formülü Şekil 2.3. de verilmiştir. Molekül ağırlığı 169.18 dir. Noradrenalin, bir pirokateko (pirokateşin) etanol amindir. Beyaz renkli kristaller görünümündedir. 191 °C dolayında bozularak erir. Suda az çözünür. Eter ve alkol içerisinde çok az çözünür [5,24].

2.8.3. Dopamin

Kimyasal formülü 4-(2-aminoetil)-1,2- benzendiol dür. Kapalı formülü $C_8H_{11}NO_2$ dir. Açık kimyasal formülü Şekil 2.3. de verilmiştir. Molekül ağırlığı 153.18 dir. 214 °C de bozularak erir. Serbest halde bazik özellik gösterir. Beyaz renkli bir tozdur. Suda çok çözünür, metanol ve sıcak % 95 lik etanolde çözünür, eter, petrol eteri, kloroform, benzen ve toluende çözünmez. Alkali hidroksitlerin sulu çözeltilerinde çözünür. Oksijene oldukça duyarlıdır ve rengini kaybeder [24].

2.9. Katekolaminlerin Etkileri ve Fonksiyonları

2.9.1. Adrenalin

Adrenalin, adrenal medulladan salgılanan nörotansmitterlerin büyük çoğunluğunu oluşturur. Aynı zamanda beyin kökünde adrenalin salgılayan

adrenerjik nöronlar bulunur. Adrenal medullada ise büyük çaplı granüller içinde bulunur ve buradaki sentezi sempatik sinirler ve glukokortiotlerce düzenlenmektedir. Adrenalinin direk olarak dokularda oksidasyonu arttıran bir etkisi vardır, bunun sonucunda vücutta bazal metabolizma değeri yükselir [19,25].

Perifer damarlarda kan akımına ve kan basıncına etkileri bulunmaktadır. Genel olarak adrenalin beyin dışındaki tüm kan damarlarında daralma yapar ve damar düz kaslarını kasılmaya sevkeder. Bu sıradaki aktivite açısından, deri damarlarını daraltırken iskelet ve kalp kası damarlarını genişletir. Adrenalin genel olarak kan basıncının artmasını sağlar, bu etki ise kan damarlarındaki düz kasların kasılmaya sevk edilmesinden kaynaklanır. Sistolik basıncı artırır, diyastolik basıncı arttırmaz. Bunun nedeni hala bilinmemektedir [26].

Kalp üzerine olan etkileri incelendiğinde, genel olarak izole edilmiş kalpte denendiği zaman kalp atım sayısının ve kasılma gücünü artırdığı görülür. Etki sırasında kalbin sempatik sinirlerini uyararak kalp atım sayısını artırmaktadır (kronotropik etki). Doğrudan kas kasılma gücünü artırır (intropik etki) [1].

Solunum olayında bronşların düz kaslarını gevşetir ve hava akımına karşı direnci azaltır ve solunum derinliğini artırır [26].

Metabolizma ile ilgili olan etkileri, karbonhidrat ve yağ metabolizması üzerinedir. Karbonhidrat metabolizmasında, stres etkisiyle oluşan bir uyarı sonucu (korku, heyecan, kanama, hipoksi vb) adrenal medulladan salgılanan adrenalin, karaciğerde glikojenolize yol açar ve kasta fosfarilazın stimülasyonuna neden olur. Karaciğerdeki glikojen fazla yıkılarak hiperglisemi meydana gelir. Çok küçük adrenalin miktarı, kan şekerini 500-700 mg a yükseltir ve idrarda glikoz çıkabilir. Bu sırada kaslarda da glikojen yıkılmasıyla laktik asit oluşur ve kana geçebilir [20,25].

Yağ metabolizmasındaki etkisi ise, adrenalinin yağ dokusunda lipolizisi artırmasından kaynaklanmaktadır ve buna bağlı olarak kanda serbest yağ asidi oranı artar. İskelet kası kandan yağ asitlerini alır ve enerji için kullanır. Kalp kası enerjisinin % 67 si yağ asitlerinden sağlanır. Adrenalin dokularda metabolik hızı %30 kadar artırır [26].

Vücut sıcaklığını ayarlayan mekanizmalarda, soğuk ortamda aktive eden endokrin etki gösterir. Soğukta titreme, kas kasılmalarıyla oluşan somatik

ayarlama mekanizmasıdır. Soğukta adrenalin salgısının artması, sıcakta azalması gibi tepkimeler vücut sıcaklığının ayarlanmasında endokrin etkilere örnektir [20].

Fizyolojik olarak ise damarların genişleyip daralmaları sırasında görev alırlar.

2.9.2. Noradrenalin

Adrenalin ile birlikte vücudun otonom sinir sistemini çalıştıran maddedir [26]. Noradrenalin, vücutta bir çok postgangliyonik sempatik sonlanmalar, *cerebral cortex*, *hypothalamus*, *cerebellum* ve omurilikte bulunur [19]. Noradrenalin salgılayan nöronlara noradrenerjik nöron adı verilir. Bu nöronlar özellikle *pons*'taki *locus ceruleus*'ta yer alıp uzantılarını beynin geniş alanlarına gönderir. Noradrenalinin vücutta bazal metabolizma değeri düşüktür, çünkü daha çok sinir sistemi içinde etkilidir [25].

Noradrenalin insanların ve hayvanların hayatından memnun (ödüllendirilmiş) bir ruhsal duruma girmesini ve uyanık bulunmayı sağlar, ruhsal durumu düzenler, rüya görme ve uyku olaylarında işe karışır. Otonom sinir sistemi içinde, şahsın varlığını sürdürebilmesi için gerekli davranışları (yeme-içme, düşmanı ile karşılaştığında kızma, hiddet, kavga veya kaçıp kurtulma reaksiyonlarında noradrenalin salgılandığı görülmüştür. Beynin omurilik ve *cerebellum* kısmında bulunan noradrenerjik nöronlar burada limbik sisteme de etki ederek seksüel çiftleşme ile başlayıp gebe kalma ile sonuçlanan bir dizi davranışların oluşumunda etkin olarak sentezlenir [1,3].

Periferik damarlarda kan akımına ve kan basıncına etkileri vardır. Beynin dışında tüm kan damarlarında noradrenalin, düz kasları kasılmaya sevk eder ve damar daralması yaratır. Sistemik kan basıncını artırır, hem sistolik hemde diyastolik kan basıncını yükseltir.

Kalp üzerine etkileri vardır. İzole edilmiş kalpte denendiği zaman kalp atım sayısını artırır (Kronotropik etki). Kalp kasılma gücünü artırır (inotropik etki). Ancak *in vivo* injekte edildikten sonra etkisi değişiktir. Noradrenalin

injekte edilince kalp atım sayısı azalır. Bu etki vagus sinirinin refleks yoluyla uyarılmasından ileri gelir, zira atropin bu etkiyi ortadan kaldırır.

Solunum olayı sırasında noradrenalin bronşların düz kaslarını genişletir, solunum derinliğini artırır, hava akımına karşı direnci azaltır ve ventilasyonu artırır. Böylece aktif dokunun oksijen ihtiyacını karşılar [26].

Termoregülatör sistem üzerinde, soğukta aktive eden endokrin etkiye sahiptir. Sıcaklık ayarlayıcı merkezler soğuk ile aktive edilince noradrenalinin sinaptik nörotransmitter görev yaptığı ile ilgili kanıtlar vardır [1].

Karbonhidrat metabolizması üzerinde de etkisi bulunmaktadır. Noradrenalinin bu mekanizmadaki hiperglisemi etkisi, adrenalinin meydana getirdiği etkinin % 5 i kadardır [25]. Ancak iskelet kaslarında glikojenolizisini artırır ve ATP yapımını hızlandırır [1].

Yağ metabolizmasındaki etkisi tam olarak bilinmemekle beraber, adrenalin ile birlikte yağ dokusundaki lipolizisi artırır. Oluşan yağ asitleri kan dolaşımına girerler [1].

2.9.3. Dopamin

Dopamin beyin kökünün *substantia nigra* denilen bölgesindeki nöronlardan salınır. Bu nöronların aksonları *nucleus caudatus*'ta son bulur. Dopamin salgılayan nöronlara dopaminerjik nöron denir [1].

Dopamin merkezi sinir sisteminin önemli bir nörotransmitteridir. Merkezi sinir sistemi, kas hareketliliğinin sağlanması ve koordinasyonundan, vücudun hareketlerinden, hafızanın kontrolü, susama, kan basıncı...vb kontrolünde ve denetiminde görevlidir [3]. Dopamin, kasların taşıma olayından, koordinasyonuna kadar vücudun hareketleri düzenlenirken sentezlenir [20]. Çizgili kasların normal tonus ve kasılmasında kontrol görevi yapan *corpus*'ta dopamin miktarı fazladır. Bu nöromediatör, *stratium*'daki striol nöronları inhibe ederler. Bu inhibisyon ise, isteğe göre hareket etme, hareketlerin hızlanması ve yüz kaslarının hareketlerinde (gülümseme, göz kapaklarının hareketleri ...vb) kolaylık sağlar.

Psikolojik fonksiyonlarda da etkisi bulunmaktadır. Dopamin insanlarda beyinde dürtü ve düşünce kalıplarını da etkiler [3]. Hafızanın kontrolü, susama, kan basıncı düzenlenmesi, uyanıklık ...vb olaylarda noradrenalin ile birlikte görev alırlar. Dopamin, kişilerin kendini korumak için kavga, kaçma, kızma, hiddet sırasında taşikardi, hiperventilasyon, adrenal medulladan adrenalin salınması aktivitelerinin düzenlenmesinde rol alır [20]. Dopamin ayrıca *hypothalamus*'a gelen impulslara göre adrenalin ve noradrenalin sentezinin düzenlenmesi, uyku ve uykusuzluk hallerinin ayarlanması, heyecan kontrolü, korku ve hiddet olayının düzenlenmesinde ve seksüel davranışlar, vücutta su dengesi ve susamanın kontrolü gibi durumlarda salgılanarak ilgili endokrin bezinden ilgili hormonun sentezlenmesinde yardımcı olur [1].

2.10. Katekolaminlerin Eksik veya Fazla Sentezlenmesi Sonucunda Oluşan Farmakolojik ve Fizyolojik Etkiler

Katekolaminler farmakolojik ve fizyolojik olarak organizmada önemli görevlere sahiptir ve sentez sırasında, az ya da çok sentezlenmeleri organizmanın dengesini bozarak aşağıda yer verilen çeşitli hastalıklara neden olmaktadır.

Fenilketonüri: Fenilalanin metabolizmasında rol alan basamaklar önemli klinik özellikler taşımaktadır. Çünkü bu basamaklar birçok önemli enzimin doğuştan eksikliği ile oluşan çeşitli doğumsal metabolizma hastalıklarının merkezidir. Fenilketonüri, şiddetli zeka geriliği ve kan, doku ve idrarda büyük miktarlarda fenilalanin ve onun ketoasit türevlerinin birikmesi ile karakterize olan bir bozukluktur. Nedeni, genellikle doğumsal olarak fenilalanin hidroksilazın eksikliğine yada yokluğuna bağlıdır. Bu enzimin geni onikinci kromozomun uzun kolunda bulunur. Bu gendeki çok sayıda farklı mutasyonun fenilketonüriye yol açtığı görülmüştür. Fenilketonüri, tirozinin hidroksilasyonu için gereken bioprotein kofaktörünün yenilenmesini sağlayan pteridin redüktazın eksikliği veya yokluğuyla veya bioprotein sentezi ile de oluşturulabilir. Fenilketon olan fenilketonüri maddesi idrarda bol miktarda bulunur. Bu hastalık

tedavi edilmez ise ileri derecede zeka geriliğine neden olur. Tedavi, fenilalanin içermeyen besinler verilerek yapılır [1,19].

Parkinson hastalığı: *Corpus striatum*'da *substantia nigra* sisteminde melanin kaybı ve dopamin yetersizliği sonucu ortaya çıkar. Kaslarda kontrolsüz bir titreklik başlar ve bu durum kasların dinlenme durumunda daha belirgindir. Hastalara L-dopa verildiği zaman tedavi edilebilir. L-Dopa, dopaminin ön maddesidir ve kan-beyin engelini dopaminden daha kolay geçerek beyin hücrelerine ulaşır [4,27].

Şizofreni: Beyin bölgesinde oluşan, uyanık durumda bile aşırı hayal görme hastalığıdır. Hastalığın asıl nedeni halen bilinmemekle beraber limbik sistem ile neokorteks arasındaki bağlantının bozulması sonucu oluştuğu sanılmaktadır. Bu olayda dopaminerjik sistemin rolü vardır. Beyin bölgesine gelen uyarılar fazla dopamin salgılanmasına neden olur. Fenotiyozin grubu ilaçlar, merkezi dopamin reseptörlerini bloke ederler, ancak hastalığın tedavisinde tam olarak başarıya ulaşılamamıştır [1,4].

Feokromasitoma tümörleri: Adrenal medullada kromaffin hücreleri içinde oluşan tümör sonucunda devamlı olarak adrenalin ve noradrenalin salınımı yapılmaktadır. Tümörün nasıl oluştuğu henüz aydınlatılamamıştır. Tümörün tanısında kullanılabilecek yeni çalışmalara ihtiyaç vardır [20].

Kronik hipertansiyon: Feokromasitoma tümörü sonucu salınan katekolaminler kronik hipertansiyona neden olabilir. Bu nörotransmitterler, bütün vücut arteriyollerini daraltıkları gibi böbrek arteriyollerinide daraltır ve böbreklerin arteriyal kan basıncını ayarlama mekanizmasını engellerler [1,20].

Stres: Organizmanın fiziksel veya ruhsal, ya da hem fiziksel hemde ruhsal alanda çevre ile, kendi kendisi ile uyumluluğunun bozulmasıdır. Bazı stres durumları şunlardır: Çeşitli travmalar, şiddetli ve bunaltıcı sıcak, şiddetli ve önlenemeyen soğuk, her çeşit hastalık halleri, ameliyatlar, korkular, sevinçler, konulan engeller, karşılaşılan zorluklar, ümitsizlikler ...vb olaylar beyin bölgesinden ve adrenal medulladan adrenalin ve noradrenalin gibi sempatikomimetik maddelerin fazla miktarda salgılanmasına neden olur. Bu nörotransmitterler organizmayı streslere adapte etme görevi yaparlar. Stres yenilmediği sürece aşırı depresyona neden olabilir. Adrenal medullanın hasar

görmesi, noradrenalin ve adrenalin sentezlenmesini büyük ölçüde azaltır. Adrenal medullanın zarar görmesi belki ölüme neden olmaz ama otururken sağlıklı gibi görünen bir insanın ayağa kalkması yürümesi çok güçtür. Hızlı hareket etmesi imkansızdır [1,21].

Septik şok: Şok, dolaşımın iflası veya perifer dolaşımın iflası olarak tarif edilebilir. Ortaya çıkan ani stres durumları kişiyi şoka sokabilir. Klinik görünüm olarak yüzeysel ve hızlı solunum, zayıf nabız, düşük arteriyel kan basıncı, deri rengi solması, huzursuzluk, mental depresyon, duyuların azalması ve susama görülür. Şok, büyük bir zorlanma yarattığından adrenal medulladan katekolaminlerin salınmasına neden olur. Katekolaminlerin oluşturduğu vazokonstriksiyon çok önemli olmamakla beraber başlangıçta dengelenme mekanizmalarına yardımcı olur [1,2].

Bronşiyal astım: Solunum olayında düzensizliklerin oluşması astım hastalığına etki eder. β -adrenerjik reseptörler uyarılınca kalp hareketlerini hızlandırır, bronşları genişletirler buna bağlı olarak hava giriş çıkışı sırasında direnç azalacağından solunum derinliği artar. Bu nedenle adrenalin ve noradrenalin bronşiyal astımın tedavisinde kullanılabilir [5,26].

Uyku ve koma durumu: Uyku durumunu başlatan hormon serotonindir ve beynin *hipotalamus* bölgesinde bulunur. Uykudan uyanma sırasında ise noradrenalin salınımı başlar. Noradrenalin nöronlarının zedelenip sentezin azalması sonucu uyku durumu artar ve komaya neden olabilir [1].

Hyperkinesis (yerinde duramama) ve insomnia (uykusuzluk): Huzursuzluk, ani heyecanlanma ve hareketlilik hastalığın belirtileridir. Hasta fazla aktif olma isteğine rağmen oldukça yorgundur. Bu yorgunluk kasların zayıflığından dolayıdır. Uykusuzluk da hastada oldukça sık görülen bir durumdur. Bir neden yokken içlerinden ağlamak gelir. Yerinde duramama, abartılmış hareketler ve genellikle maksatsız hareketler gözlenir. Ellerde, dilde ve göz kapalı iken göz kapaklarında hafif titremeler görülür. Bu titremeler bazen parkinson titremelerine benzeyebilir. Sinir sistemindeki bu durum adrenerjik antagonist ilaçlarla düzeltilebilir. [1].

Neuroblastoma tümörü: Genellikle adrenal medullada oluşur Yetişkinlerde %15 ile 50; çocuklarda ise %5 oranında görülür. Çocukluk

döneminde görülen tümör kanserden dolayı ölüme neden olur. Katekolamin sentezi sırasında, bazen fazla dopamin sentezi, bazende fazla dopamin ve noradrenalin sentezi görülür. Dopamin, homovanilik asit olarak atılır [27].

Kalp Hastalıkları: Katekolaminler kalp kasına doğrudan etki ederler. Stres anında, adrenalın miktarının artarak kalp atım sayısının ve kasılma gücünün artması veya gündelik yaşamda, kalbin normal işlevini yapması için gerektiği kadar sentezlenir [1]. Günlük yaşamda yeteri kadar katekolamin sentezlenmediği takdirde kalp debisi azalır dolayısıyla kalbe yeterli oksijenin girmesi engellenir. Ya da, katekolaminlerin fazla salgılanması kan basıncını arttırır; kalp kaslarında aşırı kasılmaya neden olabilir. Kısacası kalp krizlerinde katekolaminlerin aktif rol aldıkları sanılmaktadır [13].

2.11. Katekolaminlerin Tayini İle İlgili Çalışmalar:

Katekolaminlerin biyolojik sıvılardaki miktarlarının belirlenmesi için en sık kullanılan yöntemlerden biri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemidir. Bu yöntemle yapılan çalışmalarda elektrokimyasal ve floresans dedektör yoğun olarak kullanılmıştır.

Dixit ve arkadaşları [3], insan idrarında, spesifik ve duyarlı bir kalitatif ve kantitatif ekstraksiyon prosedürü ile katekolaminlerin ve metabolitlerinin tayini için elektrokimyasal dedektörün kullanıldığı bir yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. Silikajel içeren katı faz ekstraksiyon kolonlar kullanılarak sözkonusu bileşikler, idrardaki bileşenlerden seçici olarak izole edilmiştir. Üç farklı ekstraksiyon prosedürünün uygulanmasının ardından, elektrokimyasal dedektörle serbest katekolaminler (noradrenalin, adrenalın, dopamin), bunların bazik metabolitleri (normetanefrin, metanefrin ve 3-metoksidopamin) ve asidik metabolitleri (vanililmandelik asit, homovanilik asit ve 5-hidroksiindolasetikasit) ayrılmış ve miktarı tayin edilmiştir.

Ehrenström [6], ters faz iyon çifti HPLC sistem ve elektrokimyasal dedektör kullanarak küçük hacimli plazma numunelerinde katekolaminlerin analizini sağlayan bir yöntem geliştirmiştir. Hızlı isokratik ayırımların gerçekleştirilmesinde 3C18 3µm silika içeren 7.5cm x 4.6mm (iç çap) lik ters faz

kolonları kullanılmıştır. L-Dopa, dopac, noradrenalin, adrenalin ve DHBA (iç standart) ve dopamin 4 dakikadan daha az bir süre içinde ayrılmıştır. Üç farklı elektrokimyasal hücrenin performansı, hidrodinamik voltammogramları kullanılarak bant genişleme etkisi, doğrusallık ve saptama sınırı açısından karşılaştırılmıştır. Alumina ile ekstraksiyonun kullanıldığı numune hazırlama prosedürü, geri kazanımı artırmak ve seyreltme faktörünü azaltmak için modifiye edilmiştir. Modifiye karbon pasta hücre (CP-O), daha önce bildirilen camı karbon (GC) hücreden 6-8 misli yüksek yanıt vermiştir. Saptama sınırı, her bir injeksiyonda, L-dopa için 80 pg, noradrenalin için 1.25 pg, adrenalin için 1.25 pg, DHBA için 0.4 pg, Dopac için 1.25 pg ve dopamin için 0.6 pg dır. Dinlenme, stress ve eksersiz koşullarında fare ve balıklardan alınan plazma numunelerindeki uygulama bildirilmiştir. Katekolaminlerden başka, diğer parametrelerin analizinde de kullanılacak yöntem, aynı hayvandan bir günde birkaç defa alınan küçük hacimli plazma numunelerinde (<500 µl) katekolaminlerin tayinine olanak sağlar.

Kumar ve arkadaşları [7], idrardaki serbest katekolaminlerin tayini için basitleştirilmiş bir HPLC tayini tarif etmektedirler. Katekolaminlerin (noradrenalin, adrenalin ve dopamin) idrardan ekstraksiyonu için prosedür, Biorex-70 kolonların kullanımını kapsamaktadır. Ekstre edilen katekolaminler, C18, 5 µ ters faz kolon kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografi ile ayrılmış ve elektrokimyasal dedektör kullanılarak saptanmıştır. İntegrasyon ve hesaplamalar, iç standart olarak dihidroksibenzilaminin ile alan oranı yöntemi kullanılarak sağlanmıştır. Her bir katekolamin için %90 dan daha yüksek bir geri kazanıma ulaşılmıştır. İç standarda göre hesaplanan amin alan oranı ile geniş bir derişim aralığı arasında doğrusal bir ilişki gözlenmiştir. Yöntemin hızlı ve basit olduğu ve çeşitli psikiyatrik hastalıklarda katekolaminlerin rolü ile ilgili çalışmalarda kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır.

Bryan ve O'Donnel [8], elektrokimyasal dedektörün kullanıldığı yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile yaptıkları çalışmada, fizyolojik tuz çözeltilerinde isoprenalin ve onun metaboliti 3-O-metilisoprenalinin, duyarlı, basit ve hızlı analizini sağlamışlardır. Tayin işlemlerinde, numunenin temizleme ön işlemleri ve ekstraksiyonu için zaman alıcı prosedürlere gerek yoktur ve Nova-

Pak C18 kolon, isokratik hareketli faz ve amperometrik dedektör kullanılmıştır. Ayrıca, hareketli fazın bileşimindeki küçük değişikliklerin, noradrenalin ve adrenalinin ve onların O-metil ve O-metil deamine türevlerinin (normetanefrin, metanefrin, 3-metoksi-4-hidroksifeniletilen glikol ve 3-metoksi-4-hidroksimandelik asit) in duyarlı tayinleri için olanak sağlamıştır. Bu HPLC tayini, dokulardaki monoamin oksidaz ve katekol-0-metiltransferaz ile katekolaminlerin ardışık metabolizasyonunun ve geri alınımının incelenmesi ile ilgili in vitro çalışmalar, metabolitlerin kolon kromatografik ayrılması, ve [³H]aminlerin yerdeğiştirme biçiminde kullanımları için yeterince duyarlı ve hızlı olduğu bildirilmektedir.

Yang ve arkadaşları [9], elektrokimyasal dedektörlü ters faz iyon çifti yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemini kullanarak 14 tane katekolamin ve onların metabolitlerinin beyin dokusu ve beyin-omurilik sıvısında aynı anda tayini için basit bir yöntem geliştirmişlerdir. Tüm bileşiklerin ayrılması ve analizi için gerekli zaman 35 dakikadan daha azdır. Miktar tayini, iç standart olarak isoproterenol kullanımına dayanmaktadır. Hareketli faz, 0,1 M formikasit ve sodyum-1-oktan sulfonik asit içeren asetonitril karışımından (91:9 h/h) oluşmaktadır. Bu yöntemin kullanımı ile beyin dokusundaki nörotransmitterlerin analizi, ön işlemler uygulamadan sağlanabilir.

Musso ve arkadaşları [10], insan plazmasındaki konjuge haldeki katekolamin düzeylerinin elektrokimyasal dedektörlü HPLC analizini tarif etmektedirler. Bu yöntemle, serbest katekolamin miktarı çıkarılmaksızın konjugate katekolamin düzeyleri doğrudan bulunabilir. Tayin işlemi, serbest katekolaminlerinin ekstrasyonlarından sonra kalan artık supernatan kullanılarak yapılır. Elde edilen sonuçlar, klasik enzimatik yöntem ve asit-ısı hidroliz yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma yöntemleri, serbest ve konjuge katekolamin derişimlerinin toplamına cevap vermektedir. Bu yöntemle çok iyi tekrar edilebilirlik sağlanmıştır (fizyolojik aralıkta gün içi günler arası varyasyon katsayısı %8 den küçüktür) ve seçicilik her bir ekstrede dekonjuge katekolamin başına <20 pg dan azdır. Yöntem, bir çalışma gününde, plazmadaki serbest ve konjuge katekolaminlerin ucuz maliyetle 30 kez tayinine olanak sağlamaktadır.

Tüdos ve arkadaşları [11], sıvı kromatografide saptama için Nafion kaplı elektrotların performansını optimize eden bir çalışma yapmışlardır. Hareketli faz bileşiminin ve film kalınlığının, katekolaminlerin saptamasının seçiciliği üzerine etkisi incelenmiştir. Kaplanmış elektrotların stabilitesi ve yanıtı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan, nafion kaplanmış elektrotların HPLC deki optimum kullanımı için genel prosedürler formüle edilmiştir. Nafion kaplı elektrot ile seçicilikte meydana gelen artış idrar numunelerinin analizi ile gösterilmiştir.

Halbrügge ve arkadaşları [12], insan plazmasında noradrenalin, adrenalin, dopamin ve dihidroksifeniletillen glikol (DOPEG) tayini için elektrokimyasal saptama yardımıyla kullanılan bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmiş ve % 70 in üzerinde analitik geri kazanım sağlamışlardır. Graded orthostasis ve mental stres durumlarının katekolaminlerin plazma düzeylerine etkisini ortaya koymak üzere bu yöntem kullanılmıştır. Orthostatisde, plazmadaki noradrenalin ve DOPEG düzeyinin yükseldiğini, fakat adrenalin ve dopaminin seviyesinin değişmediği saptanmıştır. Noradrenalin ve DOPEG artışı orthostasis düzeyi ile yakın ilişkili bulunmuştur. Desipramin ile ön işlem uygulanması, süren DOPEG yanıtını ortadan kaldırmıştır. Bu durum, plazma DOPEG düzeyinde orthostatis indüklü artışın presinaptik orjinli olduğunu göstermektedir. Mental stress ise, plazma adrenalin düzeyinde belirgin bir artış, plazma noradrenalin düzeyinde daha az belirgin bir artış sağlamıştır. Plazma noradrenalin ve DOPEG düzeyinin aynı anda ölçülmesinin, sempatik sinir sisteminin çeşitli aktivite tipleri arasındaki farklanmaların aydınlatılmasına yardımcı olabileceği öne sürülmektedir.

Kyoung ve arkadaşları [13], insan idrar ve plazmasındaki katekolaminlerin, prekürsörlerinin ve metabolitlerinin (noradrenalin, adrenalin, dopamin, normetanefrin, metanefrin, 3-metoksitiramin ve L-DOPA), asidik bileşiklerin (3,4-dihidroksifenilasetik asit, vanililmandelik asit ve homovanilik asit) ve alkolik bileşiklerin (4-hidroksi-3-metoksifeniletillen glikol) tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. İsoproterenol ve 3,4-dihidroksifenilpropanoik asitin iç standart olarak kullanıldığı ve bunları içeren perklorik asit ile deproteinize edilen idrar ve plazma numunelerinin, kuvvetli kation değiştirici reçine içeren kartuşlarda katı faz ekstraksiyona tabi

tutularak amin ve asit-alkol fraksiyonlarına ayrılmaları sağlanmıştır. Her bir fraksiyondaki bileşikler, TSK gel ODS-80 T_M kolonlarda isokratik elüsyon ile iyon çifti ters faz kromatografi uygulayarak ayrılmış ve meso-1,2-difeniletilediaminin kullanıldığı floresans reaksiyonu takiben periyodat oksidasyon ile kolon içi türevlendirmeleri sağlanmıştır. Sinyal/gürültü oranı 5 kabul edildiğinde, bileşiğe bağlı olarak saptama sınırı 0.5 ile 95 pmol/ml değerleri arasında değişmektedir.

Said ve arkadaşları [15], idrardaki serbest katekolaminlerin (noradrenalin, adrenalin ve dopamin) rutin tayini için tümüyle otomatik ve güvenilir bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi tarif etmektedirler. Katekolaminler küçük alumina kolonlar kullanılarak idrardan izole edilmiştir. Ekstraksiyon basamağından önce idrarın pH değerinin ayarlanması için standart otomatize bir yöntem geliştirilmiştir. Ekstraksiyon, ASPEC (ekstraksiyon kolonları ile otomatik numune hazırlama) ile sağlanmıştır. Bir ayırma tüpünde toplanmış olan eluat, kromatografik kolona otomatik olarak injekte edilmiştir. Katekolaminler, ters faz iyon çifti sıvı kromatografi ile ayrılmış ve floresans dedektör yardımıyla miktarları bulunmuştur. Ekstraksiyon ve ayırma işlemleri sırasında, el ile hazırlama ile ilgili hiç bir basamağa gerek duyulmamaktadır. Bir numunenin analizi, 15 dk sürmekte, 24 saat içinde 96 numune çalışılabilmektedir. Her üç katekolamin için analitik geri kazanım % 63-87 arasındadır. İdrar için oldukça uygun olan saptama sınırları, noradrenalin için 0.01 µM, adrenalin için 0.01 µM ve dopamin için 0.03 µM olarak bildirilmektedir. Günler arası varyasyon katsayısı % 10 nun altında bulunmuştur.

Boomsma ve arkadaşları [16], plazma ve idrardaki serbest katekolaminlerin ve epininin aynı anda tayini için duyarlı ve güvenilir bir yöntem tarif etmektedirler. Bu bileşikler, idrar ve plazmadan özel bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu işlemi ile izole edilmiş, seçici bir florenjenik reaktif olan 1,2-difeniletilediamin ile türevlendirilmiş ve florimetrik dedektörün kullanıldığı gradient elüsyonlu yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile tayin edilmişlerdir. Türevlendirilmiş katekolaminler ve epinin için saptama sınırı, her bir enjeksiyon için 0.3-0.6 pg dır. Doğruluk ve doğrusallık açısından dört bileşik için gün-içi ve günler-arası varyasyon katsayısı % 1-8 dolayında bulunmuştur.

Aynı prensiple, plazma ve idrardaki toplam dopamin ve epinin tayini için bir yöntem tarif edilmektedir. 95 °C deki asit hidrolizi ile sağlanan dekonjugasyonu kapsayan bu yöntem, iyi bir duyarlık ve tekrar edilebilirlik vermiştir.

Moleman ve Dijk [17], çözücü ekstraksiyonu, floresans türevlendirme ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanarak noradrenalin ve adrenalini tayin etmişlerdir. 100 µl hacimdeki idrar numunesi ekstre edilmiş, ardından 1,2-difeniletildiamin ile inkübe edilmiştir. Bundan sonra karışımın 100 µl si, ters faz kolona injekte edilmiş ve noradrenalin ve adrenalin florimetrik olarak saptanmıştır. Her iki analitin normal ve yüksek derişimleri için, gün-içi varyasyon katsayısı % 3-4 ve günler arası varyasyon katsayısı % 3.4-7.1 dir. Düşük derişimlerde (15-40 nmol/L) varyasyon katsayıları yukarıdaki sıraya göre % 4.2-6.8 ve % 6.8-9.2 bulunmuştur. Saptama sınırı, her bir analit için 0.4 nmol/L nin altında bulunmuştur. Ekstraksiyon, türevlendirme ve kromatografi için kritik basamaklar tartışılmıştır. Önerilen yöntem, yüksek kesinlik, duyarlık ve spesifiklik sunmaktadır.

Tsuchiya ve Hayashi [18], biyolojik numunelerdeki katekolaminlerin tayini için prosedürü basitleştirmek ve seçiciliği ve geri kazanım oranını artırmak amacıyla ön saflaştırmayı kapsayan bir prosedür üzerinde çalışmışlardır. Prosedür, katekolamin-borat kompleksinin sıvı/sıvı ekstraksiyonu temeline dayanmaktadır. Optimal koşullarda, alkali NH₄Cl/NH₄OH tamponunda difenilborat ile kompleks oluşturan katekolaminler n-heptanol ile ekstre edilmişlerdir. Katekolaminler, daha sonra HCl'li asidik çözeltiye tekrar ekstre edilmiş ve florimetrik deteksiyonlu ters-faz iyon-çifti yüksek-performanslı sıvı kromatografisi ile ayrılmıştır. Sıçanın çeşitli dokularına ve insan idrarına yöntemin uygulanması ile prosedürün basitliği, yüksek seçiciliği ve yüksek geri kazanımı (% 90 ve üzerinde) gösterilmiştir.

Higashidate ve Imai [28], plazma katekolaminlerinin noradrenalin, adrenalin ve dopamin tayini için oldukça duyarlı bir yöntem tarif etmektedirler. 3,4-dihidroksibenzil aminin iç standart olarak kullanıldığı yöntemde, alumina ile katekolaminlerin plazmadan ekstraksiyonu, ters faz kolonda ayırma ve kolon içinde etilen diamin ile florojenik türevlendirme ve kolon sonrası peroksilat kemiluminesans reaksiyonu ile saptamayı kapsayan basamakları içermektedir. Peroksilat kemiluminesans reaksiyonu, bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyl-

oksikarbonil)fenil]oksalat (TDPO) ve hidrojen peroksit ile sağlanmaktadır. Oldukça duyarlı deteksiyonlar elde etmek amacıyla yüksek performanslı sıvı kromatografisindeki reaksiyon koşullarını optimize etmek için değişen reaktif kompozisyonunun kemiluminesans verimine etkisi incelenmiştir. Optimize koşulların, 50 mM potasyum asetat (pH 3.20), 50 mM potasyum fosfat (pH 3.20) ve 1 mM sodyum heksan sulfonat içeren asetonitril (90.15:4.85:3, h/h/h) den oluşan hareketli faz ve 0.5 ml/dk akış hızı ile ilgili olduğu bildirilmektedir. Florejenik reaktif çözeltisi, asetonitril-etanol (90:10, h/h) içerisinde 105 mM etilendiamin ve 175 mM imidazol hazırlanması ile elde edilmektedir ve bunun akış hızı 0.25 ml/dk'dır. Reaksiyon kabı 80 °C ye ısıtılmaktadır. Kemiluminojenik reaktif çözeltisi, dioksan-etilasetatda (50:50, h/h) hazırlanmış 0.25 mM TDPO, 150 mM hidrojen peroksit ve 110 mM trifloroasetik asitten oluşmaktadır ve bunun akış hızı ise 1.4 ml/dk'dır. Her bir katekolamin için saptama sınırı, (sinyal gürültü oranı 2 için) 1 femtomol bulunmuştur. Sıçan plazmasına 2.5 nM miktarda katılan noradrenalin, adrenalin ve dopaminin tayini için, yöntemin standart sapması sırasıyla % 3, % 3 ve % 4'dür. Önerilen yöntemle ölçülen sıçan plazma katekolaminlerinin derişimleri, noradrenalin, adrenalin ve dopamin için sırasıyla 1.21, 0.12 ve 0.63 pmol/ml'dir.

Krause ve arkadaşları [14], kompleks matrikslerde çeşitli proteinojenik ve fizyolojik aminoasitlerin ve biyojenik aminlerin dabsil türevlerinin aynı anda ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayinin tarif etmektedirler. Pik alanı ile derişim arasındaki doğrusal ilişki 1.25 pmol ile 1250 pmol arasında gözlenmiş ve saptama sınırı ise 0.12 ve 0.52 pmol arasında bulunmuştur. Ortalama tekrar edilebilirlik aralığı % 1.3 ile 3.1, geri kazanım ise % 98 ve 104 arasında bulunmuştur. Otomatik türevlendirme/enjeksiyon ünitesi yöntemin performansını artırmıştır. Ayırma verimliliğini optimize etmek için trietilaminin çok etkin bir aditif olduğu bulunmuştur. Yöntem, protein hidrolizatlarından sağlanan aminoasitlerin analizinde, biyolojik numunelerdeki biyojenik aminlerin analizinde ve yiyeceklerin analizinde başarıyla uygulanmıştır. Aynı anda 40 ve üzerindeki sayıda bileşik ayrılabilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

Adrenalin bitartarat, noradrenalin bitartarat, dopamin hidroklorür, alumina, sodyum heptan sulfonat, Sigma, 3,4-dihidroksi benzilamin ise Aldrich firmasından sağlanmıştır.

Sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), etilen diamin tetraasetik asit disodyum tuzu (Na_2 EDTA), perklorik asit (HClO_4), sodyum metabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), hidroklorik asit ve gradient grade metanol Merck firmasının ürünüdür.

Bidistile su laboratuvarımızda hazırlanmıştır.

3.2. Aletler

Hepsi Shimadzu firmasının ürünü olan LC 10AT Liquid Chromatograph ile bağlantılı olan LCV-10AL VP gradient donanımlı pompa, RF-10A XL floresan dedektör, CBM-10A communication bus module, 20 μl hacimli loop cihazları ile yapılan çalışmalar, Pentium 75 işletim sistemli, Accura bilgisayar bağlantılı Class LC10A programı altında çalışan veri işletim sisteminde değerlendirilmiştir.

280 nm eksitasyon ve 320 nm emisyon dalga boyunda çalışılmıştır.

Ayrırma ve miktar tayini işlemlerinde Luna 3 μ tanecik çapında C_{18} 150x3.00 mm Phenomenex marka kolon kullanılmıştır. Akış hızı 0.5 ml/ dk dır.

Homojenizasyon, Potter S model B.Braun International marka homojenizatör ile, vorteks işlemleri Nuvemix marka vorteks ile yapılmıştır. Çözeltilerin pH değerlerinin belirlenmesi, cam elektrotlu Elektro.mag M822 pH metre ve santrifüj işlemleri Janetzki T5 santrifüj ile sağlanmıştır.

3.3. Hareketli faz

0.075 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.006 M sodyum heptan sulfonat ve 0.00015 M Na_2EDTA ile pH 3.96 olan tampon çözelti hazırlandıktan sonra tampon-metanol

oranı 32:18 olacak şekilde birinci kısım hareketli faz hazırlanmıştır. Bu hareketli fazdan 100 ml alınarak 250 ml ye su ile seyreltilmiştir. Bu amaçla kullanılan hareketli faz bileşimi 0.030 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.4×10^{-3} M sodyum heptansulfonat, 6.0×10^{-5} M Na_2EDTA ve % 7.2 metanol (h/h)' e karşılık gelmektedir ve pH 4.11 olarak ölçülmüştür. Bu şekilde hazırlanan hareketli faz bileşiminde ayırma ve miktar tayini deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Günlük çalışmalarda deneylere başlamadan önce kolon % 70 lik metanol ile 2 saat yıkandıktan sonra tarif edilen hareketli faz ile 1 saat daha yıkanarak kolonun koşullanması sağlanmıştır.

Doku ile yapılan çalışmalarda, tekrar edilebilirliğin sağlanması için gradient koşullarda bir yıkama programı kullanılmıştır. Bunun için, A çözücü sistemi hareketli faz, B çözücü sistemi metanol (% 70, h/h) olmak üzere, analizin 12 dakika içinde sona ermesinin ardından doğrusal gradient kontrollü software ile

Süre (dk)	: 12	14	20	22	25
Çözücü B (%)	: 100	100	100	0	gradient yıkama sonu

25 dk dan sonra ilave olarak 30 dk daha hareketli faz ile yıkama yapıldığında dokularda tekrar edilebilir sonuçlara ulaşılmıştır.

3.4. Standart çözeltiler

9.4 mg noradrenalin bitartarat, 6.6 mg adrenalin bitartarat ve 4.8 mg dopamin hidroklorür 25 ml lik balon jodelere alınarak bir miktar 0.1 M HClO_4 ile çözüldükten sonra 0.1 M HClO_4 ile 25 ml ye tamamlanmıştır. 3,4-dihidroksi benzilamin (iç standart) ise 7.9 mg tartılarak 25 ml lik bir balon jodeye alınarak bir miktar 0.1 M HClO_4 ile çözüldükten sonra 0.1 M HClO_4 ile 25 ml ye tamamlanmıştır. İç standart tüm deneyler boyunca 7.18×10^{-8} M derişimde kullanılmıştır. Gerekli seyreltmeler sözedilen stok standartlar ve 0.1 M HClO_4 çözeltileri kullanarak yapılmıştır. Standart stok çözeltiler alüminyum folia ile kuşatılarak buzdolabında $+4^\circ\text{C}$ de saklanmıştır.

3.5. Beyin dokusu numunelerinin hazırlanması

Deney hayvanı olarak Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanmış olan 12 adet 200-250 g ağırlığında Spraque-Dawley erkek sıçan, 1.5 g kg^{-1} üretan ile intraperitoneal enjeksiyon ile anestezide tabii tutulduktan sonra servikal dislokasyon (medulla spinalis harabiyeti) ile öldürülmüştür. Beyin dokuları hızla çıkarıldıktan sonra $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ de derin dondurucuda deney yapılacağı zamana kadar bekletilmiş ve deney yapılacağı sırada derin dondurucudan alınarak çözünme anına kadar beklenmiş, ağırlıkları tam olarak belirlenmiş ve 10 ml 0.4 M HClO_4 ile homojenize edilmiştir. 3000 x g de 10 dk santrifüj edildikten sonra supernatan kısmının tamamı, beyin dokusu homojenatı olarak ekstraksiyon için kullanılmıştır.

3.6 Asidik Alumina Hazırlanması

Asidik alumina literatürden yararlanılarak hazırlanmıştır [29]. Bunun için uygulanan işlemler şöyledir: 100 g alumina 1000 mL lik bir beherde 500 ml 2 N HCl ile karıştırılır. Üzerine bir saat camı örtülerek $90-100 \text{ }^\circ\text{C}$ de 45 dk hızlı ve devamlı karıştırılarak ısıtılır. Alumina taneciklerinin çökmesi için 1.5 dk beklenir. Supernatan atılır. Alumina çökeltisi, $70 \text{ }^\circ\text{C}$ de iki defa 250 mL 2 N HCl çözeltisi ile 10 dk yıkanır. Supernatan her seferinde atılır. Daha sonra $50 \text{ }^\circ\text{C}$ de, 500 ml 2 N HCl ile 10 dk yıkanır. HCl aktarılır ve alumina çökeltisi 200 ml distile su ile 20-25 defa yıkanır. Yıkama suyunun pH sın 3.4 olduğu gözlenmelidir. Bu şekilde hazırlanmış olan asidik alumina bir kurutma tabağına alınır. $120 \text{ }^\circ\text{C}$ de 1 saat, $200 \text{ }^\circ\text{C}$ de 2 saat etüvde bekletilir. Daha sonra $37 \text{ }^\circ\text{C}$ deki etüvde kuru tutulur.

3.7 Katekolaminlerin sıçan beyin dokusundan ekstraksiyonu

Eksraksiyon yöntemi literatürden yararlanılarak uygulanmıştır [29]. Buna göre, beyin dokusu homojenatının tamamı 25 ml lik bir balon jojeye aktarılır ve 0.4 M HClO_4 ile 25 ml ye tamamlanır. Homojen hale getirildikten sonra 50 ml lik bir beherde 400 mg asidik alumina, 200 mg Na_2EDTA ve 10 mg sodyum

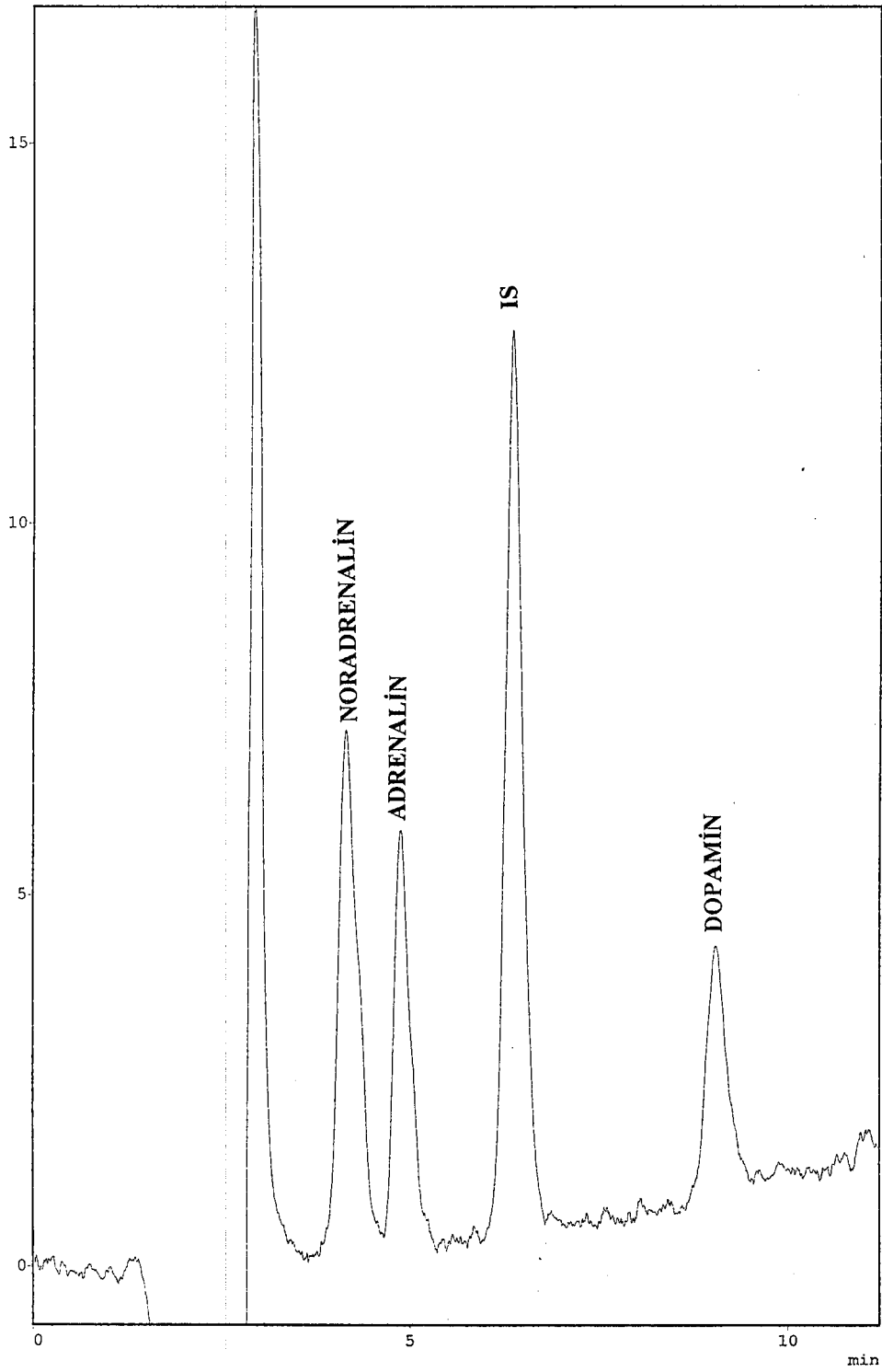
metabisulfit içeren karışım üzerine dökülür ve bir magnetik karıştıracı yardımıyla homojen hale getirilir. Karıştırmaya devam edilerek bir pH metre yardımıyla 1 M NaOH kullanılarak zltnin pH sı 8.60 yapılır ve 5 dk daha karıştıılır. Alumina taneciklerinin kmesi gözlendikten sonra supernatan atılır. Alumina keltisi dört defa 10 ml distile su ile yıkanır. Supernatanlar atılır. Alumina keltisi 5 ml 7.18×10^{-8} M iç standart içeren 0.05 M HClO₄ zltisi ile 15 dk vorteks yardımıyla karıştıılır. Supernatan alınır ve 3000 x g de 10 dk santrifuj edildikten sonra HPLC ye injekte edilir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, yüksek ayırma gücü, seçiciliği ve düşük saptama limiti gibi özelliklerinden dolayı çok çeşitli analizler için yaygın olarak kullanılan bir ayırma tekniğidir. Günümüzde HPLC cihazının bulunmadığı bir biyolojik analiz laboratuvarının düşünülmesi olanaksızdır. Ancak biyolojik numunelerin analizinden önce ön işlem uygulanması ve kullanılan hareketli faz sistemlerinin yüksek saflıkta olması zorunluğunun yanısıra çözücülerin maliyetinin yüksek olması yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır.

DeneySEL çalışmaya başlamadan önce, literatür araştırması yapılarak laboratuvarımız koşullarında gerçekleştirebilecek tayin yöntemleri gözden geçirilmiştir. R. Said ve arkadaşlarının tarif ettiği çalışmada [15] kullanılan dedektör ve hareketli faz bileşiminin sağladığı seçicilik ve süre açısından katekolamin analizi için bir başlangıç noktası olabileceği düşünülmüş ve aynı hareketli faz bileşimi hazırlanarak ön deneyler gerçekleştirilmiştir. Ancak sözkonusu koşullarda katekolamin pikleri belirmiş, ayrılma sağlanamamıştır. Hareketli faz bileşiminin modifiye edilmesi koşulları araştırılmış ve su ile çeşitli oranlarda yapılan seyreltmeler sonucunda en uygun hareketli faz bileşiminin 0.030 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.4×10^{-3} M sodyum heptansulfonat, 6.0×10^{-5} M Na_2EDTA ve % 7.2 metanol (pH 4.11) ile hazırlanan çözelti olduğu bulunmuştur. Bu koşullarda noradrenalin (NA) 4.3 dk, adrenalin (A) 5.0 dk, 3,4-dihidroksibenzilamin (iç standart, IS) 6.7 dk ve dopamin (D) 10.0 dk dolayında pikler vermektedirler (Şekil 4.1).

Ayrılmanın sağlanmasının ardından, kullanılan hareketli faz koşullarında yöntemin kesinliğini belirlemek için alıkonma zamanı ve alan tekrar edilebilirlikleri incelenmiştir. Bu amaçla, standart katekolamin çözeltileri üç gün boyunca 5 defa HPLC ye injekte edilerek elde edilen pikler değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonuçları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de verilmektedir.



Şekil 4.1 Katekolaminler için elde edilen orijinal HPLC kromatogramı (noradrenalin 5.9×10^{-8} M, adrenalin 3.9×10^{-8} M, IS 7.18×10^{-8} M ve dopamin 5.05×10^{-8} M)

Çizelge 4.1 Alıkonma zamanı tekrar edilebilirliği
(deney sayısı (n): 5; gün (k): 3, % RSD)

Madde	Ortalama alıkonma zamanı (dk)	Gün içi tekrar edilebilirlik	Günler arası tekrar edilebilirlik
NA (5.90×10^{-8} M)	4.291	0.8854	4.4016
A (3.96×10^{-8} M)	4.979	1.3722	3.6956
IS (7.18×10^{-8} M)	6.702	0.5172	7.1352
D (5.05×10^{-8} M)	9.973	0.7779	8.0512

Çizelge 4.1den görüldüğü gibi sözkonusu hareketli faz bileşimi ile elde edilen alıkonma zamanı değerleri gün içi tekrar edilebilirlik açısından oldukça küçük bağıl standart sapma (% RSD) vermiştir. Günler arası tekrar edilebilirlik % 3.6 ile 8.0 arasında değişmektedir.

Çizelge 4.2 Alan oranı (katekolamin alanı/ IS alanı) tekrar edilebilirliği
(n= 5, k=3, %RSD)

Madde	Ortalama alan oranı	Gün içi tekrar edilebilirlik	Günler arası tekrar edilebilirlik
NA	0.6478	1.4066	4.5274
A	0.4387	3.1922	3.9288
D	0.4031	4.4868	12.0456

Çizelge 4.2 de katekolaminler için elde edilen pik alanları iç standart için elde edilen pik alanına oranlanarak değerlendirilmiş ve tekrar edilebilirlik incelenmiştir. Yapılan değerlendirmelere göre gün içi tekrar edilebilirlik %1.41-4.48 arasında günler arası tekrar edilebilirlik ise % 3.93-12.0 arasında değişmektedir.

Düzeltilmiş alan oranının tekrar edilebilirliğe etkisi incelendiğinde Çizelge 4.3 de gösterilen sonuçlara ulaşılmıştır. Düzeltilmiş alan değerleri; pik alanının, alıkonma zamanına bölünmesine karşılık gelmektedir. Daha sonra katekolaminlerin düzeltilmiş alanları iç standardın düzeltilmiş alanına bölünerek düzeltilmiş alan oranları oluşturulmuştur.

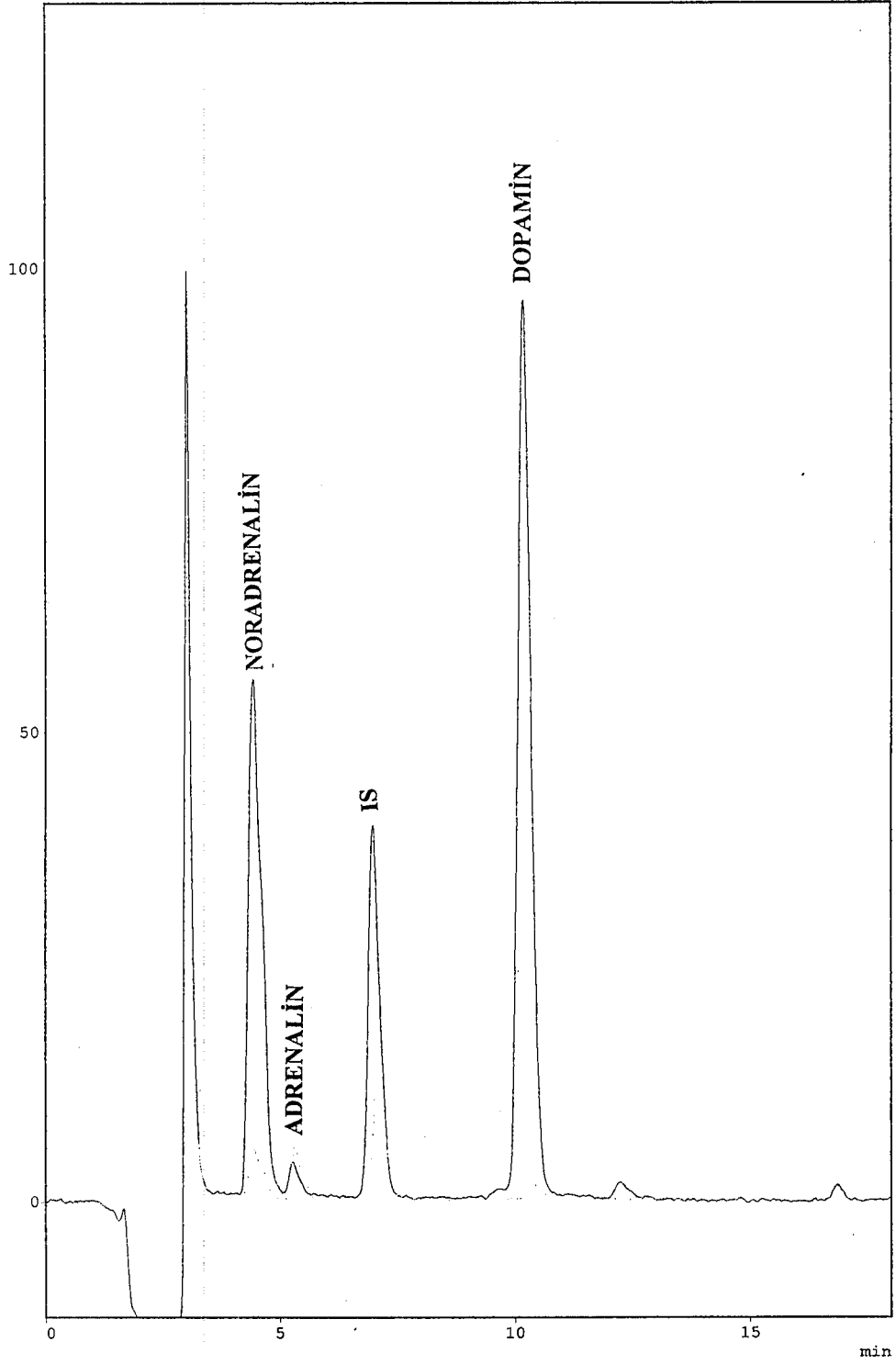
Çizelge 4.3 Düzeltilmiş alan oranı tekrar edilebilirliği (n= 5, k=3, %RSD)

Madde	Ortalama Düzeltilmiş alan Oranı	Gün içi tekrar edilebilirlik	Günler arası tekrar edilebilirlik
NA	1.0219	2.7192	6.7386
A	0.5685	1.9481	4.0924
D	0.2918	2.6173	5.7084

Çizelge 4.3 de görüldüğü gibi gün içi tekrar edilebilirlik % 1.9-2.7 arasında, günler arası tekrar edilebilirlik % 4.1-6.7 arasında değişmektedir. Çizelge 4.2 ye göre günler arası tekrar edilebilirliğin yüksek bulunması hareketli faz bileşimine bağlı olabilir. Günler arası koşullarda alıkonma zamanlarında günler arası koşullarda gözlenen farklılıklar nedeniyle bundan sonraki değerlendirmelerde düzeltilmiş alan oranlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1. Yöntemin Seçiciliği

Standart katekolamin çözeltileri ile ayrılma ve tekrar edilebilirlik koşullarının sağlanmasının ardından, yöntemin seçiciliğinin incelenmesine geçilmiştir. Deneysel kısımda tarif edilen şekilde hazırlanan bir sıçan beyin dokusu homojenatı, ekstre edildikten sonra HPLC ye injekte edildiğinde elde edilen pikler Şekil 4.2 de verilmektedir. Aynı koşullarda standart katekolamin çözeltisi ile kaydedilen pikler ile karşılaştırıldığında beyin dokusu ekstresinin standart katekolaminlerle aynı alıkonma zamanlarında pikler verdiği ve girişime neden olacak yabancı pikler taşımadığı gözlenmiştir ve yöntemden beklenen seçiciliğin sağlandığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.2 Seçiciliğin gösterilmesi için kaydedilen beyin dokusu homojenatı ekstresinin HPLC kromatogramı

4.2. Doğrusallık Aralığının İncelenmesi

Doğrusallık aralığının incelenmesi için, noradrenalin 2.34×10^{-8} – 1.18×10^{-6} M , adrenalin 1.57×10^{-8} – 7.92×10^{-7} M ve dopamin 4.99×10^{-8} – 3.03×10^{-6} M derişim aralığında çalışılmıştır. Toplam yedi derişim düzeyi için elde edilen piklerin düzeltilmiş alan oranlarının değerlendirilmesi sonucunda elde edilen kalibrasyon eşitlikleri Çizelge 4.4 de görülmektedir.

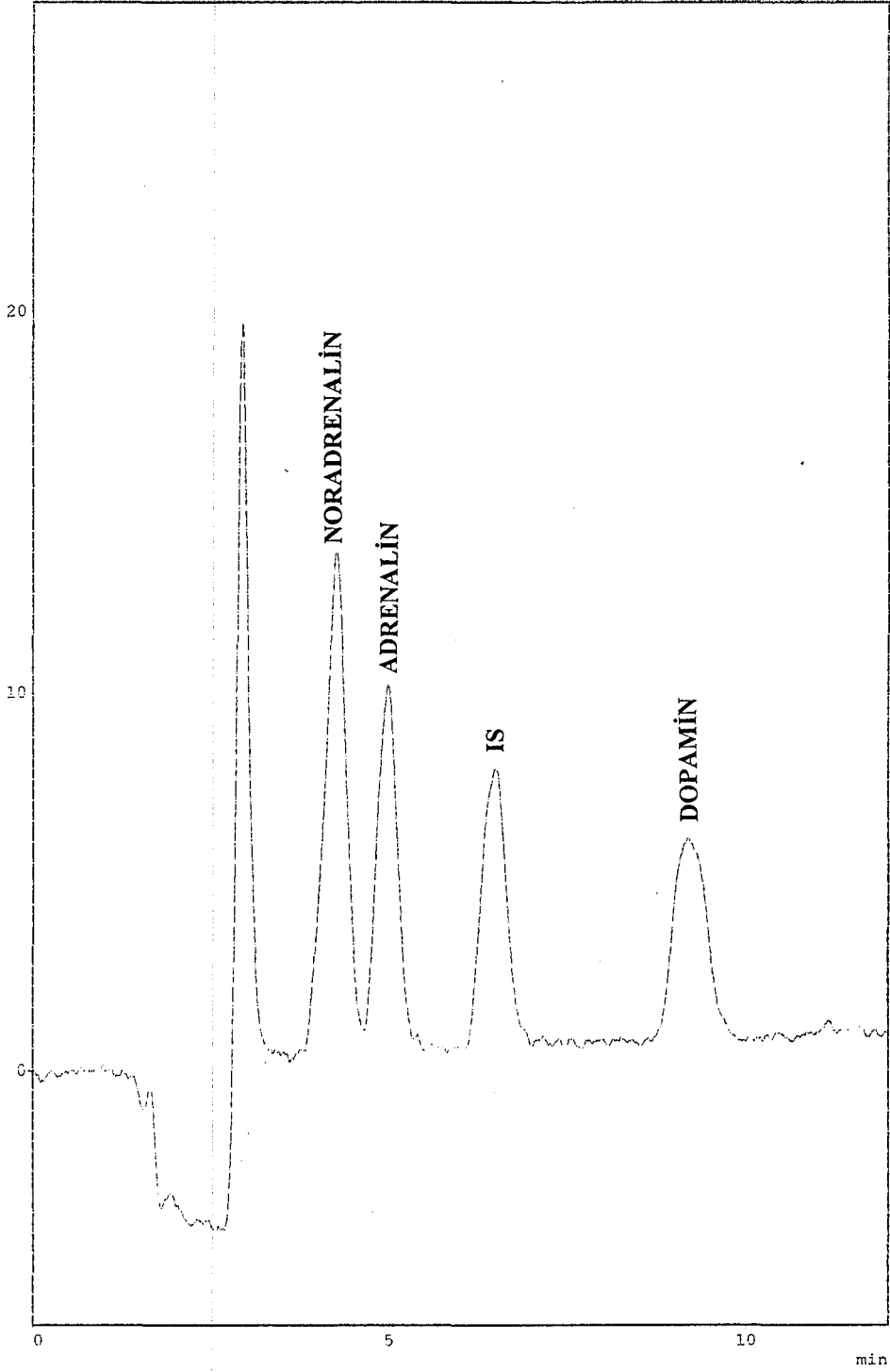
Çizelge 4.4 Katekolaminlerin kalibrasyon eşitlikleri

Regresyon Parametresi	NA	A	D
Eğim	14783587.58	13547402.38	4657430.78
Kesim	5.24×10^{-3}	-0.027	-0.0135
Korelasyon katsayısı	0.9999	0.9999	0.9999

Çizelge 4.4 den görüldüğü gibi belirtilen derişim aralığının tamamında yüksek korelasyonlu kalibrasyon eşitlikleri elde edilmiştir.

4.3. Geri Kazanım Oranının Belirlenmesi

Doğrusallık, geniş bir derişim aralığında yüksek korelasyonlu kalibrasyon eşitlikleri ile elde edildikten sonra, standart katekolamin çözeltilerine ekstraksiyon yöntemini uygulayarak % geri kazanım değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Altı farklı derişim düzeyinde standart katekolamin çözeltileri deneysel kısımda tarif edilen şekilde ekstre edilerek HPLC cihazına injekte edilmiştir. Ekstrakte edilen bir standart çözeltinin HPLC kromatogramı Şekil 4.3 te verilmektedir ve bu deneylerle elde edilen katekolamin piklerinin standart çözeltinin doğrudan injekte edilmesi koşullarında elde edilen piklerle aynı karakteristiklere sahip olduğu gözlenmiştir. Katılan katekolamin derişimleri için elde edilen düzeltilmiş alan oranları değerleri, ilgili katekolaminlerin kendi kalibrasyon eşitliğinde çözülerek bulunan katekolamin değerleri hesaplanmış ve katılan miktar ile oranlanarak % geri kazanım değerlerine ulaşılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.5 4.6 ve 4.7 de verilmektedir.



Şekil 4.3 Geri kazanım deneyleri sırasında standart katekolamin çözeltilerinin ekstraksiyonu ile elde edilen HPLC kromatogramı (Katılan katekolamin miktarları: Noradrenalin 1.18×10^{-7} M, adrenalin 3.16×10^{-7} M, IS 7.18×10^{-8} M ve dopamin 2.02×10^{-7} M)

Çizelge 4.5 Noradrenalinin geri kazanım değerleri

Katılan Noradrenalin (M)	Bulunan Noradrenalin (M)	% geri kazanım
2.35×10^{-8}	1.69×10^{-8}	71.91
4.71×10^{-8}	3.46×10^{-8}	73.46
1.18×10^{-7}	8.58×10^{-8}	72.71
2.35×10^{-7}	1.63×10^{-7}	69.36
4.71×10^{-7}	3.57×10^{-7}	75.79
9.42×10^{-7}	7.56×10^{-7}	80.25
Ortalama geri kazanım		73.91
Standart sapma		3.7436
Relatif standart sapma (%)		5.0649

Çizelge 4.6 Adrenalinin geri kazanım değerleri

Katılan Adrenalin (M)	Bulunan Adrenalin (M)	% geri kazanım
1.58×10^{-8}	1.20×10^{-8}	75.95
3.16×10^{-8}	2.21×10^{-8}	69.94
7.92×10^{-8}	5.71×10^{-8}	72.09
3.16×10^{-7}	2.26×10^{-7}	71.52
6.34×10^{-7}	4.57×10^{-7}	72.08
9.50×10^{-7}	7.69×10^{-7}	80.95
Ortalama geri kazanım		73.76
Standart sapma		4.0426
Relatif standart sapma (%)		5.4811

Çizelge 4.7 Dopamin geri kazanım değerleri

Katılan Dopamin (M)	Bulunan Dopamin (M)	% geri kazanım
2.02×10^{-8}	1.48×10^{-8}	73.27
4.05×10^{-8}	2.93×10^{-8}	72.34
2.02×10^{-7}	1.56×10^{-7}	77.23
4.05×10^{-7}	3.12×10^{-7}	77.04
8.10×10^{-7}	5.83×10^{-7}	71.97
1.21×10^{-6}	9.78×10^{-7}	80.82
Ortalama geri kazanım		75.46
Standart sapma		3.4948
Relatif standart sapma (%)		4.6322

Çizelge 4.5-4.7 de görüldüğü gibi, kullanılan yöntemle noradrenalin % 73.9, adrenalin % 73.8 ve dopamin % 75.4 geri kazanım sağlanmaktadır. Bulunan % geri kazanım değerleri, asidik alüminanın kullanıldığı ekstraksiyonları kapsayan çalışmaların sonuçları ile uyumludur [7,15,18].

Ekstraksiyon yönteminin uygulandığı derişimler ile bunlara karşılık gelen düzeltilmiş pik alanı değerleri arasındaki korelasyon değerlendirilerek doğrusallık araştırılmıştır ve her üç katekolamin için yüksek korelasyon katsayılı kalibrasyon eşitlikleri elde edilmiştir. Bu eşitlikler Çizelge 4.8 de verilmektedir.

Çizelge 4.8 Ekstraksiyon ile elde edilen kalibrasyon eşitlikleri

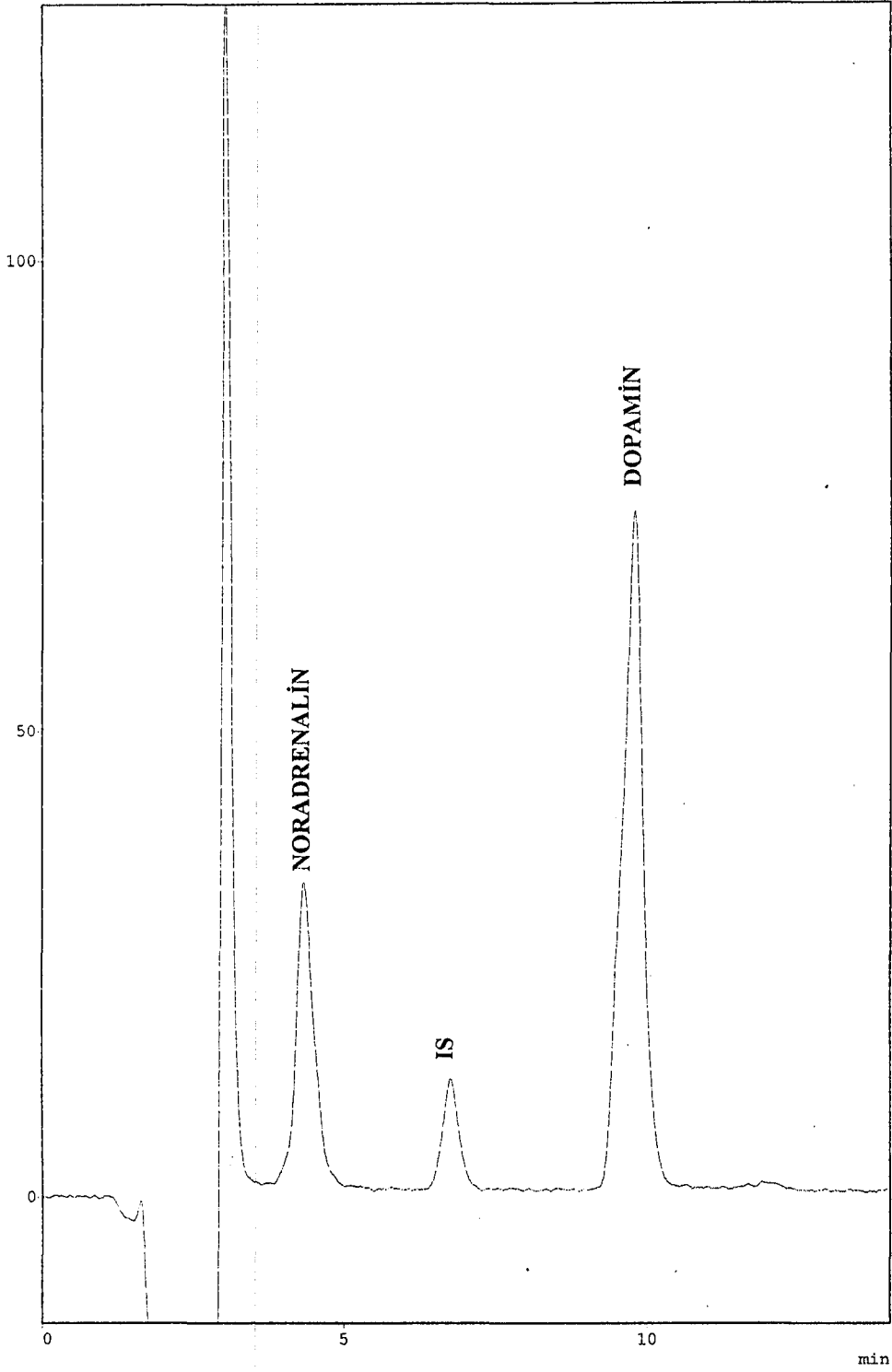
Regresyon Parametresi	Noradrenalin	Adrenalin	Dopamin
Eğim	11240183.42	9493482.383	3685025.558
Kesim	-0.0222	-0.0251	-0.0439
Korelasyon katsayısı	0.9999	0.9999	0.9999

4.4. Saptama Sınırı ve Tayin Sınırı

Sinyal/gürültü oranı (S/N) 3 kabul edilerek yöntemin saptama sınırı (Limit of Detection, LOD) noradrenalin, adrenalin ve dopamin için sırasıyla 6.7×10^{-9} M, 5.7×10^{-9} M ve 1.2×10^{-8} M hesaplanmıştır. En düşük tayin edilebilir miktarlar (Limit of Quantification, LOQ) ise noradrenalin, adrenalin ve dopamin sırasıyla 2.2×10^{-8} M, 1.9×10^{-8} M ve 3.9×10^{-8} M dir. Bu miktarlar karşılık gelen ng/ml değerlerine çevrildiğinde, noradrenalin, adrenalin ve dopamin için sırasıyla 2.1 ng/ml, 1.9 ng/ml ve 2.3 ng/ml lik saptama sınırına karşılık gelmektedir. En düşük tayin sınırı ise 7.0 ng/ml noradrenalin, 6.3 ng/ml adrenalin ve 7.4 ng/ml dopamine karşılık gelmektedir. Bulunan saptama sınırı ve tayin sınırı değerleri literatürde verilen değerlerden düşük bulunmuştur [15].

4.5. Beyin Dokusundaki Katekolaminlerin Miktar Tayini için Uygulama

Beyin dokusunda katekolaminlerin miktarının belirlenmesi için sekiz sıçan beyni deneysel kısımda tarif edildiği şekilde homojenize edildikten sonra ekstre



Şekil 4.4 Miktar tayini yapılan beyin dokusu homojenatının orjinal kromatogramı

edilerek HPLC cihazına injekte edilmiştir ve elde edilen kromatogram Şekil 4.4'de görülmektedir. Bu kromatogram, beyin dokusunda farklı HPLC prosedürlerinin kullanıldığı çalışmalarda verilen kromatogramlarla uyumludur [9,18]. Elde edilen piklerin düzeltilmiş alan oranı değerleri standart çözeltilerin ekstraksiyonu ile bulunan kalibrasyon eşitliğinde çözülmüş ve herbirine karşılık gelen molar derişimler belirlenmiştir. Buradan nmol/g yaş dokuda bulunan katekolamin miktarları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9 da verilmektedir. Numunelerin dört tanesinde adrenalin saptanabilir düzeyde bulunamamıştır.

Çizelge 4.9 Beyin dokusunda bulunan katekolamin miktarları (nmol/g yaş doku)

Numune no	Noradrenalin	Adrenalin	Dopamin
1	1.9061	0.0161	7.0289
2	2.1267	-	6.8582
3	2.0950	-	6.5357
4	1.7015	0.0172	6.0067
5	1.2647	-	5.5678
6	1.4507	0.0122	5.2535
7	1.3915	0.0150	5.8211
8	2.0856	-	7.5086
Ortalama \pm SH	1.7943 \pm 0.1236	0.01150 \pm 0.00345	6.3225 \pm 0.2771

Yapılan bir çalışmada 280 nm eksitasyon ve 325 nm emisyon dalga boylarının kullanıldığı florimetrik deteksiyonlu HPLC tekniği ile sıçanın çeşitli dokularının yanısıra beyin dokusunda katekolamin tayini için, ortalama değer \pm standart hata şeklinde elde edilen bulgulara göre, noradrenalin için 1.89 ± 0.09 , adrenalin için 0.51 ± 0.20 ve dopamin için 3.70 ± 0.34 değerleri bildirilmektedir [18]. Beyin dokusu homojenatında yöntemin uygulamasının sonuçları literatür ile karşılaştırıldığında, noradrenalin için bulunan değerlerin bildirilen değere yakın bir ortalama ve biraz yüksek bir standart hata değeri verdiği görülmektedir. Adrenalinin beyindeki düzeyinin çok küçük miktarlarda olduğu bilinmektedir [1]. Bu bakımdan küçük adrenalin düzeylerinin elde edilmesi bu bilgileri doğrulamaktadır. Dopamin miktarı ise literatüre göre biraz fazla bulunmasına

karşın bulunan standart hata değeri ile güvenilir sonuçlar elde edildiği söylenebilir.

Geliştirilen yöntem bütünüyle yeni bir teknik olmamakla birlikte, beyin dokusu homojenatından ekstre edilen katekolaminlerin aynı anda, basit, seçici ve duyarlı bir şekilde 10 dakika içinde ve tek bir çalışmada tayinine olanak sağlamaktadır. Kullanılan ekstraksiyon prosedürü ile noradrenalin, adrenalin ve dopamin için sırasıyla % 73.91, % 73.76 ve % 75.46 geri kazanım sağlanmıştır. Ekstraksiyon işlemi 30 dk sürmekte, tüm analitik prosedür 40 dk içinde tamamlanmaktadır. Önerilen yöntem, klinik uygulamalarda ve merkezi sinir sisteminin biyolojik numunelerinin analizinde kolayca kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. NOYAN, A., Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, Sekizinci Baskı, Meteksan Üretim Tesisleri, 1988, İstanbul. s: 240-247,301-355, 1084-1102.
2. RAGGI, M.A., SABBIONI, C., CASAMENTI, G., GERRA, G., CALONGHI, N., *J.Chromatography*, **730**, 201-211, 1999.
3. DIXIT, V. and DIXIT, V.M., *J.Liq.Chromatogr.*, **14**, 2779-2800, 1991.
4. MAGNUSSION, O., NİLsoon, L.B., WASTERLUND; D., *J.Chromatography*, **582**, 1-5,1992.
5. İŞİMER, A., BAŞÇI, N.E., BOZKURT, A. and KAYAALP, S.O., *Journal of Islamic Academy of Sciences*, **4**, 130-135, 1991.
6. EHRENSTRÖM, F., *Life Sciences*, **43**, 615-688, 1988.
7. KUMAR, A.M., KUMAR, M., FERNANDEZ, J.B., MELLMAN, T.A. and EISDORFER, C., *J.Liq.Chromatogr.*, **14**, 3547-3557, 1991.
8. BRYAN, L.J. and O'DONNELL, S.R., *J.Chromatogr.*, **487**, 29-39, 1992.
9. YANG, J.C., LIU, T.Y., CHANG, Y.F., LIU, H.C., SHIH, Y.H., LEE, L.S. and CHI, C.W., *J.Lig.Chromatogr.* **14**, 3559-3573, 1991.
10. MUSSO, N.R., VERGASSDAC, M., *J.Liq.Chromatogr.* **14**, 3695-3706, 1991.
11. TUDOS, A.J., OZINGA, W.J.J., KOK, W.T., *J.Chromatogr.* **547**, 1-10, 1991
12. HALBRUGGE; T.; GERHARDT, T., *Life Sciences*, **43**, 19-26, 1998.
13. KYOUNG, J.H., OHKURA, Y. and NOHTA, H., *Analytical Biochemistry*, **200**, 332-338, 1992.
14. KRAUSE; I., BACKHARDT, A., *J.Chromatogr*, **715**, 67-79, 1995.
15. SAID, R., ROBINET, D., BARBIER, C., SARTRE, J. and HUGUET, C., *J. Chromatogr.*, **530**, 11-18, 1990.
16. BOOMSMA, F., ALBERTS, G., VAN DER HOORN, F.A.J., MAN IN'T VELD and SCHALENKAMP, M.A.D.H., *J. Chromatogr.*, **574**, 109-117, 1992.
17. MOLEMAN, P. and DIJK, V., *Clin.Chem.*, **36**, 732-736, 1990.

18. HAYASHI, T. and TSUCHIYA, H. *J.Pharmacol.Methods*, **23**, 21-30, 1990.
19. GANONG, W.F., Tıbbi fizyoloji, Editörü Dr. Ayşe Doğan, Barış Kitapevi, 1995, İstanbul.
20. MURRAY, R.K., GANNER, D.K., MATES, P.A., Harper's Biochemistry, Prentice Hall Internall Inc., 1993, s:1084-1102.
21. GÖZÜKARA, M.E., Biyokimya, Baskı Ofset Repromat Ltd. Şti., 1990, s:1011-1013.
22. GEOFFREY, Z., Biochemistry, Macmillan Publishing Company, 1985, s: 1206-1207.
23. ERGENÇ, N., GÜRSOY, A., ATEŞ, Ö., İlaçların Tanınması ve Kantitatif Tayini, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 1984 , s:417, 795.
24. The Merck Index, An Encylopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Eleventh edition, Published by Merck Co.&Inc., Rahway, N.J., USA,1989, s: 538, 567, 1058
25. YENSON, M., İnsan Biyokimyası, Beta Basım Yayın Dağıtım A.Ş., 1984, s:712-714.
26. SMITH, R.F., THEWS, G., Human Physilogy, Spinger Verlag Heidelberg, 1983 , s: 243-245.
27. MCGILVERY, R.W., ., Biochemistry Functional Approach, W.B Saunders Company, 1983 , s: 651-653.
28. HIGASHIDATE, S. and IMAI, K., *Analyst*,**117**, 1863-1868, 1992.
29. ANTON, A.H. and SAYRE, D.F., *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **138**, 360-375, 1962.