



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIK KULLANILAN ANTİDEPRESAN İLAÇLAR İÇİN LC-MS/MS
İLE EŞ ZAMANLI ANALİZ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

MEHMET KAMİL TEMEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. Ümit ERGUN

DÜZCE, 2019

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIK KULLANILAN ANTİDEPRESAN İLAÇLAR İÇİN LC-MS/MS
İLE EŞ ZAMANLI ANALİZ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet Kamil TEMEL tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ümit ERGUN

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ümit ERGUN

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Erdal DİNÇ

Düzce Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Nuri Cenk COŞKUN

Ankara Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 27/06/2019

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

27 Haziran 2019

Mehmet Kamil TEMEL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve bu tezin hazırlanmasında süresince gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Doç. Dr. Ümit ERGUN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca yardım ve desteğini esirgemeyip bilgi birikimini benimle paylaşan Mert DÖNMEZ ve ŞEVKET KAYA'ya ve ayrıca kimyasal madde desteklerinden ötürü de Düzce Üniversitesi Farmakoloji Laboratuvarı sorumlularına şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen maddi ve manevi yanımda olan eşim Betül TEMEL'e, çalışma arkadaşım olan ve sonsuz desteklerinden dolayı Mehmet KUZU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

27 Haziran 2019

Mehmet Kamil TEMEL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
KISALTMALAR.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM	21
2.1. KULLANILAN KİMYASALLAR VE STANDART ÇÖZELTİLER.....	21
2.2. KULLANILAN CİHAZLAR.....	22
2.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI.....	22
2.3.1. Örnek Numunelerin Hazırlanması.....	22
2.3.2. Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması	23
2.3.2.1. Ana Stok Çözeltisi	23
2.3.2.2. Ara Stok Çözeltisi.....	23
2.3.2.3. Mobil Fazların Hazırlanması.....	24
2.4. LC-MS/MS ÇALIŞMA ŞARTLARI	24
2.5. LC-MS/MS SIVI SİSTEMİ AKIŞ ÖZELLİKLERİ.....	24
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
3.1. MRM SPEKTRUMLARI	27
3.2. ÖZGÜNLÜK/SPEŞİFİKLİK	30
3.3. KALİBRASYON EĞRİLERİ VE DOĞRUSALLIK.....	35
3.3.1. Paroksetin	36
3.3.2. Fluoksetin.....	37
3.3.3. Duloksetin	38
3.3.4. Sitolapram.....	49
3.3.5. Essitolapram	40
3.3.6. Venlafaksin	41
3.3.7. Sertralin	42
3.3.8. Ketiapin.....	43
3.3.9. Opipramol.....	44
3.3.10. Risperidon.....	45
3.4. GERİ KAZANIM.....	46
3.5. KESİNLİK.....	47
3.6. STABİLİTE	52
3.7. MATRİKS ETKİSİ VE PROSES ETKİNLİĞİ.....	54
3.8. SAĞLAMLIK.....	55

4. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
5. KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	64



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması.	7
Şekil 1.2. Kütle Analizörleri.	9
Şekil 1.3. LC/MS-MS Çalışma prensibi şematik görünüm	10
Şekil 1.4. Tandem Kütle Spektrometresi Genel Görünümü.	11
Şekil 1.5. Tek Aşamalı MS ile MS/MS arasındaki fark.	12
Şekil 1.6. Elektorsprey İyonizasyon (ESI).....	13
Şekil 1.7. Üç Kademeli Kuadrapol (TSO) içeren bir kütle analizörü.	13
Şekil 1.8. Örnek bir bileşiğin ana iyon taraması.	14
Şekil 1.9. Örnek bir bileşiğin ürün iyon taraması	14
Şekil 2.1. Numune Ön Hazırlık Şeması.	24
Şekil 2.2. LC/MS-MS Sıvı Akış Sistemi Akış Diyagramı.	26
Şekil 3.1. Etken Maddelerin MRM Spektrumları.	31
Şekil 3.2. Etken Maddelerin Alıkonma Zamanlarını İçeren Spektrumlar.	34
Şekil 3.3. Etken Maddelerin Eş Zamanlı Kromatogramı.....	35
Şekil 3.4. Paroksetin Kalibrasyon Eğrisi Grafiği.....	36
Şekil 3.5. Fluoksetin Kalibrasyon Eğrisi Grafiği.....	37
Şekil 3.6. Duloksetin Kalibrasyon Eğrisi Grafiği.	38
Şekil 3.7. Sitolapram Kalibrasyon Eğrisi Grafiği.	39
Şekil 3.8. Essitolapram Kalibrasyon Eğrisi Grafiği.....	40
Şekil 3.9. Venlafaksin Kalibrasyon Eğrisi Grafiği.	41
Şekil 3.10. Sertralin Kalibrasyon Eğrisi Grafiği.	42
Şekil 3.11. Ketiapin Kalibrasyon Eğrisi Grafiği.	43
Şekil 3.12. Opipramol Kalibrasyon Eğrisi Grafiği.	44
Şekil 3.13. Risperidon Kalibrasyon Eğrisi Grafiği.	45

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. İlaçların farklı yollarla alındığında emilim hızları.	2
Çizelge 1.2. Piyasada kullanılan antidepresan ilaçların sınıflandırılması.	4
Çizelge 2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Standart Çözeltiler.	22
Çizelge 2.2. Kullanılan cihazlar.	23
Çizelge 2.3. LC-MS/MS Sıvı Sistemi Akış Tablosu.	26
Çizelge 3.1. Etken Maddelerin MRM Parametreleri.	27
Çizelge 3.2. Paroksetin etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.	36
Çizelge 3.3. Fluoksetin etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.	37
Çizelge 3.4. Duloksetin etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.	38
Çizelge 3.5. Sitolapram etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.	39
Çizelge 3.6. Essitolapram etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.	40
Çizelge 3.7. Venlafaksin etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.	41
Çizelge 3.8. Sertralin etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.	42
Çizelge 3.9. Ketiapin etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.	43
Çizelge 3.10. Opipramol etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.	44
Çizelge 3.11. Risperidon etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.	45
Çizelge 3.12. İlaç etken maddelerinin konsantrasyonları ve geri kazanımları.	46
Çizelge 3.13. Etken Maddelerin Gün içi tekrarlanabilirlik değerleri.	48
Çizelge 3.14. Etken Maddelerin Günler arası tekrarlanabilirlik 1 ng.mL ⁻¹ değerleri.	49
Çizelge 3.15. Etken Maddelerin Günler arası tekrarlanabilirlik 50 ng.mL ⁻¹ değerleri.	50
Çizelge 3.16. Etken Maddelerin Günler arası tekrarlanabilirlik 100 ng.mL ⁻¹ değerleri.	51
Çizelge 3.17. Etken Maddelerin LOD ve LOQ Değerleri.	52
Çizelge 3.18. Etken maddeler için Stabilitate Verileri.	53
Çizelge 3.19. Etken Maddelerin Matris Etkisi ve Proses Etkinliği.	54
Çizelge 3.20. Etken Maddelerin Sağlık verileri (akış hızı).	55
Çizelge 3.21. Etken Maddelerin Sağlık verileri (kolon sıcaklığı).	56
Çizelge 3.22. Etken Maddelerin Sağlık verileri (kişi).	57

KISALTMALAR

ACN	Asetonitril
akb	Atomik Kütle Birimi
APCI	Atmosferik Basınçlı Kimyasal İyonizasyon
DC	Lineer Eğri
dk	Dakika
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC	Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
LOD	Dedeksiyon Limiti
LOQ	Tayin Limiti
mL	mililitre
mM	Milimolar
MRM	Çoklu Reaksiyon İzleme
MS	Kütle Spektroskopisi
m/z	Kütle/yük
ng	Nanogram
RF	Radya Frekansı
RSD	Bağıl Standart Sapma
TFA	Triflorasetik asit
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UV	Ultraviyole
µL	Mikrolitre

ÖZET

SIK KULLANILAN ANTİDEPRESAN İLAÇLAR İÇİN LC-MS/MS İLE EŞ ZAMANLI ANALİZ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet Kamil TEMEL

Düzce Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ümit ERGUN

Haziran 2019, 63 sayfa

Bu çalışmada, sık kullanılan antidepresan ilaç etken maddeleri olan Paroksetin, Fluoksetin, Duloksetin, Sitolapram, Essitolapram, Venlafaksin, Sertralin, Ketiapin, Opipramol, Risperidon moleküllerinin tayini için insan kanında Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) cihazı ile basit, hızlı ve güvenilir bir metot geliştirilmiştir. Her bir ilaç etken maddesi için geri kazanım, doğruluk, yüzde bağıl standart sapma (%RSD), gözlenebilirlik sınırı (LOD), alt tayin sınırı (LOQ), stabilite, sağlamlık, matriks etkisi ve proses etkinliği gibi bazı analitik parametrelerin belirlenip, ölçülebilir en düşük değerlerin yüksek hassasiyet ile en kısa sürede eş zamanlı olarak yapılması amaçlanmıştır. Etken maddelerin her biri için belirlenen konsantrasyonlarda LOD değerleri için 1 ng.mL⁻¹; 0,05 ng.mL⁻¹- 0,18 ng.mL⁻¹ aralığında, 50 ng.mL⁻¹; 0,12 ng.mL⁻¹- 0,65 ng.mL⁻¹ aralığında, 100 ng.mL⁻¹; 0,16 ng.mL⁻¹- 0,75 ng.mL⁻¹ aralığında tespitler yapılmıştır. LOQ değerleri için 1 ng.mL⁻¹; 0,16 ng.mL⁻¹- 0,60 ng.mL⁻¹ aralığında, 50 ng.mL⁻¹; 0,39 ng.mL⁻¹- 2,18 ng.mL⁻¹ aralığında, 100 ng.mL⁻¹; 0,54 ng.mL⁻¹- 2,51 ng.mL⁻¹ aralığında sonuçlar elde edilmiştir. Metot % geri kazanım yönünden 1 ng.mL⁻¹ konsantrasyonunda %98 seviyelerinde, yüksek konsantrasyonlarda ise %99 seviyelerinde tutulmuş olup EURACHEM kılavuzuna göre %95 değerlerinin üzerinde olduğu her bir etken maddenin konsantrasyonu için uygun olduğu ispatlanmıştır.

Anahtar sözcükler: Depresyon, ilaç, antidepresan, LC-MS/MS.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SIMULTANEOUS ANALYSIS METHOD OF FREQUENTLY USED ANTIDEPRESSANT DRUGS BY LC-MS/MS

Mehmet Kamil TEMEL

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Chemistry

Master's Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ümit ERGUN

June 2019, 63 pages

In this study, a simple, rapid and reliable method has been developed with liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) device in order to determine the commonly used antidepressant active agents such as Paroxetine, Fluoxetine, Duloxetine, Citalopram, Escitalopram, Venlafaxine, Sertraline, Quetiapine, Opipramol, and Risperidone in human blood. The aim of this study is measure each active substances concurrent minimum value with the highest sensitivity in real time and it has been validated in terms of recovery, accuracy, percentage of relative standard deviation (%RSD), limit of quantification (LOQ), limit of detection (LOD), stability, consistency, effect of matrix and process for each active substance of drugs. LOD and LOQ values for obtained concentrations of each active substances were resulted that for LOD: 1 ng.mL⁻¹; 0,05 ng.mL⁻¹- 0,18 ng.mL⁻¹, 50 ng.mL⁻¹; 0,12 ng.mL⁻¹- 0,65 ng.mL⁻¹, 100 ng.mL⁻¹; 0,16 ng.mL⁻¹- 0,75 ng.mL⁻¹ and for LOQ: 1 ng.mL⁻¹; 0,16 ng.mL⁻¹- 0,60 ng.mL⁻¹, 50 ng.mL⁻¹; 0,39 ng.mL⁻¹- 2,18 ng.mL⁻¹, 100 ng.mL⁻¹; 0,54 ng.mL⁻¹- 2,51 ng.mL⁻¹ respectively. This method was resulted in %98 recovery at 1 ng.mL⁻¹ concentration and %99 recovery at higher concentration levels and also it was confirmed above %95 recovery according to EURACHEM guide.

Keywords: Depression, drug, antidepressant, LC-MS/MS.

1. GİRİŞ

Psikolojinin temeli Aristo ile beraber Yunanistan'da ortaya çıkmıştır." Kelime kökeni itibariyle 'psiko' ve 'loji' kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. 'Psiko' kelimesi zihin, 'loji' kelimesi ise bilim anlamına gelmektedir ve 'zihin bilimi' kavramı doğmaktadır. İlk olarak sadece insan davranışlarının irdelenmesi amacındaydı fakat gün geçtikçe artık düşünceler, hareketler, tavırlar, duygular da psikoloji kelimesinin muhtevasına girmeye başladı. En genel olarak söylemek gerekirse psikoloji; zihinsel ve davranışsal süreçlerin sistematik, somut, soyut ve bilimsel olarak incelenmesidir [1].

Psikolojik rahatsızlık en genel manada davranışsal veya duygusal rahatsızlık semptomlarıdır. Bu rahatsızlık hastalarda bulunan sorunlara, sakatlığa, giderek artan bir ölüm korkusuna, ağrı veya kişisel özgüven yokluğuna bağlı olarak oluşur. 250'den fazla literatüre girmiş psikolojik rahatsızlık bulunmaktadır. Bunlar panik atak, anksiyete, sosyal fobiler, agorafobi, travma, stres bozukluğu yaygın psikolojik bozukluklardandır. Depresyon, duygu durum bozuklukları, kişilik bozuklukları, bipolar bozukluk, bağımlılıklar, yeme bozuklukları, cinsel problemler bu rahatsızlık grubunun alt kategorilerine girmektedir [2].

Depresyonun 2020 yılına kadar ikinci en ciddi hastalık olması beklenmektedir. Çok değişken belirtiler dizisi olan ciddi bir psikiyatrik hastalıktır. Çaresizlik ve umutsuzluk, günlük aktivitelere ilgisizlik, iştah veya kilo kaybı, uyku düzensizlikleri, öfke veya sinirlilik, enerji kaybı ve zayıf konsantrasyon bunların hepsi depresyonun alt etkenleridir. Sonucunda ise bireyin günlük sorumluluklarını yerine getirme yeteneği etkilenir ve en kötü intihara bile yol açabilir. Dünya Sağlık Örgütü, depresyonun engelliliğe neden olarak bir numaralı rahatsızlık olduğunu düşünmektedir. Depresyon tedavisi; antidepresanlarla, çeşitli psikoterapi biçimleriyle, farmakoterapilerle ve hatta elektrokonvülsif tedavi yöntemleriyle uygulanır. Antidepresanlar şu anda etkinliklerinden dolayı ruh halinin yükselmesi, iştah artışı ve uyku düzenlemeleri, fiziksel aktivite artışı, başkaları ile arada olan suçluluk duygusunu azalmasını sağlayan en sık tedavi edici ajanlar olarak kullanılır. Bu tür ilaçlar anksiyete, obsesif-kompulsif veya psikosomatik bozukluklar içinde kullanılır. Yan etkileri her medikal tedavide

karşılaştığı gibi genel olarak uykusuzluk, ağız kuruluğu, bulanık etkileri görme, kabızlık, baş dönmesi, ajitasyon, sinirlilik durumlarını ortaya çıkarabilir [3].

Hipokampus, iki beyin bölgesinden biri olarak bilinen yaşam boyu yeni nöronlar üreten bölgedir. Depresyonlu hastalarda sürekli yenilenme kesintiye uğradığında bu hastalığın belirtileri ortaya çıkmakta fakat bu durumun hastalığın semptomlarıyla ilgili olup olmadığı bilinmemektedir. Uzun zamandır bilinmektedir ki antidepresanların nöron yenilenmesini etkiledikleri tıp literatüründe başvurulan bir yöntemdir [4].

'Londra King's College bilim insanları bu sürecin tam olarak ne şekilde işlediğini ortaya koymuşlardır. Araştırmalar bazı antidepresanlar ve glukokortikoid stres hormonları arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmıştır. Christoph Anacker ve arkadaşları Sertralin maddesinin beyin hücrelerindeki glukokortikoid reseptörlerinde etkili olup olmadığını test etmişlerdir. Bu amaçta laboratuvarında insanın öncü hipokampus hücreleri üretildikten sonra Sertralin ilave edilmiştir. On gün sonra kültür hücrelerinde beklenilenden yüzde yirmi beş oranında daha fazla nöronun geliştiği görülmüştür. Bilim insanları Sertralin etki maddesinden önce glukokortikoid reseptörlerini bloke eden bir ilaç ilave ettiklerinde, yeni nöron sayısının aşağı yukarı normal gelişim sürecinde beklenildiği kadar olduğu görülmüştür. Anacker'e göre glukokortikoid hormonları ve antidepresanlar reseptörleri etkinleştiriyorlar [4].'

Çizelge 1.1. İlaçların farklı yollarla alındığında emilim hızları.

Alındığı yol	Etkisinin ortaya çıktığı zamana kadar geçen süre (dk)
Deriden	Değişken
Ağızdan	30-90
Cilt altı	15-30
Kasıçı	10-20
Dilaltı tablet	3-5
Solunum	3
Damar yolu	0.5-1
Kalp içine	0,25

Bu rahatsızlıklarda; ilaç konsantrasyonlarını kanda terapötik seviye aralıklarında tutmanın önemi; uygulanacak olan tedaviden istenilen verimi almak ve oluşabilecek ilaç zehirlenmeleri riskini en aza indirmektir. Terapötik ilaç seviyesinin ayarlanması, sadece ilacın kandaki konsantrasyonunu ölçmek ve doğru aralıkla kıyaslamak olmamalıdır. İlaç tedavisi izlemi, uygulanacak ilacın hastanın bireysel durumları göz önüne alınarak (yaş,

kilo, kalp ve böbrek fonksiyonu gibi) yapılmalıdır. Hastanın kullandığı diğer ilaçlar var ise tedavi ona göre ayarlanmalıdır. Uygulanan ilacın kan konsantrasyon takibi yapılırken ilaca başlama tarihi, istenilen seviyeye ulaşılması ve hedeflenen bitiş zamanı gibi faktörler takip edilerek ilaçtan en az seviyede toksisiteyle kurtulmanın uyarlaması yapılmalıdır [5].

Literatür çalışmalarına bakıldığında LC/MS-MS yöntemiyle 2000'li yılların başından beri düşük limitlerde hızlı güvenilir araştırmalar yapılmaktadır.

A.de Castro ve arkadaşları 2008 yılında Amitriptilin, İmipramin, Klomipramin, Fluoksetin, Paroksetin, Sertralin, Fluvoksamin, Sitalopram ve Venlafaksin ile ana metabolitlerinin bazılarının kanda ve tükürükte eş zamanlı belirlenmesi için hızlı, duyarlı ve seçici bir LC-MS / MS yöntemi tanımlamışlardır. Oluşturdukları bu yöntem tükürükte LC- MS/MS ile geliştirilen ilk metottur [6].

I. Gonzalez ve arkadaşları tarafından 2018 yılında insan vücudu dışında yapılan çalışmalarda ise şehirlerin atık sularında bulunan antidepresanların LC-MS/MS ile eş zamanlı tayinini yapmışlar ve 38 psikoaktif ilacın (benzodiazepinler, antidepresanlar ve istismar ilaçları dahil) ortalama ve maksimum konsantrasyon seviyelerinin literatürde daha önce rapor edilen seviyelerin üzerinde çıktığını bulmuşlardır [7].

A. G. Asimakopoulos ve arkadaşları 2017 yılında Sıvı Kromatografi-Üçlü Dört Kutuplu Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemi ile 89 yasal nöropsikiyatrik ilaç ve yasadışı uyuşturucunun (hem ana bileşikler hem de metabolitler) filtre edilmemiş atık su ve tatlı suda eş zamanlı belirlenmesi için bir metot geliştirmişlerdir [8].

A. Pouliopoulos ve arkadaşları 2018 yılında literatürde toksikolojik amaçlar için çokça reçetelenmiş antidepresan ve antiepileptik ilaçları tespit edebilen ve ölçebilen, çalışma süresi 11 dakika olan bir LC-MS/MS yöntemini sunmuşlardır [9].

M. Jang ve arkadaşları 2015 yılında LC-MS/MS yöntemi ile insan kanında analiz edilmek üzere eş zamanlı olarak uyuşturucu- uyarıcı madde analizleri gerçekleştirmişlerdir [10].

A. Song 2016 yılında sekizi antidepresan olmak üzere on üç tane organik toksik maddeyi LC-MS/MS yöntemi ile insan kanında analiz etmek üzere eş zamanlı bir çalışma yapmıştır. Çalışmada yüksek doğruluk, kesinlik ve oldukça düşük LOD ve LOQ sonuçları elde etmiştir [11].

Çizelge 1. 2. Piyasada kullanılan antidepresan ilaçların sınıflandırılması [5].

Monoamin Oksidaz İnhibitörleri (Maoi)	Moklobemid					
Trisiklik Antidepresanlar	Amitriptilin	Klomipramin	İmipramin	Opipramol		
Seçici Serotonin Geri alım İnhibitörleri	Essitalopram	Sitalopram	Fluvoksamin	Paroksetin	Fluoksetin	Sertralin
Alfa 2 Adrenoreseptör Antagonistleri	Mirtazapin	Mianserin				
Seçici Noradrenerjik Geri alım İnhibitörleri	Risperidon	Ketiapin	Maprotilin	Reboksetin		
Noradrenalin ve Dopamin Geri alım İnhibitörleri	Bupropion					
Serotonerjik ve Noradrenalin Geri alım İnhibitörleri	Duloksetin	Milnasipran	Venlafaksin			
Serotonerjik ilaçlar	Gepiron	Trazodon	Tianeptin	Nefazodon		

A. H. Ewalda ve arkadaşları 2016 yılında antidepresanların, benzodiazepinlerin nicelleştirilmesi için benzer bir yaklaşıma dayanılarak, basit sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak nöroleptiklerin hızlı hedefleme ve kantitatif analizi için tam kan, plazma ve serumda bir yöntem tanımlamışlardır [12].

Li-Jun Hu ve arkadaşları 2017 yılında insan kanının serum kısmında saptanması için 26 sağlıklı gönüllüden ve 54 depresyon hastasından kan örnekleri alınarak hızlı ve yüksek oranda tekrarlanabilir bir Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemi oluşturmuşlardır. İlk olarak; Amitriptilin, İmipramin, Klomipramin, Fluoksetin, Paroksetin, Sertralin, Fluvoksamin, Sitalopram ve Venlafaksin ile ana metabolitlerinin bazılarının kanda ve tükürükte eş zamanlı belirlenmesi için hızlı, duyarlı ve seçici bir LC-MS/MS yöntemi tanımlamışlardır [13].

Tez çalışması kapsamında bazı antidepresan ilaç etken maddeleri olan Paroksetin, Fluoksetin, Duloksetin, Sitalopram, Essitalopram, Venlafaksin, Sertralin, Ketiapin, Opiromal ve Risperidon moleküllerinin yapılarına uygun olarak insan kanının serum kısmında Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) cihazı ile ön hazırlık aşaması basit ve kısa olan eş zamanlı analiz yöntemi geliştirilmesi, LOD, LOQ, % bağıl standart sapma (%RSD), gün içi tekrarlanabilirlik, günler arası tekrarlanabilirlik, geri kazanım, stabilite, çalışma aralığı, matriks etkisi, proses etkinliği gibi validasyon parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Belirlenen parametrelerin uluslararası uygunluğu tartışılarak yöntemin geçerli olduğu kanıtlanacaktır.

1.1. KROMATOĞRAFI

Kromatografi, bir rus botanikçisi olan Mikhail Tswett tarafından 20. yüzyılın başlarında (8 Mart 1903) bulunmuştur. Ksantofil ve klorofil gibi farklı pigmentler ihtiva eden bir solüsyon hazırlanmış ve toz haline getirilmiş, kalsiyum karbonatla doldurulmuş cam kolondan geçirilerek klorofil ve ksantofilleri birbirinden ayırmayı başarılı bir şekilde gerçekleştirmiştir. Kolondan ayrılan maddeler renkli bölgeler halinde gruplar oluşturmuş; bu ayırma yöntemine, renk yazma anlamına gelen kromatografi (chromatography) adını vermiştir [14].

Daha sonra birçok bilim adamı bu alanda çalışmalar yapmıştır. Aktif olarak dünyada İnce tabaka kromatografisi (TLC) onlarca yıldır kullanılmaktadır.. Bu metot ilk defa 1938 yılında Farmasiya dergisinde yayınlanan “TLC'nin Temelleri ve Farmakolojiye Uygulaması” adlı makalesinde Izmailov ve Schraiber tarafından kağıda uygulanarak gerçekleştirilmiştir [15].

23 Eylül 1943 tarihinde Vegezzi'nin “Yabani *Helixpomatia*'nın Safra Ve Karaciğerinde Örümcek Yengeç Olan *Majasquinado* Yumurtalarının Omurgasızlarda Bulunan Çeşitli

Pigmentlerin Spektroskopik Araştırması” adlı çalışması bu tür pigmentlerin saf halde, UV spektrumları ve floresans ölçümlerinde kullanılması için bu pigmentlerin ön hazırlığı, kromatografinin ilk uygulamasını temsil etmiştir. Vegezzi'nin basılı tezine ek olarak, sonuçlar altı makalede bildirdikten daha sonra Dhere ve Vegezzi tarafından çalışmalar birleştirilmiştir [16].

J. D. H. Cooper and D. C. Turnell tarafından HPLC'den önce biyolojik sıvıların tedavisi için diyaliz ve eser zenginleştirme içeren bir otomatik örnek hazırlama sisteminin gelişimi bildirilmiştir. Sistemin performansının incelenmesi, insan serumunda bir ilacın fenobarbitonunun terapötik konsantrasyonlarının analizi kullanılarak belirlenmiştir [17].

En genel tanımlama ile kromatografi; karışımlarda bulunan maddeleri bir birbirinden ayırmaya imkan veren bir tekniktir. Kromatografik uygulamalarda bir “sabit faz” ve bir “hareketli faz” bulunur. Sabit ve hareketli faz örnekte bulunan maddelerin göç etme hızlarını farklılaştırarak ayırım sağlar. Bilim dünyasında kromatografi çok geniş ve verimli bir alan olduğundan bu alandaki araştırmalarından dolayı şimdiye kadar 12 bilim adamına Nobel ödülü verilmiştir. Hiçbir araştırma kategorisine bu kadar çok Nobel ödülü verilmemiştir [18].

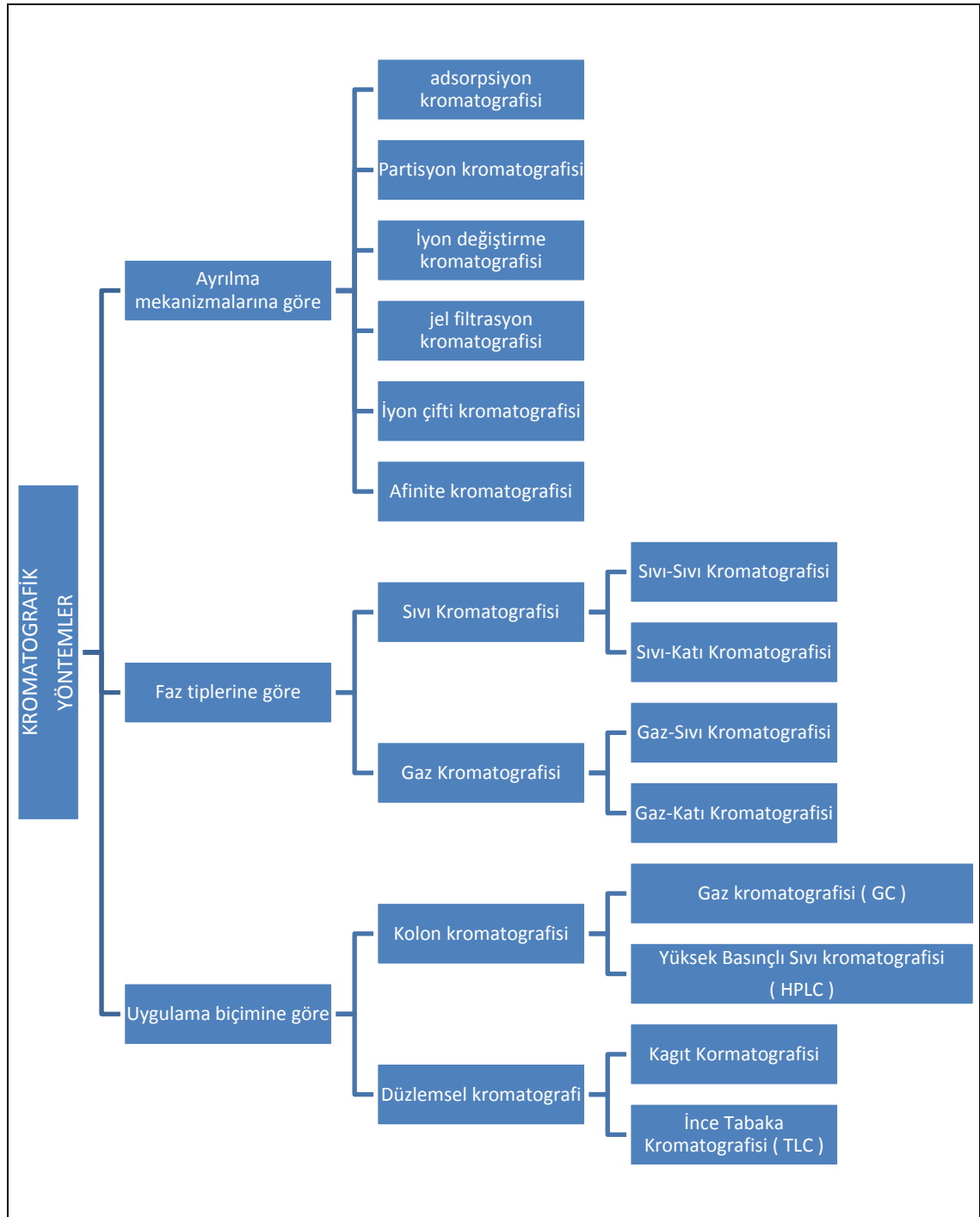
1.1.1. Sıvı Kromatografisi

1.1.1.1. HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatogramı)

1970'lerden günümüze, HPLC tekniği organik maddeler için ayırma, analiz ve saflaştırmanın mihenk taşı olmuştur. HPLC'deki kolon bölmesinde neredeyse çözünemeyen tüm karışımları ayırabilir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) günümüzde geniş çaplı molekül analizi ve saflaştırmalarında ilk tercih edilen teknik olarak bilinmektedir. HPLC özellikle de peptit ve proteinlerin analizlerinde ana yöntem olmuş, biyolojik ve biyomedikal alanlarda son yirmi yıldır en çok uygulanan metot olmuştur.

HPLC, on milyar dolara yaklaşan yıllık satışıyla bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın olanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması, duyarlılığı, ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar,

terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, streodiler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler [19].



Şekil 1.3. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.

1.1.1.2. Normal faz kromatografisi

Silika jel, polimer veya üzerine bağlanmış $-CN$, $-NO_2$ veya NH_2 dolgu maddeleri içeren faz sabit faz olarak adlandırılır. Etiler, kloroform, heksan vb. çözücüler ve karışımları içeren düşük polariteye sahip apolar faz mobil faz olarak adlandırılır.

Kolondan ilk çıkan madde düşük polariteye sahip olan maddedir. Benzer özelliklere sahip maddelerin aynı kolon içinde dağılma özelliği fazla olduğu için daha düşük polariteye sahip madde mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle apolar madde polar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir.

Maddenin kolonda tutunma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Tutunma zamanını yükseltmek için mobil fazın polaritesi artırılabilir. Düşük polariteye sahip mobil fazda alıkonma zamanları uzun, polaritesi arttırılmış mobil fazda tutunma zamanları kısadır.

1.1.1.3. Ters faz kromatografi

Silika jel-Polimer ve üzerine bağlanmış C₁₈, oktil veya fenil grupları, metil ve etil gruplu dolgu maddelerini içeren fazlar sabit faz olarak adlandırılır ve bu faz apolardır.

Metanol, Asetonitril, Tetrahidrofuran gibi güçlü organik çözücülerin zayıf çözücü olan sulu veya tamponlanmış, pH ayarı yapılmış karışımları içeren fazlara mobil faz olarak adlandırılır ve polardır.

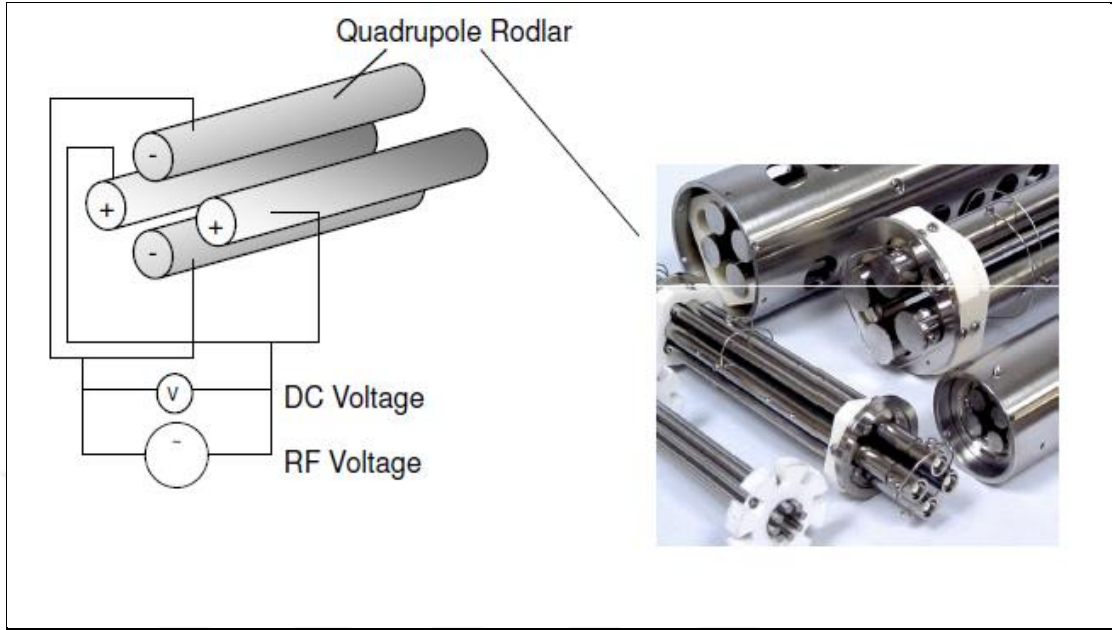
Kolondan ilk çıkan madde yüksek polariteye sahip olan maddedir. Benzer özelliklere sahip maddelerin aynı kolon içinde dağılma özelliği fazla olduğu için daha yüksek polariteye sahip madde mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle polar madde polar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir.

Tutunma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Tutunma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır. Polaritesi azaltılmış mobil fazda alıkonma zamanları kısa, yüksek polariteye sahip mobil fazda alıkonma zamanları uzundur.

1.2. KÜTLE SPEKTROSKOPİSİ

Atom ve moleküllerin en kesin ve net şekilde kütlelerinin belirlenmesini sağlayan yöntem kütle spektroskopisi olarak adlandırılmaktadır. Kütle Spektroskopisi; gaz haline gelmiş numunenin, yüksek enerjili elektron bombardımanına tutulması prensibiyle çalışır. Gaz fazındaki tanecikler ile yüksek enerjili elektronların çarpışması sonucunda taneciklerden elektron kopması veya taneciklere elektron yüklemesi olur. Bunun sonucunda ise tanecikler pozitif veya negatif yüklü iyonlarla yüklenir. Bu yüklü iyonlar

iki zıt yükle yüklenmiş plaka arasından geçerken hızlanırlar. Bu iyonlar manyetik alan içine gönderilir.



Şekil 1.4. Kütle analizörleri.

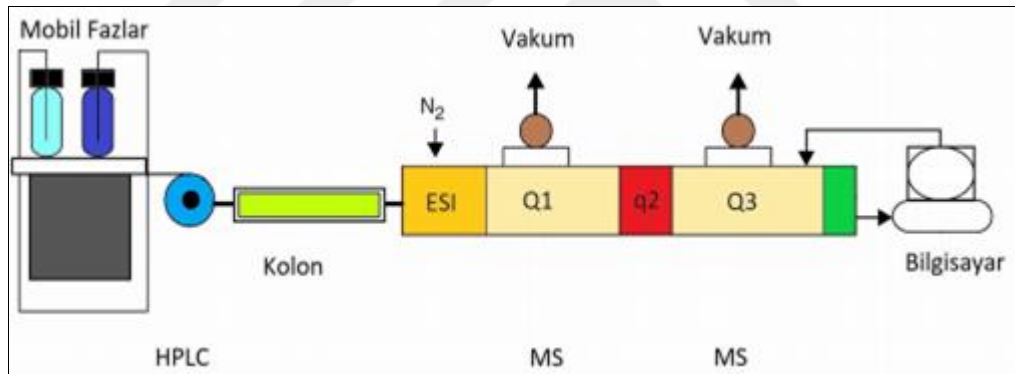
Belli hızlara ulaşan iyonlar manyetik alan tarafından dairesel yol alacak şekilde yönlendirilir. Kat edilen mesafe yarıçapı (kütle; m ve yük; z) m/z oranına bağlı olarak değişiklik gösterir. Daha küçük m/z oranına sahip iyonlar daha geniş dairesel alanda yol izler. Böylece farklı kütleli aynı iyonlar birbirinden kolaylıkla ayrılırlar. Sapmanın büyüklüğü ölçülerek, çalışılan atom ya da moleküllerinin iyonlarının kütlesi belirlenir. Bu sistemin sonunda, m/z oranına göre ayrılan iyonlar dedektöre ulaştıktan sonra bir akım oluşturarak dedektöre çarpan iyon sayısı ile bu akım doğru orantılı olduğundan izotopların göreceli bolluğunu saptamamıza yardımcı olur.

İngiliz fizikçi F.W Aston 1920 yılların başlarında neon izotopları üzerinde çalışmalarıyla ilk kütle spektrometresi çalışmalarını başarı ile gerçekleştirmiştir. Tabii ki günümüzde kullanılan cihazlardan daha az hassastır. Ancak bu cihaz bugünkü durumuna göre daha az duyarlıydı. Örneğin, neon(20) için atomik ağırlığı 19,9924 akb ve %90,92 doğal izotop bolluğuna sahiptir, neon(22) atomik ağırlığı 21,9914 akb ve %8,82 doğal izotop bolluğuna sahip olarak bulunmuştur. Daha sonraları hassas cihazlar ve yöntemler oluşturulduğunda neon izotopuna ait üçüncü bir izotopun varlığı da ispatlanmıştır. Bu izotopun atomik ağırlığı 20,9940 akb ve %0,257 doğal izotop bolluğuna sahiptir. Bu örnek deneysel duyarlılığın kimya gibi nicel bilimlerde, ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Eski çalışmalar neon(21) izotopunun doğal bolluğu

%0,257 gibi çok az bir oran olduğundan spektrometrede ölçülemedi fakat ilerleyen zamanlarda daha hassas cihazlarda 10000 neon atomundan 26 tanesinin neon(21) izotopuna ait olduğu belirlenmiştir [20].

1.2.1. LC-MS/MS Yöntemi

LC-MS/MS yöntemi; sıvı kromatografi (LC) cihazı ile kütle spektrometresi (MS) cihazlarının tandem hale getirilmesiyle oluşturulmuş ileri düzey bir laboratuvar teknolojisidir. Kütle spektrometresi (MS) tekniğinin seçiciliği yüksek olmasına rağmen analiz edilecek maddeyi aynı karışım içinde bulunan diğer moleküllerden tek başına ayırması oldukça zordur. Maddeleri m/z (kütle/yük) oranlarına göre ayırmak üzere oluşturulan MS tekniği ile, çözülmüş her organik maddeyi ayırabilen likit kromatografisi (LC) tekniği kombine edildiğinde (LC-MS) sistemi meydana gelir. Her iki sistemin ayırt edici özellikleri bir araya getirilerek Sıvı Kromatografi/Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) sistemi kurulmuştur. Hassasiyet, hız ve seçicilik gibi özellikleri nedeniyle son dönemlerde en çok tercih edilen yöntemlerdendir [21].

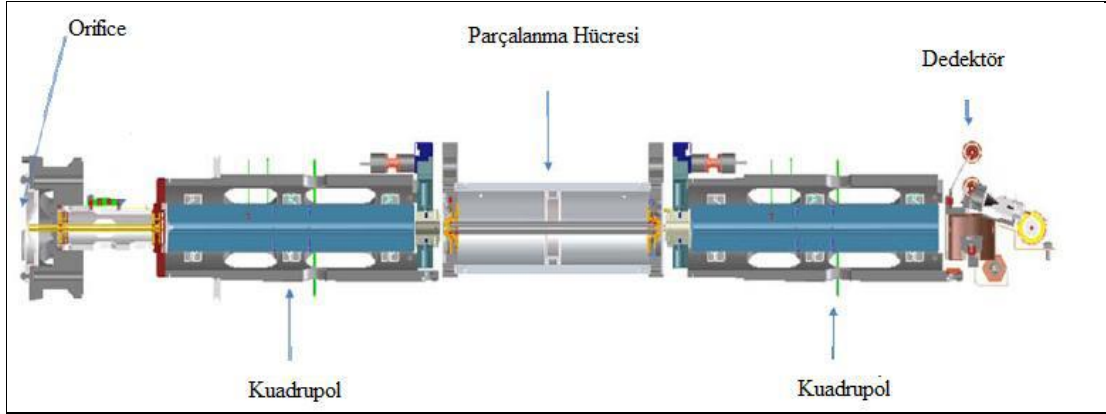


Şekil 1.5. LC/MS-MS çalışma prensibi şematik görünüm.

1.2.2. LC-MS/MS 'in Uygulama Alanları

LC-MS/MS ilaç ile ilgili olan çalışmalarda oldukça sık başvurulan bir yöntemdir. Bundan dolayı farmakinetik ve biyoanaliz çalışmalarında yaygın bir kullanım alanı vardır. Bu çalışmalarda en kısa sürede ilacın kanda, idrarda ve organlarda tayinini yapmak çok önemlidir. MS/MS hassasiyetinin, analiz süresinin ve seçiciliğinin üst düzeyde olması nedeni ile diğer yöntemlere tercih edilmektedir. MS/MS kullanımındaki en büyük avantajlardan biri de dedektörün sadece belli bir iyonun ölçülmesine programlanabilmesidir. İşlem genelde bir seçim işlemidir fakat görüldüğünden daha komplekstir. MS/MS yöntemi ile analiz süresi bir dakika ve altına düşürülebilmiştir. Bu

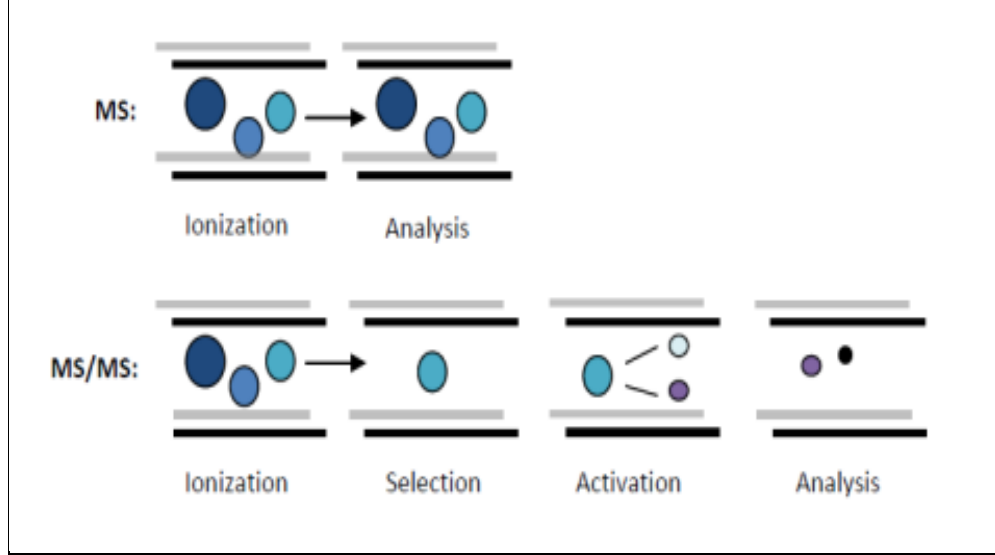
analiz süresi HPLC'nin ortalama 10 dakikalık analiz süresi ile karşılaştırıldığında oldukça hızlı görünmektedir. LCMS/MS yöntemi yüksek çözünürlükteki kütle spektroskopilerinde çakışan moleküllerin analizinde dahi kullanılır [22].



Şekil 1.6. Tandem kütle spektrometresi genel görünümü.

Kütle spektrometresi (MS) tekniğinin seçiciliği yüksek olmasına karşın tek başına analiz edilecek maddeyi aynı matris içinde bulunan diğer moleküllerden ayırması oldukça güçtür. MS tekniği maddeleri m/z (kütle/yük) oranlarına göre ayırmak üzere dizayn edilmiş bir sistemdir, ayırmaya yardımcı olan sıvı kromatografisi (LC) sistemi ile kombine edildiğinde (LC-MS), her iki sistemin ayırt edici özellikleri birleştirilerek Sıvı kromatografi/ Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) sistemi dizayn edilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Sistem hassasiyet, hız ve seçicilik gibi özellikleri nedeniyle son dönemlerde sıklıkla tercih edilmektedir.

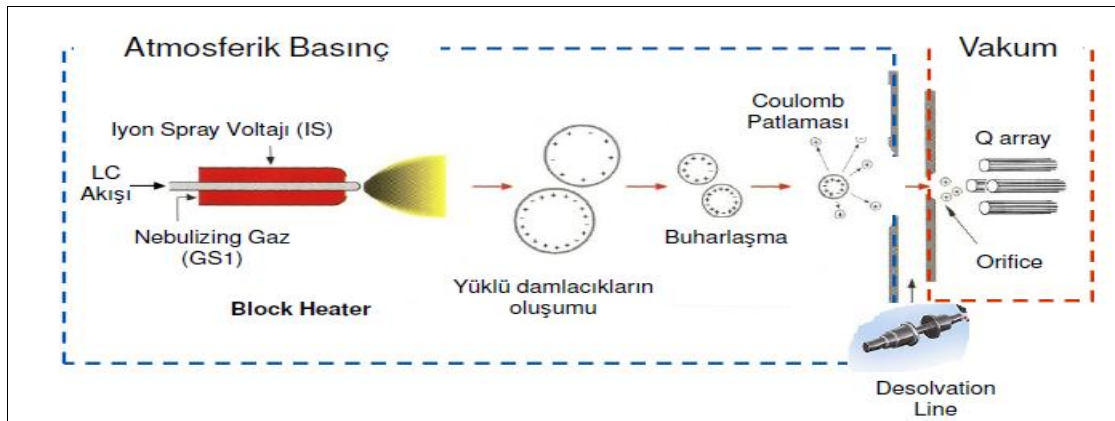
Bu sistem temelde sıvı kromatografisi, iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör ve yazılımdan oluşmaktadır. Sıvı Kromatografi kısmı maddeleri fizikokimyasal özelliklerine göre ayırır ve iyon kaynağına bu sıraya göre gönderir. İyon kaynağı bu maddeleri buharlaşabilen ve analizi istenmeyen diğer maddelerden ayırarak gaz fazına dönüştürür ve analiz edilmesini sağlayan pozitif ve negatif yükleri kazandırır. Kütle analizörü bu yüklü parçacıkları kuadrupollerde m/z oranları ve yüklerine göre ayırır. Dedektör ayrılmış bu moleküllerin iyon enerjilerini elektriksel sinyallere çevirir. Son olarak yazılım bu sinyalleri alan değerine dönüştürerek okur ve analiz gerçekleştirilmiş olur. Sıvı kromatografisindeki temel amaç maddelerin yapılarına göre farklı tutunma zamanlarında birbirinden ayrılmasını sağlayarak bu maddeleri farklı zamanlarda iyon kaynağına yollamaktır. Bu amaçla öncelikle analiz edilecek maddeler açısından rezolüsyonu iyi bir analitik kolon seçilir.



Şekil 1.7. Tek aşamalı MS ile MS/MS arasındaki fark [23].

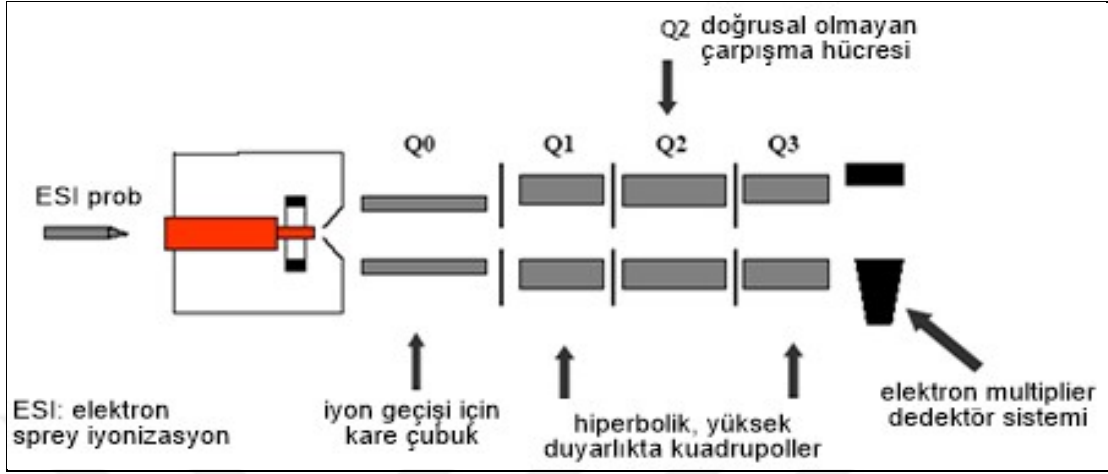
Maddelerin kolonda hareket etmesini ve farklı zamanlarda kolonda tutunmasını sağlamak üzere mobil fazlar kullanılır. Bu mobil fazların farklı oranlarda kolona gönderilmesiyle ayırma sağlanmış olur. Mobil fazların farklı oranlarda sisteme gönderilmesini sağlayan sistem bileşenleri ise pompalardır.

İyon kaynakları maddelerin vakum altında çözücünden uzaklaştırıldığı ve yapısına göre yük kazandırıldığı bölümdür. Maddenin polaritesine göre elektrosprey iyonizasyon (ESI) ya da atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) kaynakları kullanılmaktadır [76]. Bazı maddeleri bu iki kaynakta da iyonlaşabilmektedir. Bu kısımda maddelerin vakum altında etkili olarak buharlaştırılabilmesi için akış [0.2-2 mL/dk] belirli bir miktar aralığında sınırlandırılmıştır. Düşük akışlarda analit kaybı gözlenirken yüksek akışta maddenin gaz haline geçmesi engellenmektedir.



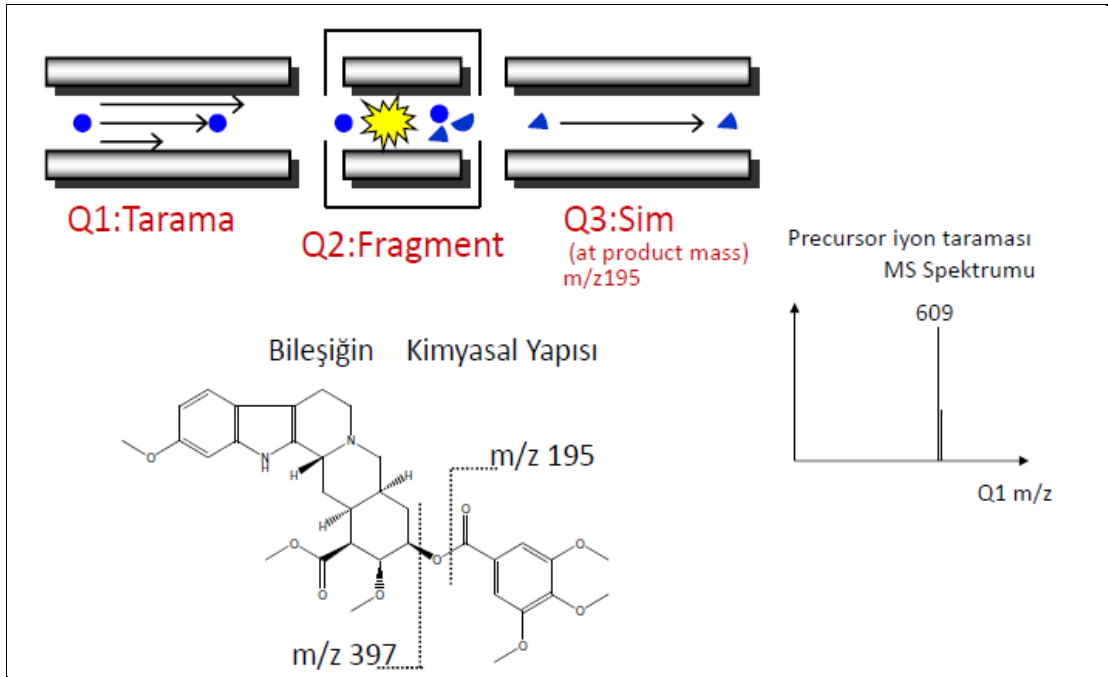
Şekil 1.8. Elektrosprey iyonizasyon.

Bu yüzeyler üzerine sırasıyla ya da birlikte RF (Radyo Frekans) ve DC (Doğrusal Akım) voltajları uygulanır. Bu da analizi istenen moleküllerin hızını ve yörüngesini ayarlamaktadır. Şekil 1.6’da temel kütle analizör bileşenleri gösterilmiştir.



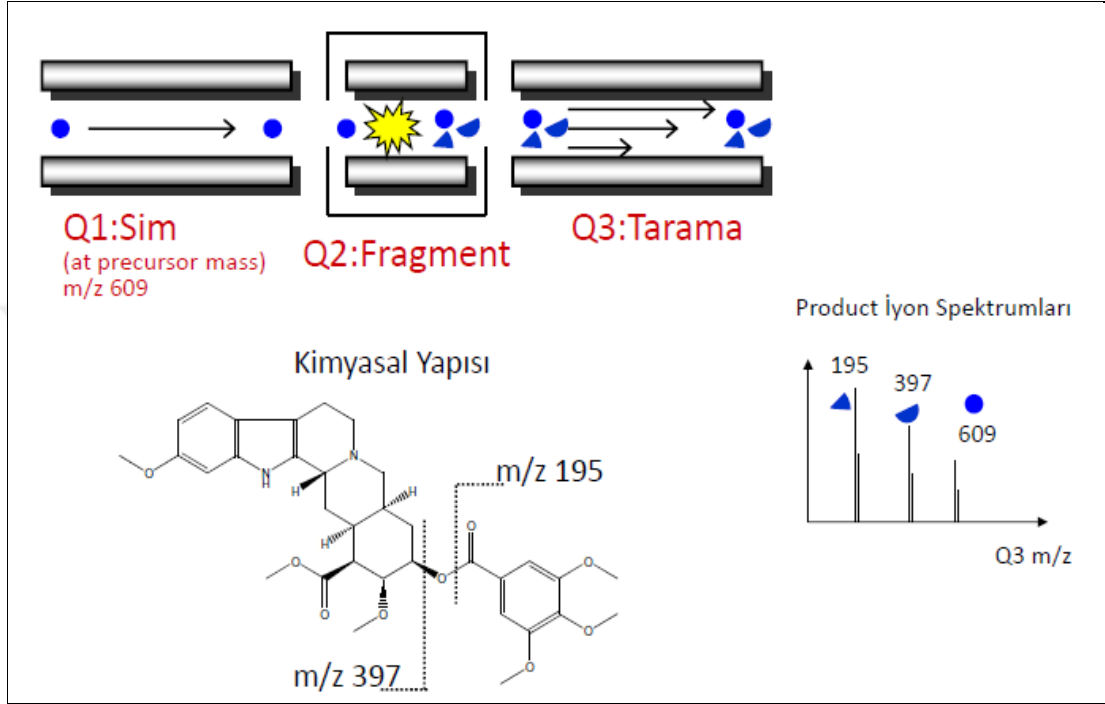
Şekil 1.9. Üç kademeli kuadrapol içeren bir kütle analizörü.

Giriş kuadrapolünde (Q1) analizi hedeflenen yüklü ana madde seçilir. Bu madde parçalanma hücresi (Q2) olarak isimlendirilen ikinci kuadrapolde azot gazı altında parçalanır ve fragmentlerine ayrılır. Bu fragmentler üçüncü kuadrapolde (Q3) aynı hıza getirilir ve detektöre yollanırlar.



Şekil 1.10. Örnek bir bileşiğin ana iyon taraması.

LC-MS/MS sisteminde metodun geliştirilmesindeki en önemli basamaklar; analizi yapılacak maddenin özelliklerinin tanımlanması, maddelerin cihaz üzerinde optimizasyonu, maddeye özgü fragmentlerin belirlenmesi, maddenin yapısına uygun analitik kolonun belirlenmesi, kolon üzerindeki akış ve sıcaklık parametrelerin belirlenmesinden oluşmaktadır [24].



Şekil 1.11. Örnek bir bileşiğin ürün iyon taraması.

1.2.3. LC-MS/MS Cihazı ve Çalışma Prensibi

LC-MS/MS (high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry) tekniği ile yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller kütle detektörü ile kantitatif olarak analiz edilmektedir. Analitlerin saflaştırılmış olarak MS/MS modülüne verilebilmesi için gerekli ayrımı sağlayan kromatografi tekniği ile kütle spektrometresinin teşhis kabiliyetinin birleşmiş olması, LC-MS/MS'i, oldukça farklı kütle spektrumuna sahip ancak benzer alıkonma karakterleri olan bileşikler için avantajlı hale getirmektedir. Bu özgülüğü yüksek teknik ile kromatografi ile tek başına mümkün olmayan tayinlerde dahi başarı elde edilebilmektedir.

HPLC nin kütle spektrometrisi ile kombinasyonu, ayrımı tam gerçekleşmemiş analitler için dahi daha kesin bir teşhis ve kantitatif tayin imkanı sağlamaktadır. Aynı kütle/iyon (m/z) oranına sahip pek çok molekülün mevcut olmasına karşın aynı parçalanma

iyonlarına sahip molekül doğada 1/10000 dir. MS/MS tekniği analiz edilen maddeye özgü spesifik bir test olmasının yanısıra çok düşük derişimlerde maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır.

Seçiciliği ve hassasiyetinin gün geçtikçe artması, güvenilir bir yöntem olması, tek bir analiz ile birçok ilaç etken maddesinin aynı anda taranması, analiz süresinin kısa sürmesi, kalitatif ve kantitatif değerlendirmelerin oldukça kolay yapılabilmesi gibi bazı sebeplerden dolayı, LC-MS/MS'ler tercih edilmeye başlanmıştır. LC-MS/MS çalışma prensibi; HPLC cihazından gelen sıvı nebulizer sayesinde spreye dönüşür. İyon kaynağı (ESI) sayesinde iyonlarına dönüşen maddeler kapiler boruda ilerler. Birinci kuadrupol filtred (Q1) m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılır. Bunlara "parent" iyonlar denir. Tayin yapılacak iyon filtreden geçer, diğerleri kalır. Karakteristik "parent" iyonu böylelikle seçilir ve tanımlanır. Filtreden geçen iyon, CID, çarpışma hücresi denilen (Q2) de yüksek saflıkta argon ya da azot gazı ile ikinci parçalanmaya uğrar. Q2, radyo frekanslı bir çarpışma odacığı olup, seçilen parent iyondan parçalanmış bir dizi farklı kütleli iyonlar elde edilir. Bunlara "daughter" iyon denir. Böylece ayrılmış olan "daughter" iyon ikinci MS analizöre gönderilir. Q3 sadece ikinci iyonları filtre eder. Sadece bu ikincil iyonlar detektöre ulaşır ve bu iyondan hem nicel tayin, hem de nitel tayin gerçekleştirilir. Birincil parçalanmadan elde edilen parent iyonun ikinci kez parçalanması ve bu parçalanmadan elde edilen o analite özgü karakteristik iyonun izlenmesi işlemine Çoklu Reaksiyon İzleme (MRM) denir. Oluşan ikincil iyonların miktarı, MRM işleminin duyarlılığını belirler. Q3'ten detektöre gelen iyonlar elektron multiplier channel'da dinodlarla çoğaltılır ve sinyal halinde okunur [25].

1.3. ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRME VE VALİDASYON

1.3.1. Analitik Yöntem Geliştirme

Bir analitik yöntemin geliştirilmesinde ilk adım aynı ya da benzer ekipmanların kullanıldığı yöntemleri içeren literatürlerin araştırılmasıdır. Yeni ya da iyileştirilmiş bir yöntemin geliştirilmesi genellikle ekipmana, çalışılacak analite, hedeflere ve yöntemin gerekliliklerine göre uyarlanır. Yöntem gerekliliklerinin seçilmesi ve ne tür ekipmanın neden seçileceğinin belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca çalışılacak analitik kolon, hareketli faz, dedektör ve miktar tayin yöntemi de yöntem geliştirme aşamasında karar verilmesi gereken noktalardandır. Yeni bir analiz yönteminin geliştirilmesi için birçok geçerli neden bulunmaktadır. Var olan yöntemlerden, literatüre dayalı yaklaşımlardan

her zaman beklenen sonuçlar alınamayabilir. Yöntemler hatalı ya da güvenilirliği düşük olabilir. Pahalı, uzun zaman ve enerji isteyen veya rutin kullanıma uygunsuz, örnekler de yeterli seçiciliğe, duyarlılığa sahip olmayan yöntemler olabilir. Analitik verilerin doğruluğunun ve kesinliğinin yeni ekipman ve tekniklerin ortaya çıkması ile arttırılabileceği düşünüldüğünde kısacası daha duyarlı, hassas, kesin, tekrarlanabilirliğin yüksek olduğu, ekonomik ve uygulanabilirliği kolay ve sorunsuz yöntemlerin geliştirilmesine her zaman gerek duyulabilmektedir.

Yöntemde ilk olarak çalışılacak enstrümanlar ve analitik parametreler belirlendikten sonra yöntemin geliştirilmesi, optimizasyonu ve değerlendirilebilmesi için standartlar kullanılmalıdır. İlk analitik sonuçlar duyarlılık, enjekte edilen miktara karşılık alınan cevaplar, teşhis sınırı, kalibrasyon noktalarının doğrusallığı, varsa çoklu dedektörlerden elde edilen cevap oranları bakımından değerlendirilmelidir. Yöntem geliştirmede özellikleri tanımlanmış ve saflığı bilinen standartların kullanılması önemlidir. Analitik yöntem geliştirilirken, analitin sentez yöntemi, saflaştırma yöntemi, çeşitli pH değerlerindeki davranışı, ekstraksiyon çözeltileri ile geçimsizliği, stabilitesi, fonksiyonel grupların reaksiyonları, çözünürlüğü, molekül ağırlığı ve yapısı, benzer yapıda ve özellikteki diğer maddeler, impüritesi, parçalanma ürünleri, metabolitleri, depolama şartları gibi kimyasal ve fiziksel özelliklerinin ve farmakinetiğinin iyi bilinmesi gerekir.

Optimizasyon aşamasına geçildiğinde ise yöntem geliştirmenin ilk döneminde elde edilen rezolüsyon, pik şekli, asimetri, kapasite, arınma zamanı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve analiti bütün olarak saptama yeteneği gibi değerler ve koşullar geliştirilir. Herhangi bir yöntemi optimize ederken istenilen gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı, doğruluk, kesinlik ve özgünlük mutlaka saptanmalıdır. Yeni yöntemin üstünlüklerinin olduğu gözlenirse, geliştirilmesi ek zaman ve çaba isteyecektir. Yeni yönteme ait analitik veriler uygun görülüyorsa yöntem performansının nicel olarak değerlendirilmesi önemlidir.

Yöntem optimizasyonu, duyarlılığı, simetriyi en yüksek noktaya çıkarmalı, gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı düşürmeli, geniş bir doğrusal aralık oluşturmalı ve doğruluk, kesinlik derecelerini yükseltmelidir. Ayrıca analitin kromatogramdaki diğer bileşenlerden ayrımı, analite ait pik yerinin belirlenmesi, saflığın gösterilmesi, bilgisayar verilerinin toplanması ve açıklanması rutin örnek analizleri için yöntem optimizasyonunun diğer amaçları arasındadır. Optimizasyon kriterleri analizin zamanı

ve maliyetinin düşürülmesi, analitin doğru biçimde belirlenmesi gibi herhangi yeni bir yöntem için gereken hedeflere dayanarak saptanmalıdır.

Yöntem optimizasyonu iki genel yaklaşım ile yapılabilir. Elle ya da bilgisayar kullanılarak optimizasyon gerçekleştirilebilir. Elle yapılan optimizasyonda diğer tüm değişkenler sabit tutulurken sadece bir değişken üzerinde oynamalar yapılır ve alınan yanıttaki değişimler kaydedilir. Bu değişken hareketli ya da sabit faz bileşimi, akış hızı, sıcaklık, kullanılan dalga boyu ve pH olabilir. Tek değişkenli sistem optimizasyonu yavaş, zaman alıcı ve pahalıdır. Ancak bu optimizasyon şekli, değişkenler arasındaki etkileşimin ve uygulanan yöntemin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir. Bilgisayarlı yöntem optimizasyonunda deneysel girdi en aza indirilirken etkinlik en üst düzeydedir. Birçok uygulamada kullanılabilen bu yaklaşım tüm enstrümantal yöntem geliştirmelerde zaman, enerji ve maliyeti önemli derecede düşürebilir.

Optimizasyon yöntem geliştirme işlemi içinde en fazla zaman ve enerji isteyen bölümdür. Tekrarlayıcı işlemler, sabit tekrarlar ve çok sayıda veri toplanmasını gerektirir. Optimizasyon sonuçları genellikle o dönemdeki gereklilikleri karşılarsa da gelecekte ortaya çıkabilecek ihtiyaçları ihmal edebilir. İdeal olarak analizcinin yöntemi geniş bir ölçekte kullanabilmesi ve gelecekte yöntem geliştirmek için deneyleri tekrarlamak zorunda kalmaması için, her yeni yöntemin optimizasyonunu tüm uygulamaları düşünerek yapmalıdır [26].

1.3.2. Metotun Geçerli Kılınması Sırasında Değerlendirilen Genel Metot Performans Özellikleri

1.3.2.1. Seçicilik/Özgünlük

Bir metodun, karışımlar veya matrisler içindeki belirli maddeleri veya molekülleri uygulanan metotta saptayabilmek için, istenilen madde veya moleküle benzer bileşenlerin girişimlerinin olmadığında kullanılabilme derecesi olarak nitelendirilir [27].

1.3.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Zemin gürültüsünden farklı olarak tespit edilen, miktarı belirlenemeyen en küçük analit konsantrasyonudur. Kromatografik analizlerde kural olarak tanımlanan (S/N) oranı, sinyal/gürültü oranı olarak adlandırılır. S/N oranının 3 olduğu değer LOD değeri olarak adlandırılır [27].

1.3.2.3. Alt Tayin Sınırı (LOQ)

Uygun doğruluk ve kesinlik sınırları içerisinde kantitatif olarak tespit edilebilen numunedeki en düşük analit miktarını ifade eder. S/N oranının 10 olduğu değer LOQ değeri olarak adlandırılır. Kromatografik olmadığı bilinen kantitatif tayinlerde alınan sonucun standart sapmasının (SD), kalibrasyon eğrisinin eğimine (S) oranının 10 katı LOQ değeri olarak adlandırılır [27].

1.3.2.4. Yüzde Bağıl Standart Sapma (%RSD), Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Alt Tayin Sınırı (LOQ) Hesaplamaları

Oluşturulan yeni metodun üstünlüğü kalibrasyonların düşük konsantrasyonlarda hazırlanıp daha düşük LOD ve LOQ değerlerinin elde edilmiş olmasıdır. Yapılan analizlere bakıldığında EURACHEM standartlarına mükemmel derecede uygunluğu görülmüştür. Bütün etken maddeler için %RSD değeri 15'nin altında bulunmuştur ve bu da metodun geri kazanımının doğru olduğunu göstermektedir.

%RSD, LOD ve LOQ hesaplama;

$$S'_0 = S_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} \quad (1.1)$$

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Ortalama Pik Alanı}} \times 100 \quad (1.2)$$

S_0 ; tekrarlanabilirliklerden kaynaklanan standart sapma değeri.

S'_0 ; LOD ve LOQ değerlerini saptamak için bulunan standart sapma değeri.

n ; aynı metodun uygulandığı tekrarların sayısı.

n_b ; aynı metodun uygulandığı kör okumaların sayısı.

LOD için; $S'_0 \times 3 = \text{LOD}$

LOQ için; $S'_0 \times 10 = \text{LOQ}$ değeri şeklinde yapılmıştır [28].

1.2.3.5. Doğruluk

Validasyon oluştururken bir metodun doğruluğu, oluşturulan metod ile analiz edilen test sonuçlarının ortalamasının, numunenin içindeki analitin gerçek değerine (konsantrasyon) ne kadar yakın olduğu ile alakalıdır.

En genel manada doğruluk, numune içinde konsantrasyonu bilinen analitin tekrarlanan analizlerinin bildiğimiz konsantrasyona yakınlığıdır. Analizin türüne göre belirlenecek aralıklarda en az üç farklı konsantrasyon noktasında en az beşer kez ölçüm gereklidir.

Ölçüm alt limiti için doğruluk, %20'den fazla sapma göstermemesi gerekmektedir. Ortalama değer ile gerçek değer \pm %15 ölçüm sınırı içinde olmalıdır [29].

1.2.3.6. Çalışma Aralığı

Oluşturulan metodun belirsizliğinde kabul edilebilir değer çıktığında çalışılabilecek aralık olarak adlandırılır. Çalışma aralığının alt tayin sınırı LOQ olarak adlandırılır. Çalışma aralığının en üst sınırı analitik duyarlılıkta belirgin bir bozulmanın gözlemlendiği derişimdir [29].

1.2.3.7. Kalibrasyon Duyarlılığı

Analitik cihazda ölçülen analit derişiminin değişiklik göstermesi halinde yöntemde elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğimi olarak tanımlanır [30].

1.2.3.8. Geri Kazanım

Validasyon parametrelerinden biri olan geri kazanım, numunenin içindeki analitin ön işlemlerden sonra cihazda okunan konsantrasyonu ile gerçek konsantrasyondaki iç veya dış standarttan elde edilen sonucun birbirine oranı olarak kabul edilir. Temel olarak numune hazırlarken uygulanan ön işlemlere ve ekstraksiyona bağlıdır. Numune içindeki analitin geri kazanımının her ne kadar %100 olması istense bile, analitin ve iç standartın geri kazanımı %50-60 ise yeterli ve verimli kabul edilmektedir. Metoda validasyon uygulanırken geri kazanım üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek) elde edilen analit sonuçlarının, ön işlem görmemiş standartlara oranı şeklinde uygulanmaktadır [29].

1.2.3.9. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

Kalibrasyon eğrisi uygulanacak cihazın cevabı ile numune içindeki analitin değeri bilinen konsantrasyonu arasındaki bağı ifade eder. Kalibrasyon eğrisinde kullanılacak olan standartlar, uygulanacak analiz için hazırlanan numune içindeki analitin aynı aşamalarından geçip aynı şekilde hazırlanmalıdır.

Kalibrasyon eğrisi, blank okuma, iç standart içeren matriks numunesi ve beklediğimiz konsantrasyon aralığında alt tayin sınırı (LOQ) de içeren sıfır dışında en az 5 nokta bulundurmalıdır. Blank ve iç standart içeren matriks numunesi kalibrasyon eğrisinde kullanılmamalı, sadece girişim etkisi saptayabilmek için kullanılmalıdır.

Kalibrasyon eğrisi çizimi için LOQ değeri %20'den fazla, LOQ değerinin dışındaki standartlar ise %15'den fazla sapma göstermemelidir. Kalibrasyon eğrisinde en az 5

nokta konsantrasyon değeri bulunmalıdır [29].

Doğrusallık, oluşturulan metodun istediğimiz aralıkta numune içindeki analitin konsantrasyonlarının doğrusallık kazandığı durumdur. Genel olarak regresyon eğrisinin eğiminin varyasyonu olarak gösterilir [27].

1.2.3.10. Kesinlik

Oluşturulacak metottaki sonuçların birbirine yakınlığını ifade eder. “Ölçümün tekrarlanabilirliği” ve “ölçümün tekrar üretilebilirliği” validasyon standartlarında kesinlik ölçüsü olarak bilinir.

Tekrarlanabilirlik, analiz sonuçlarının birbiri arasında oluşturduğu en küçük varyasyon olarak adlandırılır ve bir analizcinin aynı cihazla aynı şartlarda aynı sürede gerçekleştireceği analizlerin dağılımının bir tanımlamasıdır.

Tekrar üretilebilirlik, analiz sonuçlarının birbiri arasında oluşturduğu en yüksek varyasyon olarak adlandırılır [31].

1.2.3.11. Matriks etkisi ve Proses Etkinliği

Analizi yapılması hedeflenen analit dışında bir analitin varlığına veya numunedeki diğer girişim maddelerinin varlığına yanıt olarak doğrudan veya dolaylı değişim girişimidir.

Standart çözelti içindeki analit ile plazma gibi biyolojik matriksdeki aynı analitin LC-MS/MS analizlerinde farklı yanıtlar oluşturması şeklinde tanımlanabilir. 2018 yılında Rudzki ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Standart sapmanın %15’i sınır olarak kabul edilmiştir.

1.2.3.12. Stabilité

Uygulanacak metot için oluşturulan numunelerin uzun veya süreli saklanması, belirlenen (istenilen saklama koşullarında) ve sonrasında çözme, tekrardan donma gibi olaylardan sonra analitik analiz boyunca numune içindeki analitin stabilitesi olarak tanımlanır [31].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. KULLANILAN KİMYASALLAR VE STANDART ÇÖZELTİLER

Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasallar ve standart çözeltiler.

Kimyasallar ve Standartlar	Firma	Seri Numarası	Son Kullanma Tarihi
Asetonitril	Sigma-Aldrich	75-05-8	06.2020
Su	Human Ultrapure	-	-
Metanol	Sigma-Aldrich	67-56-1	02.2020
Amonyum format	Panreac	143482.1211	02.2020
Formik Asit	Sigma-Aldrich	64-18-6	02.2020
Paroksetin	Sigma-Aldrich	1435728-64-5	02.2020
Fluoksetin HCl	Sigma-Aldrich	56296-78-7	09.2019
Duloksetin HCl	Sigma-Aldrich	136434-34-9	08.2019
Sitolapram	Sigma-Aldrich	59729-32-7	02.2020
Essitolapram	Sigma-Aldrich	219861-08-2	10.2019
Venlafaksin HCl	Sigma-Aldrich	99300-78-4	10.2019
Sertralin	Sigma-Aldrich	79559-97-0	12.2019
Ketiapin	Sigma-Aldrich	111974-72-2	02.2020
Opipramol	Sigma-Aldrich	315-72-0	02.2020
Risperidon	Sigma-Aldrich	106266-06-2	12.2019

2.2. KULLANILAN CİHAZLAR

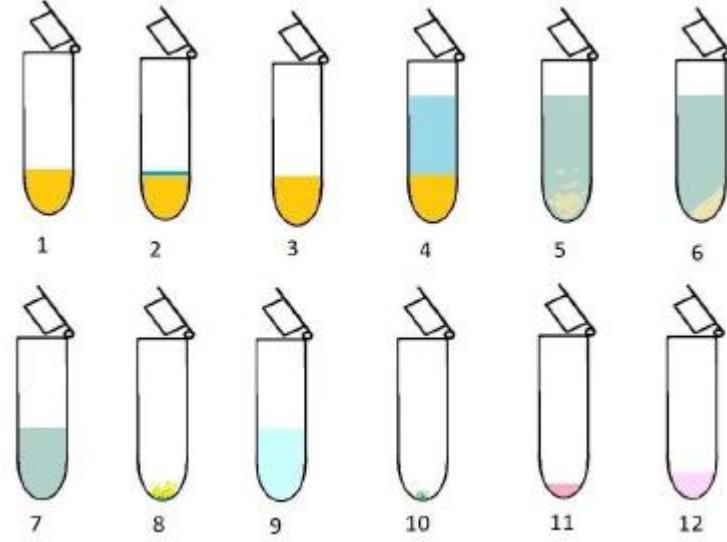
Çizelge 2.2. Kullanılan cihazlar.

Cihaz	Marka/Model
Likit sistem (LC)	Shimadzu DGU-20A3R
Kütle sistem (MS/MS)	Shimadzu Upgrade with UF-Lens LC- MS/MS 8030/8040
Kolon	XB-C18 Welch 2.1x50mm,1.8µm
Yazılım	Labsolution
Ultra saf su cihazı	Human Ultrapure
Hassas terazi	Precisa XB 220A
Mikropipetler	Eppendorf, Brand
Vorteks	Jeio Tech
Buzdolabı	Profilo
Derin dondurucu	Uğur
Santrifüj	Nüve NF 800
Ultrasonic banyo	Lapcompanion UCP-02
pH metre	XS Instruments 50+
Filtre	Welch

2.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

2.3.1. Örnek Numunelerin Hazırlanması

Bu çalışmamızda cihaza enjeksiyon yapılan tüm çözeltiler insan kanının serum kısmı ile hazırlandı. Ana iyon tarama, MRM Optimizasyonu, kalibrasyon çözeltileri, metot validasyonu için verilen tüm kan numunelerden 500'er µL (1) alınarak üzerlerine 50'şer ppb internal standart eklendi (2). Tüm örnekler 5 dakika vortekslendikten sonra 1 saat süreyle 35°C'de su banyosunda bırakıldı (3). Su banyosu sonrası 1'er mL etil asetat eklendi (4). 5 dakika vortekslendikten sonra 10 dakika süreyle + 4 °C'de bekletildi (5).



Şekil 2.1. Numune ön hazırlık şeması.

Örnekler 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip (6), üst fazdan 500’er μL farklı tüplere alınarak (7) evaporatörde 2 saat boyunca azotta soğuk uçurma yapıldı (8). 200’er μL metanol ve 200’er μL etil asetatla çözülen örnekler 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip üst fazı farklı tüplere alınarak (9) 30 dakika evaporatörde azotta soğuk uçurma yapıldı (10). 200’er metanol eklenen örnekler (11) 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip üst fazı farklı tüplere alınarak (12), 10 μL enjeksiyon hacmiyle analiz edildi.

2.3.2. Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

2.3.2.1. Ana stok çözeltisi ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

Bütün etken maddelerin iç standartlarından 10 mg alınıp son hacim 100 mL olacak şekilde %99,9 saflıkta metanol kullanılarak çözüldü.

2.3.2.2. Ara stok çözeltisi ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

Ana stok çözeltiden 1 mL alınıp %99,9 saflıkta metanol ile 100 mL ye tamamlandı.

Kalibrasyon eğrileri tanımlanacak olan Paroksetin, Fluoksetin, Duloksetin, Sitolapram, Essitolapram, Venlafaksin, Sertralin, Ketiapin, Opipramol, Risperidon ilaç etken maddelerinin ara stok çözeltilerinden 1 mL alınıp 2 mL’ye insan kanının serum kısmı ile tamamlandı. Elde edilen 500 ng.mL^{-1} çözelti, insan kanı kullanılarak 100 ng.mL^{-1} , 50 ng.mL^{-1} , 25 ng.mL^{-1} , 10 ng.mL^{-1} , 5 ng.mL^{-1} , $2,5 \text{ ng.mL}^{-1}$, 1 ng.mL^{-1} konsantrasyonlarına ayarlandı. Her çözelti kodlanır ve kalibrasyon eğrisi çizimi için hazır hale getirildi.

2.3.2.3. Mobil Fazların Hazırlanması

Mobil faz A : 2 mM amonyum format çözeltisi, formik asit oranı %0,1 olacak şekilde hazırlandı ve 10 dakika süre ile ultrasonik banyoda bekletildi.

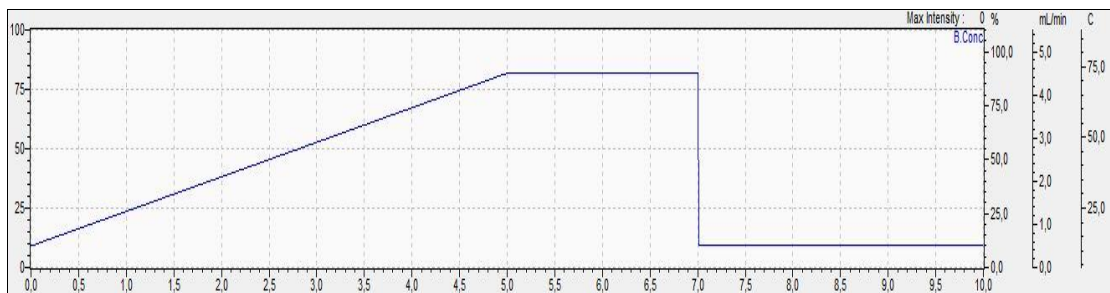
Mobil faz B : Son hacimde %0,1'lik formik asit olacak şekilde 1L %99,9 saflıkta asetonitril hazırlandı ve ultrasonik banyoda 10 dakika süre ile bekletildi.

Enjeksiyon portu yıkama çözeltisi : Ultra saf su ile %99,9 saflıkta asetonitril çözeltisi 1:1 oranında karıştırıldı ve 5 dakika ultrasonik banyoda bekletildi.

2.4. LC- MS/MS ÇALIŞMA ŞARTLARI

Akış hızı	:	0,400 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	:	10 µL
Analiz süresi	:	10 dakika
Kolon fırın sıcaklığı	:	40,0 °C
Mobil faz A	:	%0,1'lik formik asit - 2 mM Amonyum format
Mobil faz B	:	%0,1'lik formik asit- %99,9'luk asetonitril
Collision energy (CE):		-35
Collision gas	:	N ₂
Dwell time	:	100 milisaniye
İyon Kaynağı	:	Elektrosprey iyonizasyon (ESI)
Pompa Programı	:	Gradient

2.5. LC-MS/MS SIVI SİSTEMİ AKIŞ ÖZELLİKLERİ



Şekil 2.2. LC/MS-MS sıvı akış sistemi akış diyagramı.

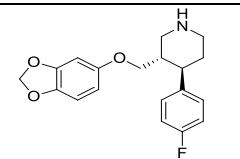
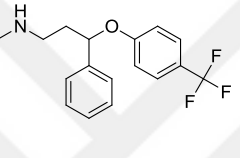
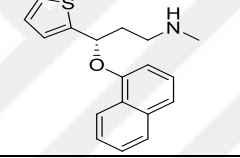
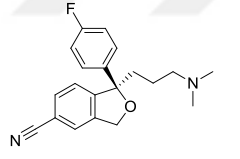
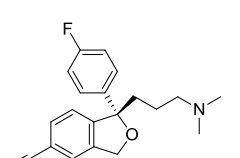
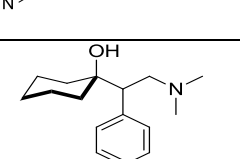
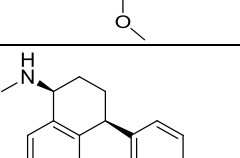
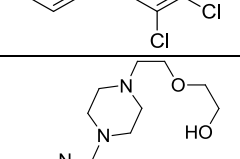
Çizelge 2.3. LC-MS/MS sıvı sistemi akış tablosu.

Zaman Tablosu	Zaman (dk)	Akış (ml/dk)	Kontrol	Mobil Faz A(%)	Mobil Faz B(%)
1	0,01	0,4	başlat	-	-
2	0,02	0,4	MS'e geçiş	-	-
3	5	0,4		10	90
4	7	0,4		10	90
5	7,01	0,4		90	10
6	10	0,4	bitir	-	-

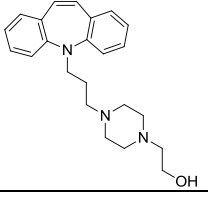
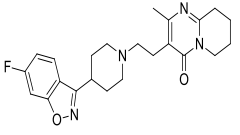
Oluşturulacak metot için geliştirilen sıvı akış diyagramı Şekil 3.1'de verilmiştir. Enjeksiyon hacmi 10 µL belirlenmiş olup, mobil faz akışı 0,4 mL'dir. Metot da gradiyent dönüşüm esas alınmış olup; Tampon çözelti olarak 2 mM amonyum format içerisinde %0,1 formik asit (mobil faz A) çözeltisi, Hareketli faz olarak % 0,1 formik asit içeren asetonyril çözeltisi kullanılmıştır. Metota %10 asetonyril (mobil faz B) ile başlanarak 5. dakikada %90 asetonyril olacak şekilde devam edilmiştir. 7. dakikaya kadar %90 asetonyril ile devam edilip daha sonra metot optimizasyonu yani daha sonraki analizin şartlanması için 7,01. dakikada tekrar %10 asetonyril - %90 tampon çözelti ile devam edilmiş olup 10. dakikada metot sonlandırılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 3.1. Etken maddelerin MRM parametreleri.

Etken Madde	Molekül Kütlesi	Molekül Şekli	Ana İyon	Ürün İyon	Giriş Basınç (Q1)	Çıkış Basınç (Q2)	Kapiler Voltaj (CE)	İyonlaşma Türü	Dwell Time
Paroksetin	329,37		330,10	69,90	-16	-24	-35	+	10
				192,20	-16	-15	-32		
Fluoksetin	309,33		310,10	117,10	-20	-20	-53	+	10
				91,10	-20	-19	-54		
Duloksetin	297,41		298,12	267,08	-18	-22	-35	+	10
				156,04					
Sitolapram	324,39		325,20	109,10	-16	-18	-31	+	100
				262,10	-16	-30	-16		
Essitolapram	324,39		325,20	109,10	-16	-18	-31	+	100
				262,10	-16	-30	-16		
Venlafaksin	277,40		278,20	121,10	-30	-21	-30	+	20
				58,00	-30	-22	-22		
Sertralin	306,23		306,10	159,00	-23	-29	-30	+	20
				275,10	-23	-17	-10		
Ketiapin	383,51		384,20	253,10	-19	-28	-23	+	50
				221,15	-19	-25	-36		

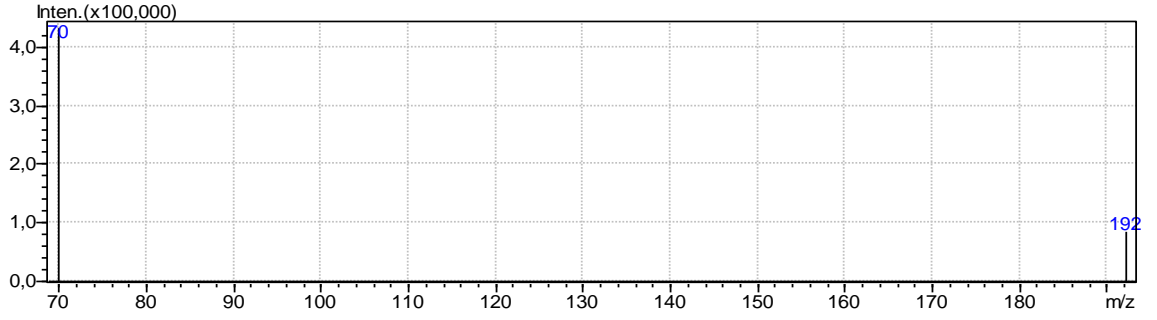
Çizelge 3.1 (devam). Etken maddelerin MRM parametreleri.

Opipramol	363,50		364,20	143,20	-18	-14	-30	+	50
				171,20	-30	-17	-21		
Risperidon	410,49		411,20	191,10	-20	-12	-30	+	50
				148,20	-20	-17	-40		

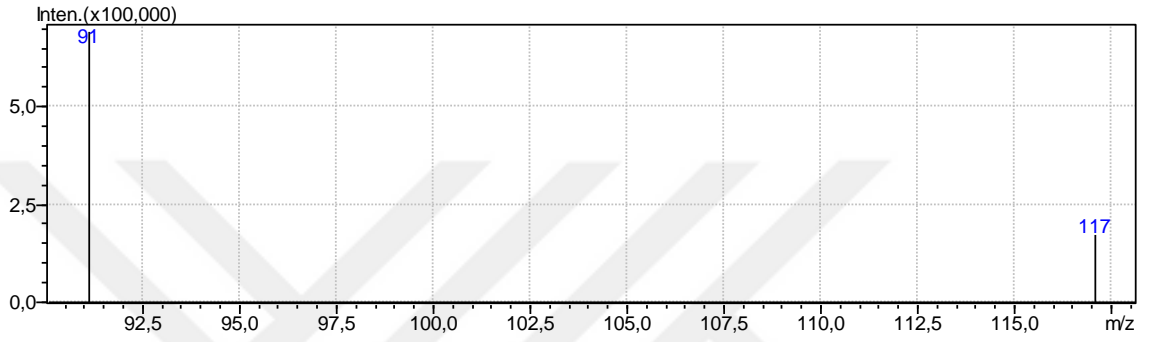
Yapılan çalışmalar sonucu 10 dakikalık enjeksiyon süresinde 10 etken maddenin de çıkartıldığı bir LC/MS-MS yöntemi oluşturulmuş ve valide edilebilmiştir. Validasyon çalışmaları sonucunda etken maddelerin ana iyonları, ürün (yavru) iyonları Q1 (giriş) ve Q3 (çıkış) pre bias voltajları, collision energy, dwell time, pause time ve interface parametreleri LC/MSMS cihazının yazılımı kullanılarak optimum hale getirilerek sonuçlar tablo 5 de verilmiştir. Tüm moleküller için dwell time ve pause time sırasıyla 10, 20, 50, 100 milisaniye olarak belirlenmiştir.

3.1. MRM SPEKTRUMLARI

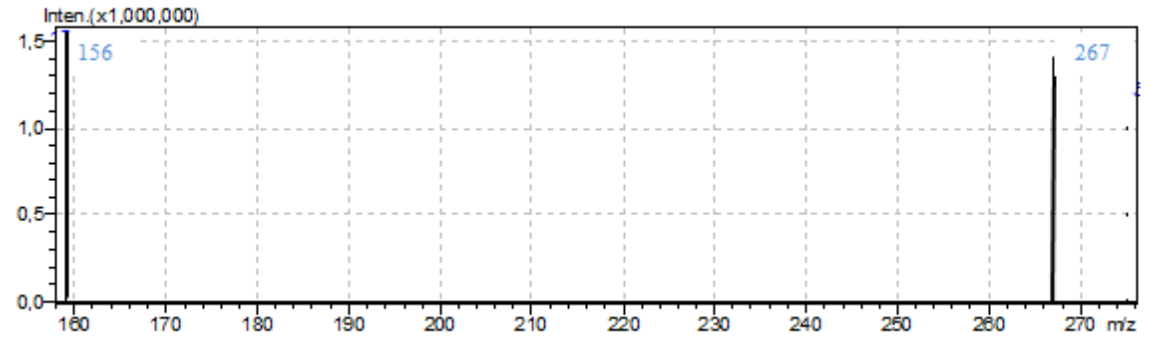
Çizelge 3.1.'de ana iyon değerleri verilen etken maddelerin LC-MS/MS cihazında 'product ion scan' modunda taratıldıktan sonra ana iyondan kopan en büyük ve anlamlı parçaların MRM geçiş kromatogramları Şekil 3.1'de verilmiştir. MRM geçişlerini elde etmek için ilk olarak etken maddelerin ana iyonları tek tarama (Q1 scan mod) olarak yapılmış olup daha sonra ana iyonlar yavru iyonlara parçalandığında aşağıdaki spektrumlar elde edilmiştir. Daha sonra MRM kromatogramlarında bulunan en yüksek pikler ürün iyon olarak seçilip, her bir ürün iyonu farklı collision energy ile şartlanıp metot optimize edilmiştir. Bu türevlendirme metot optimizasyonu açısından çok önemlidir. Etken maddelerin ana moleküllerinin en zayıf yerlerinden kırılmasıyla oluşan yavru iyonların da taranıp metoda valide edilmesi, oluşturulan metodun hassasiyetini mükemmel hale getirmektedir. Başka çalışmalarda elde edilen ana ve yavru iyonların farklı olmasının sebebi cihazın markası, voltajı, pompa değerleri gibi dış etkenlerden veya kullanılan standartın safsızlığı gibi iç etkenlerden kaynaklandığı bilinmelidir.



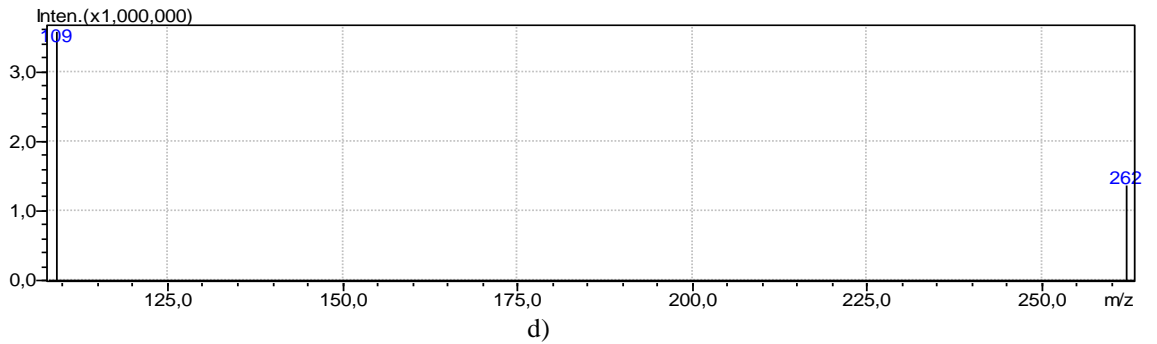
a)



b)

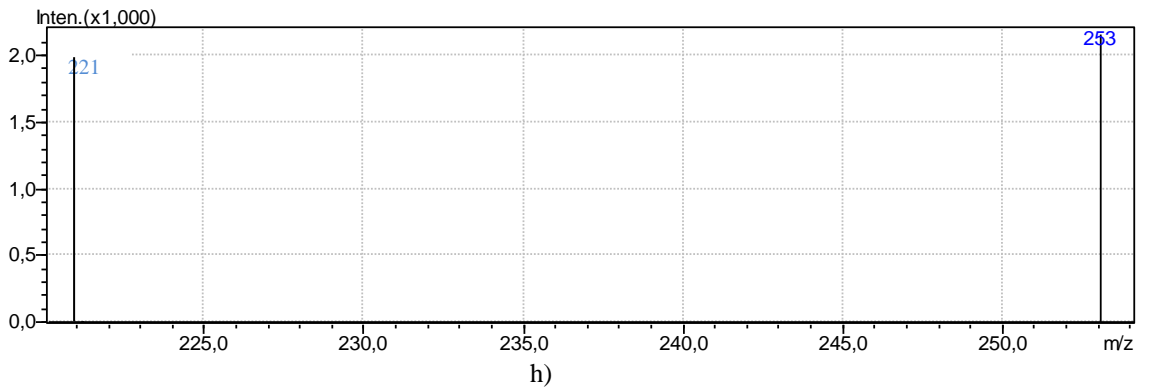
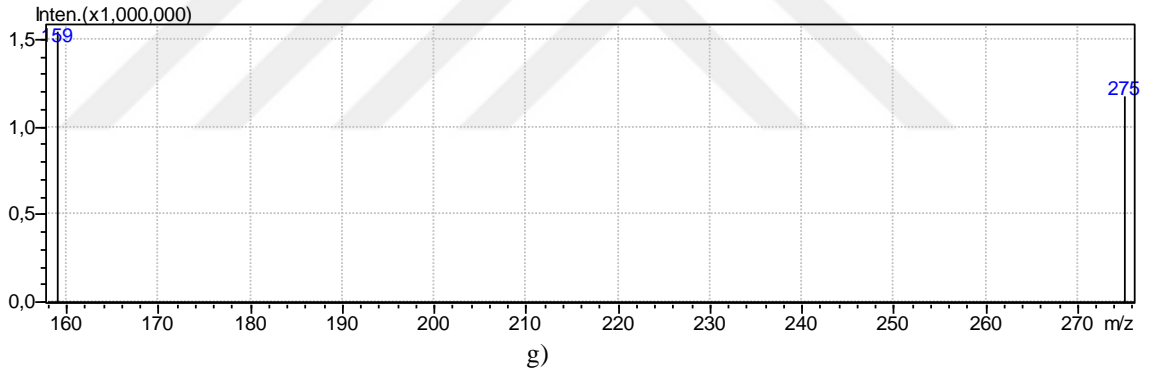
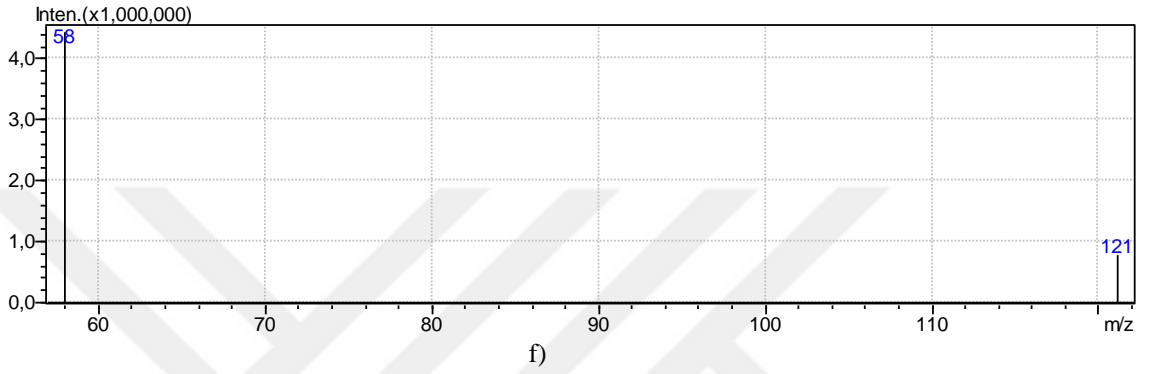
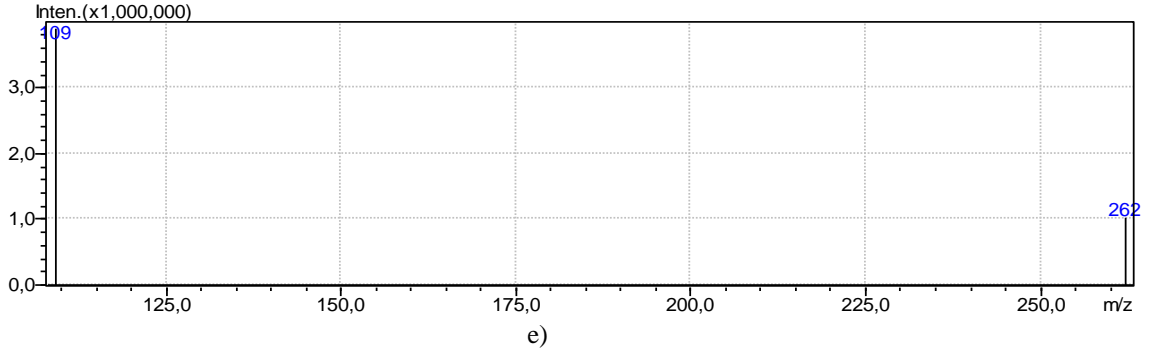


c)

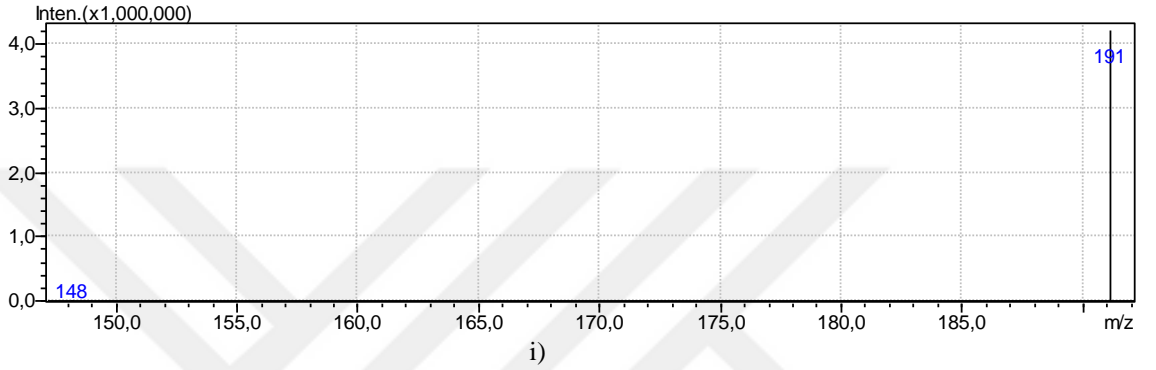
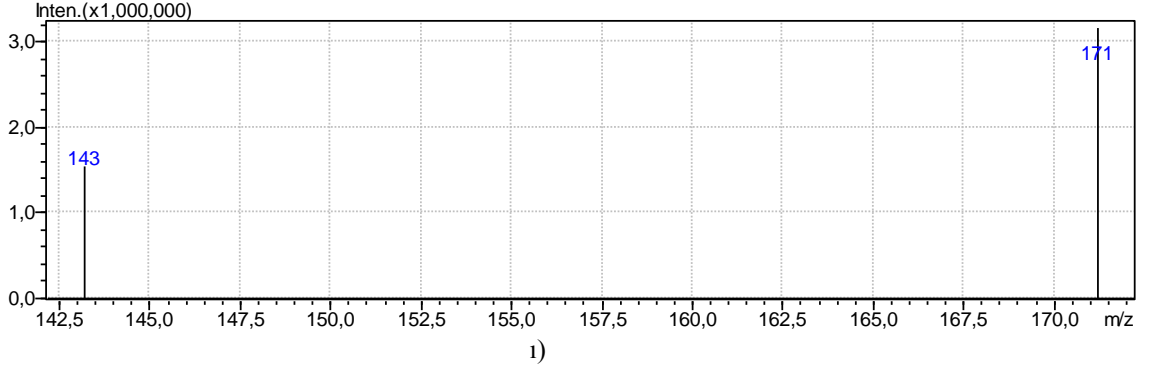


d)

Şekil 3.1. a) Paroksetin b) Fluoksetin c) Duloksetin d) Sitolapram e) Essitolapram f) Venlafaksin g) Sertralin h) Ketiapin i) Opipramol i) Risperidon 100 ng.mL⁻¹ alınan çözeltilerinin MRM spektrumları.



Şekil 3.1 (devam). a) Paroksetin b) Fluoksetin c) Duloksetin d) Sitolapram e) Essitalopram f) Venlafaksin g) Sertraline h) Ketiapin i) Opipramol i) Risperidon 100 ng.mL⁻¹ alınan çözeltilerinin MRM spektrumları.

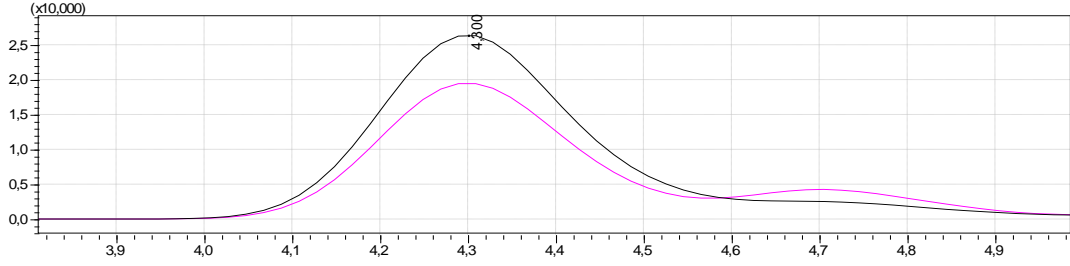
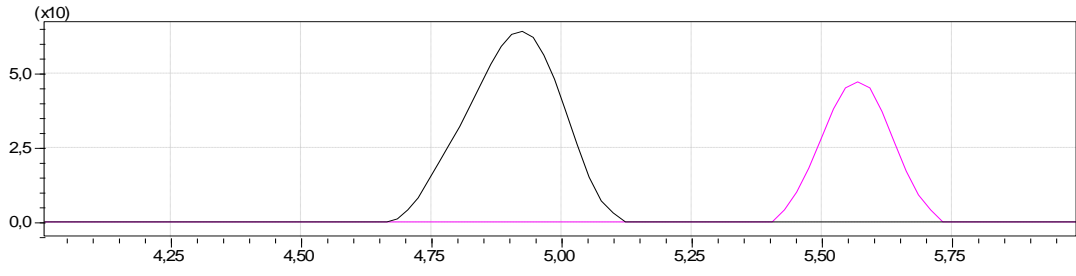


Şekil 3.1 (devam). a) Paroksetin b) Fluoksetin c) Duloksetin d) Sitolapram e) Essitolapram f) Venlafaksin g) Sertralin h) Ketiapin i) Opipramol i) Risperidon 100 ng.mL⁻¹ alınan çözeltilerinin MRM spektrumları.

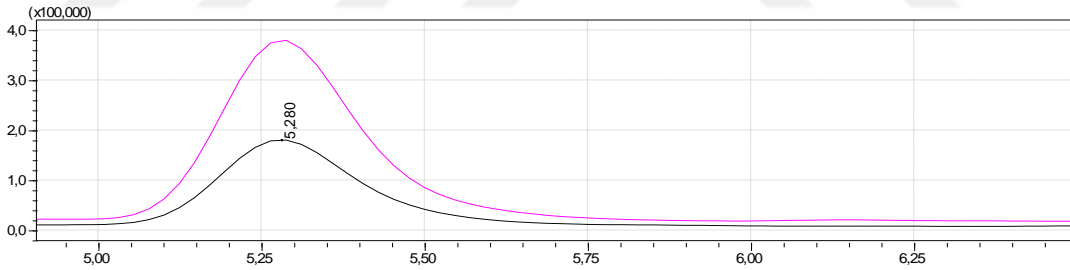
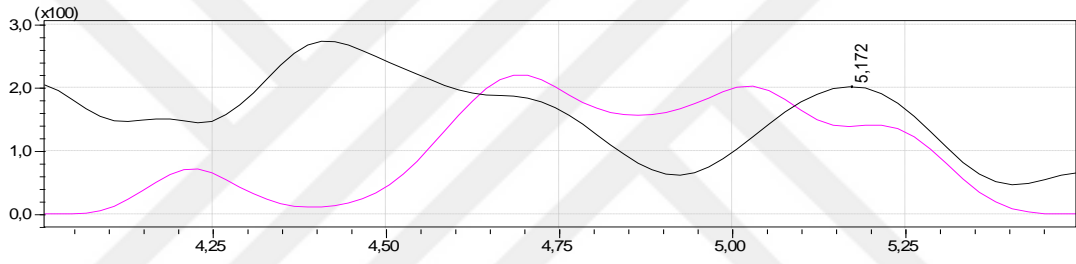
3.2. ÖZGÜLLÜK/SPEŞİFİKLİK

Çalışılan biyolojik örneklerden kaynaklanabilecek olası girişimlerin gözlemlenmesi amacıyla kör kan örnekleri 10'ar ($n \geq 6$) kez örneklenerek LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Kromatogramlarda tüm etken maddeler için belirlenen alıkonma zamanlarında matriksten ve çözücüden kaynaklanan herhangi bir girişim olup olmadığı incelenmiştir.

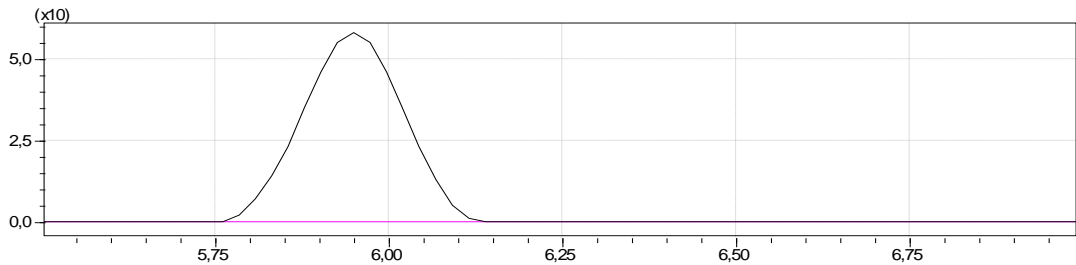
Tüm etken maddelerin kanın serum hali hazırlanarak son konsantrasyonları 100 ng.mL⁻¹ olacak şekilde LC-MS/MS cihazına verilerek kolonlu okuma yapılmış ve Şekil 3.2'de ki spektrumlar elde edilmiştir. Girişimlerin gözlemlenebilmesi için tüm etken maddelerin kan serumunda kör okuması yapılmıştır. Spektrumlara bakıldığında etken maddelerin kendine özgü alıkonma zamanlarında hiçbir girişim tespit edilmemiştir.



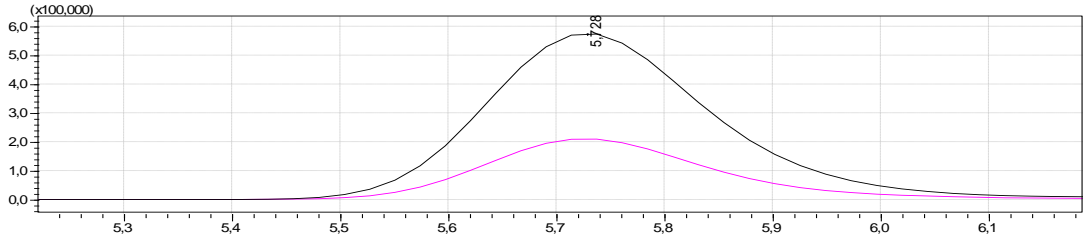
a)



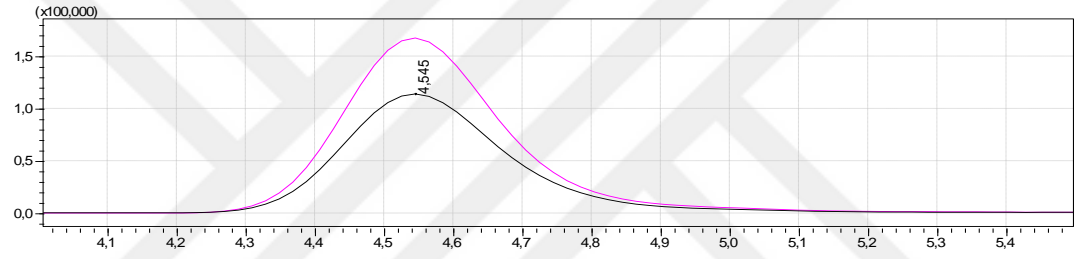
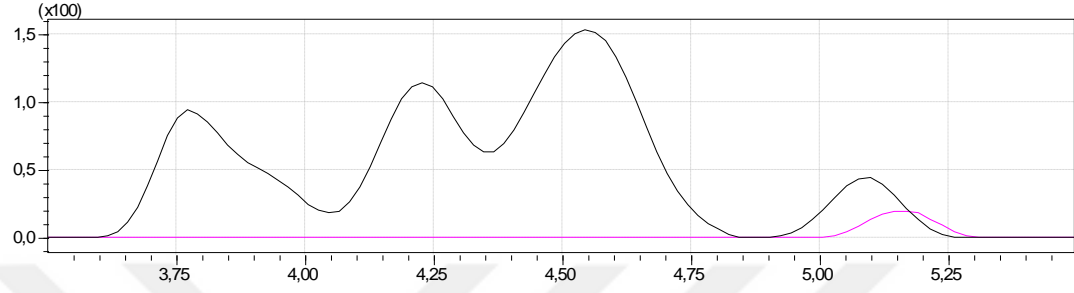
b)



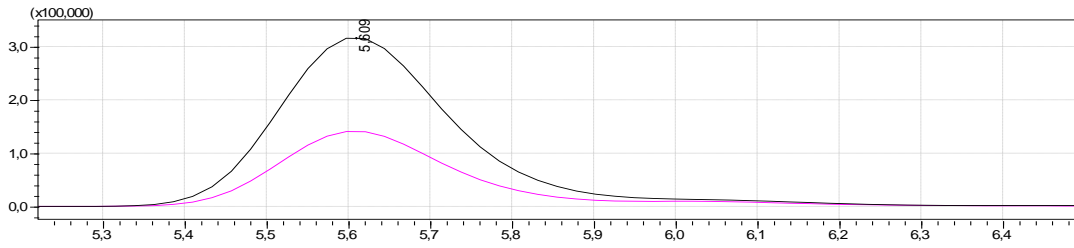
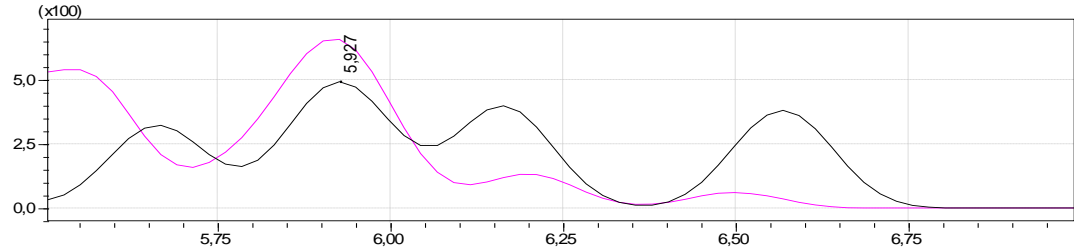
Şekil 3.2. Alıkonma grafikleri a) Paroksetin b) Fluoksetin c) Duloksetin d) Sitolapram e) Essitolapram f) Venlafaksin g) Sertralin h) Ketiapin ı) Opipramol i) Risperidon kör numune ve 100 ng.mL^{-1} standart spike edilmiş çözeltilerinin alıkonma zamanlarını içeren LC-MS/MS kromatogramları.



c)

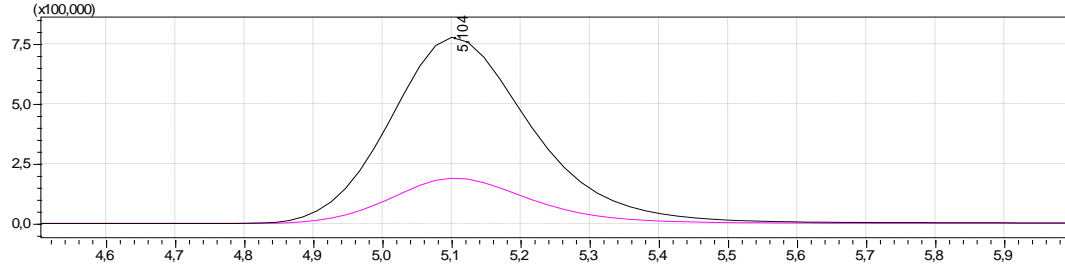
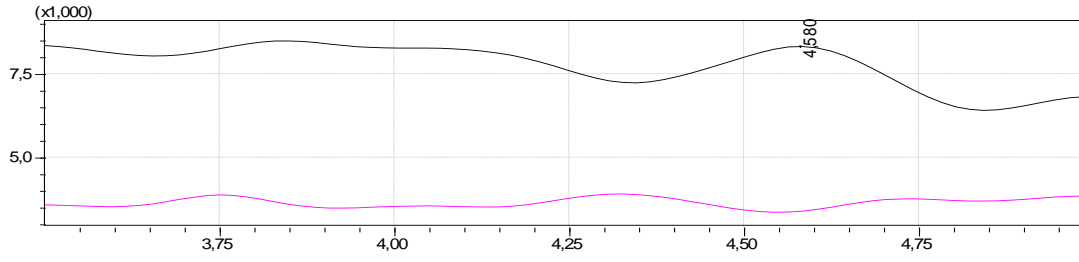


d)

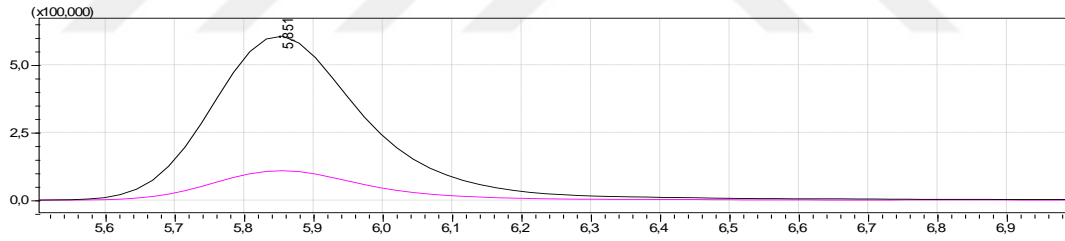
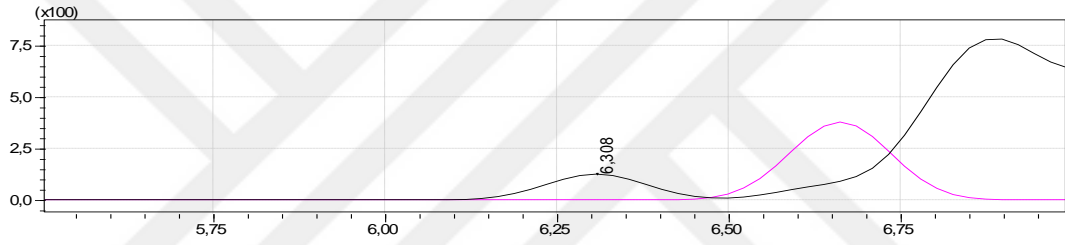


e)

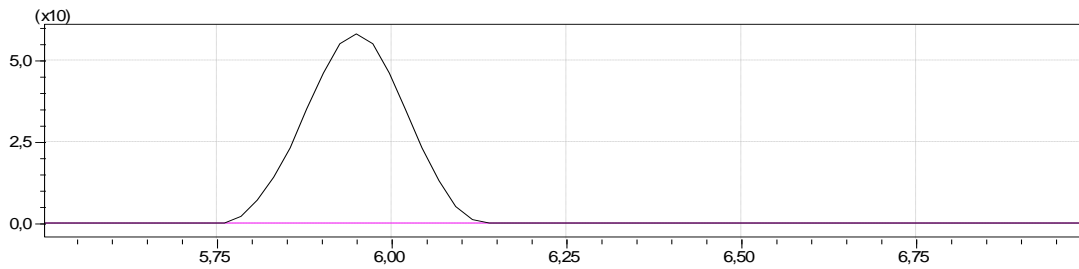
Şekil 3.2 (devam). Alıkonma grafikleri a) Paroksetin b) Fluoksetin c) Duloksetin d) Sitolapram e) Essitolapram f) Venlafaksin g) Sertralin h) Ketiapin ı) Opipramol i) Risperidon kör numune ve 100 ng.mL^{-1} standart spike edilmiş çözeltilerinin alıkonma zamanlarını içeren LC-MS/MS kromatogramları.



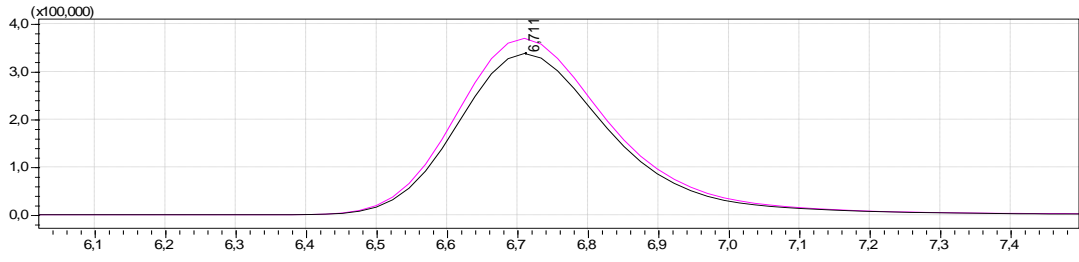
f)



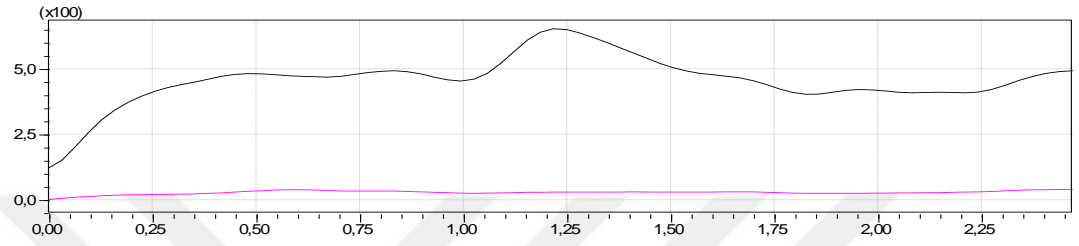
g)



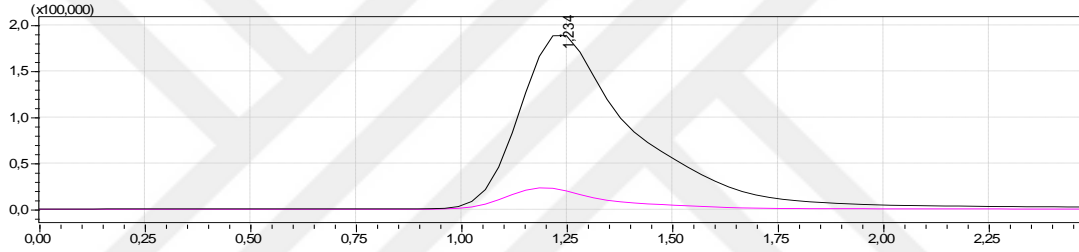
Şekil 3.2 (devam). Alıkonma grafikleri a) Paroksetin b) Fluoksetin c) Duloksetin d) Sitolapram e) Essitolapram f) Venlafaksin g) Sertralini h) Ketiapini i) Opipramol i) Risperidon kör numune ve 100 ng.mL^{-1} standart spike edilmiş çözeltilerinin alıkonma zamanlarını içeren LC-MS/MS kromatogramları.



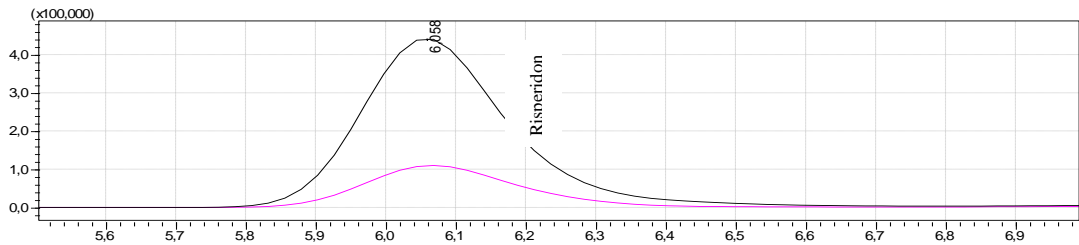
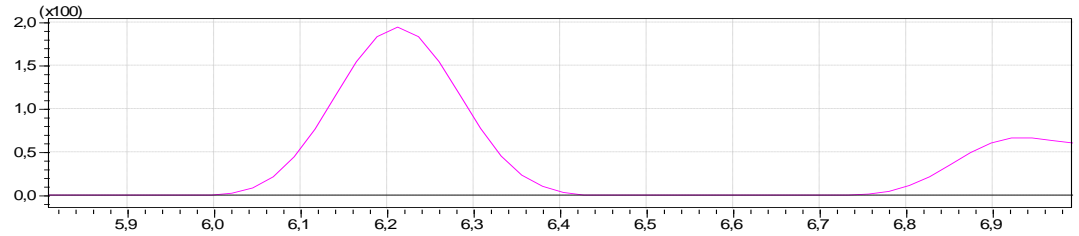
h)



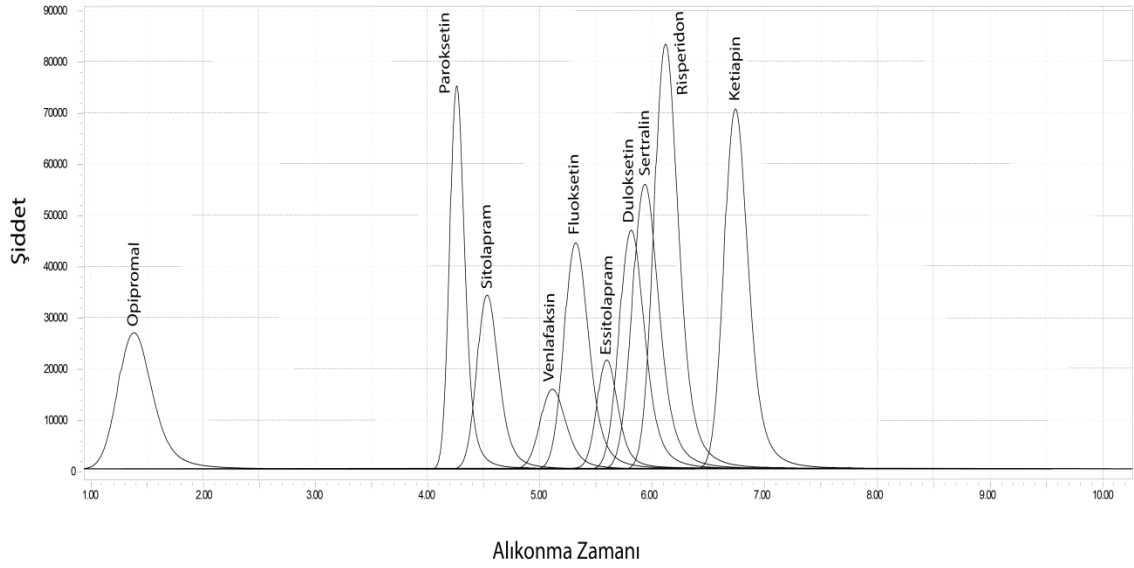
i)



i)



Şekil 3.2 (devam). Alıkonma grafikleri a) Paroksetin b) Fluoksetin c) Duloksetin d) Sitolapram e) Essitolapram f) Venlafaksin g) Sertralin h) Ketiapin i) Opipramol j) Risperidon kör numune ve 100 ng.mL^{-1} standart spike edilmiş çözeltilerinin alıkonma zamanlarını içeren LC-MS/MS kromatogramları.

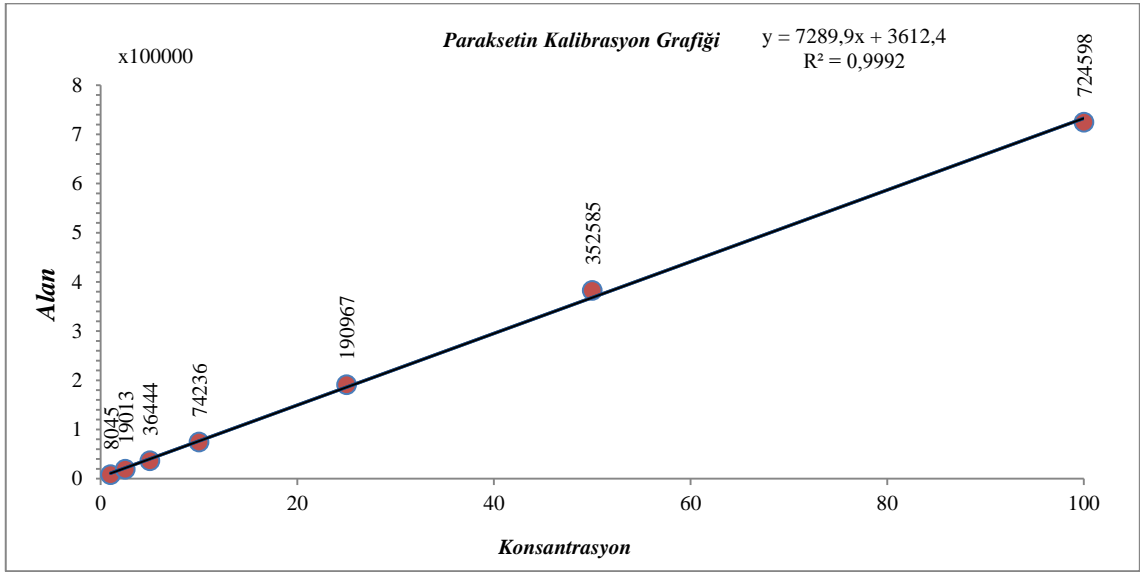


Şekil 3.3. Etken maddelerin eş zamanlı kromatogramı.

3.3. KALİBRASYON EĞRİLERİ VE DOĞRUSALLIK

Bölüm 2.3.2’de anlatıldığı üzere metodun doğrusal aralığının hesaplanması için 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 ng.mL⁻¹ konsantrasyonlar sağlanacak şekilde tüm etken maddelere karşılık gelen pik alanı ile IS pik alanı arasındaki grafikler Şekil 3.3’den Şekil 3.12’e kadar gösterilmiştir. Yedi farklı konsantrasyondan her birinde üçer ölçüm yapılmıştır. Paroksetin, Fluoksetin, Duloksetin, Sitolapram, Essitolapram, Venlafaksin, Sertralin, Ketiapin, Opiromol, Risperidon maddeleri için kanın serum halinde çizilmiş olan kalibrasyon eğrileri görülmektedir. Nokta konsantrasyonların düşük tutulması bize daha düşük dedeksiyon limitleri için avantaj sağlamıştır. İlk ve son konsantrasyon arasında 100 kat olmasına rağmen kalibrasyon eğrilerinin regresyon katsayıları tüm etken maddeler için 0,9999 seviyelerinde tutulması bize doğruluk ve geri kazanım için mükemmel sonuçlar vermiştir.

3.3.1. Paroksetin

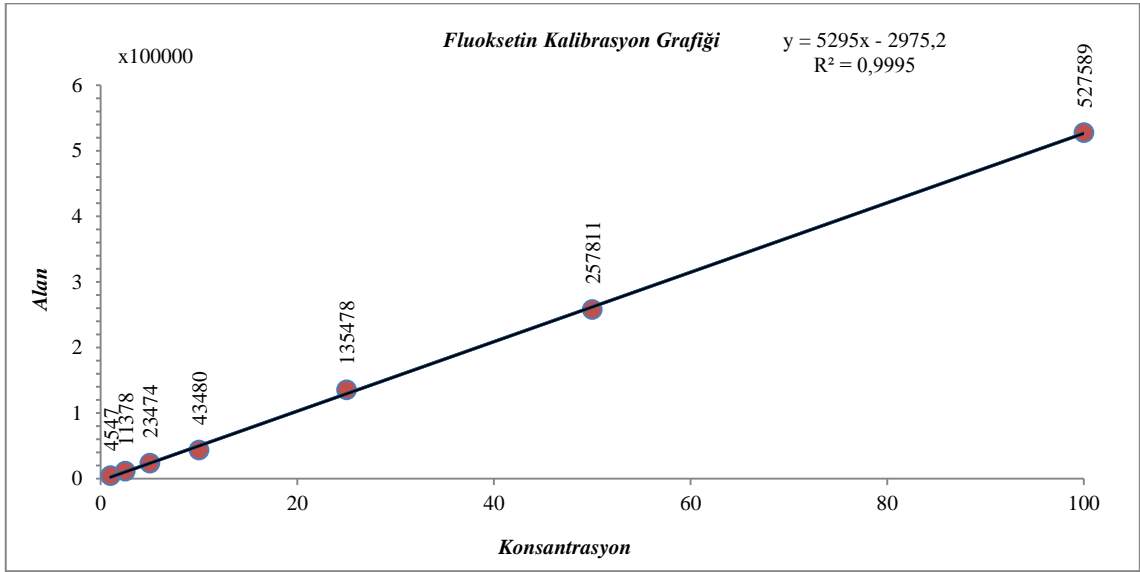


Şekil 3.4. Paroksetin kalibrasyon eğrisi grafiği.

Çizelge 3.2. Paroksetin etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.

Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Tekrar	Alan	Ortalama Alan
1	1	7.895	8.045
	2	8.195	
	3	8.045	
2,5	1	19.066	19.013
	2	18.996	
	3	18.976	
5	1	36.744	36.444
	2	35.849	
	3	36.739	
10	1	76.478	74.236
	2	74.048	
	3	72.183	
25	1	191.198	190.967
	2	189.169	
	3	192.534	
50	1	385.658	382.585
	2	379.656	
	3	382.441	
100	1	734.070	724.598
	2	721.247	
	3	718.478	

3.3.2. Fluoksetin

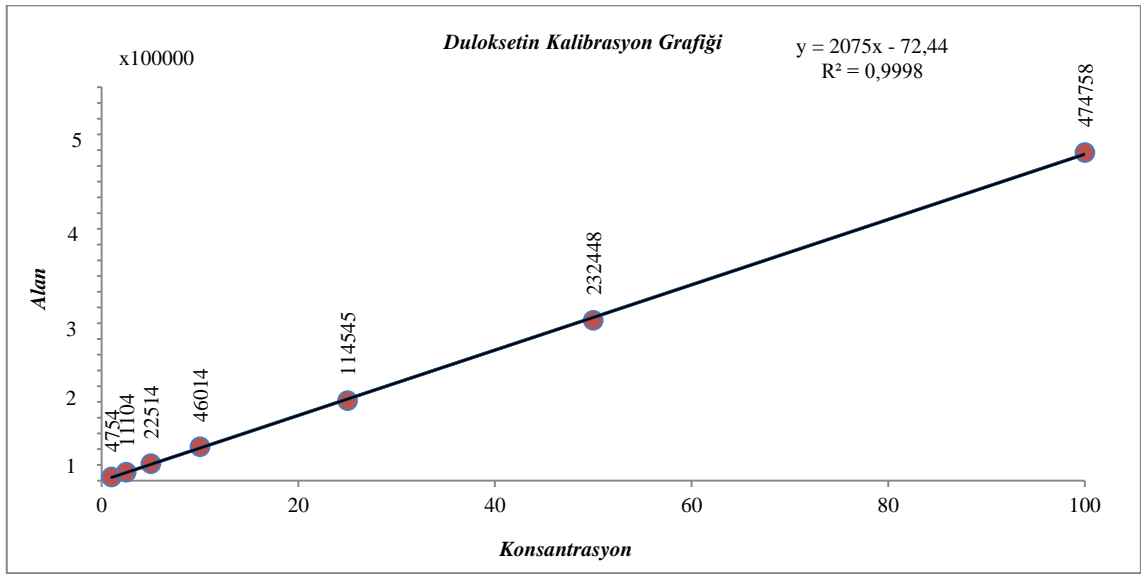


Şekil 3.5. Fluoksetin kalibrasyon eğrisi grafiği.

Çizelge 3.3. Fluoksetin etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.

Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Tekrar	Alan	Ortalama Alan
1	1	4.852	4.547
	2	4.547	
	3	4.242	
2,5	1	11.127	11.378
	2	11.045	
	3	11.963	
5	1	24.141	23.474
	2	22.872	
	3	23.410	
10	1	45.320	43.480
	2	40.147	
	3	44.974	
25	1	139.821	135.478
	2	131.135	
	3	135.478	
50	1	217.610	257.811
	2	257.811	
	3	298.012	
100	1	519.301	527.589
	2	547.589	
	3	515.877	

3.3.3. Duloksetin

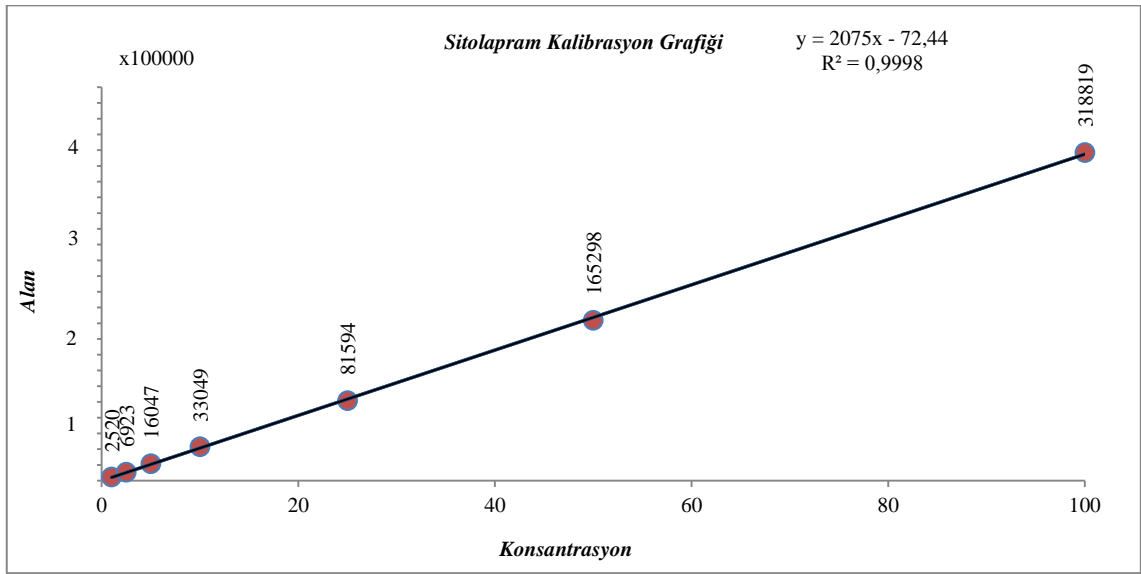


Şekil 3.6. Duloksetin kalibrasyon eğrisi grafiği.

Çizelge 3.4. Duloksetin etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.

Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Tekrar	Alan	Ortalama Alan
1	1	4.582	4.754
	2	4.927	
	3	4.754	
2,5	1	10.982	11.104
	2	11.104	
	3	11.226	
5	1	22.514	22.514
	2	21.076	
	3	23.951	
10	1	47.971	46.014
	2	46.014	
	3	44.057	
25	1	106.273	114.545
	2	122.816	
	3	114.547	
50	1	228.712	232.448
	2	235.781	
	3	232.850	
100	1	484.758	474.758
	2	470.791	
	3	468.726	

3.3.4. Sitolapram

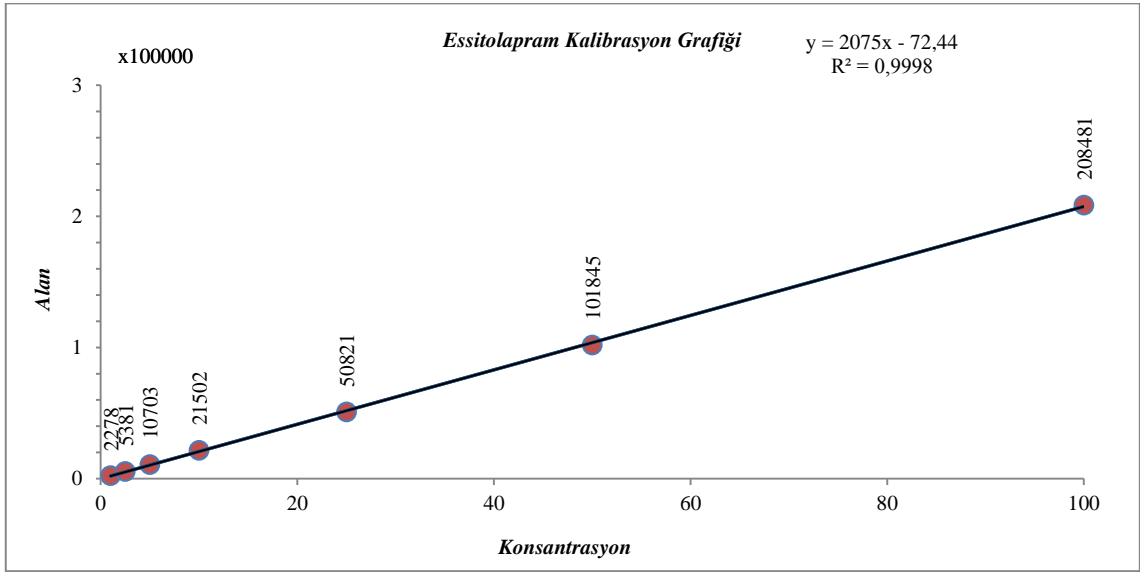


Şekil 3.7. Sitolapram kalibrasyon eğrisi grafiği.

Çizelge 3.5. Sitolapram etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.

Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Tekrar	Alan	Ortalama Alan
1	1	2.275	2.520
	2	2.772	
	3	2.514	
2,5	1	6.337	6.923
	2	6.589	
	3	7.842	
5	1	15.047	16.047
	2	16.953	
	3	16.142	
10	1	33.098	33.049
	2	34.049	
	3	32.000	
25	1	85.261	81.594
	2	80.354	
	3	79.168	
50	1	165.785	165.298
	2	162.632	
	3	167.478	
100	1	312.579	318.819
	2	315.819	
	3	328.058	

3.3.5. Essitolapram

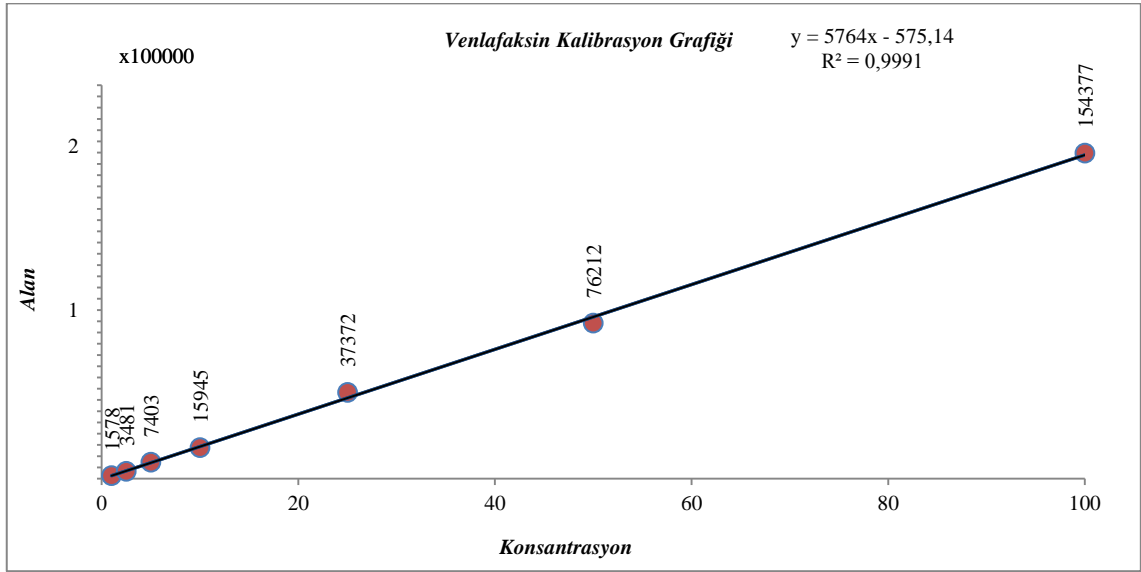


Şekil 3.8. Essitolapram kalibrasyon eğrisi grafiği.

Çizelge 3.6. Essitolapram etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.

Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Tekrar	Alan	Ortalama Alan
1	1	2.278	2.278
	2	2.124	
	3	2.433	
2,5	1	5.343	5.381
	2	5.047	
	3	5.752	
5	1	10.036	10.703
	2	10.971	
	3	11.102	
10	1	21.231	21.502
	2	22.773	
	3	20.502	
25	1	52.451	50.821
	2	49.487	
	3	50.524	
50	1	100.444	101.845
	2	105.179	
	3	99.913	
100	1	212.148	208.481
	2	205.897	
	3	207.399	

3.3.6. Venlafaksin

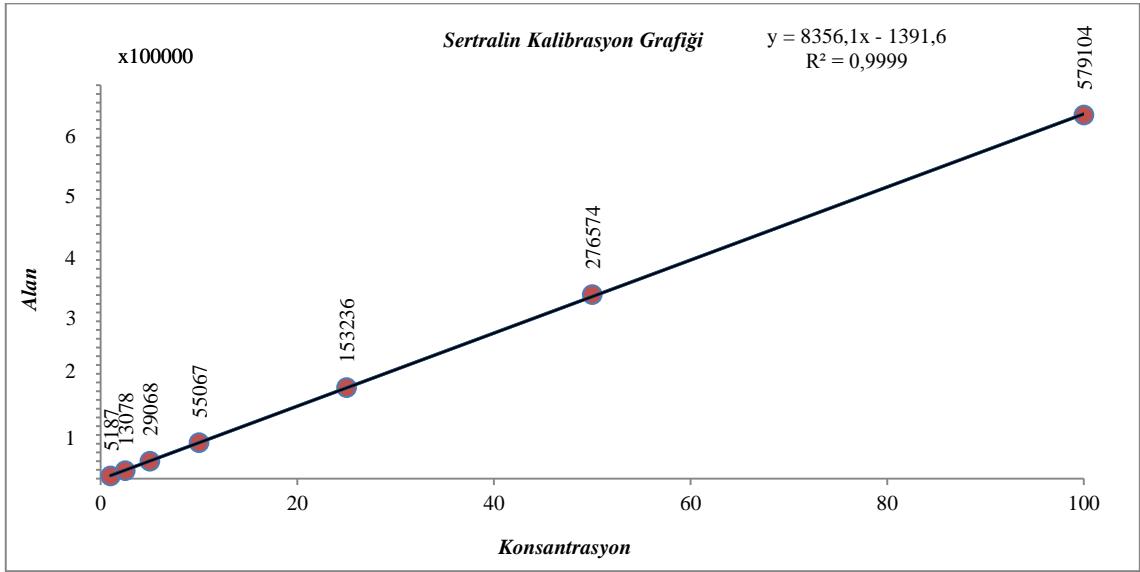


Şekil 3.9. Venlafaksin kalibrasyon eğrisi grafiği.

Çizelge 3.7. Venlafaksin etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.

Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Tekrar	Alan	Ortalama Alan
1	1	1.905	1.578
	2	1.578	
	3	1.252	
2,5	1	3.831	3.481
	2	3.147	
	3	3.464	
5	1	7.529	7.403
	2	7.610	
	3	7.069	
10	1	15.278	15.945
	2	16.632	
	3	15.924	
25	1	36.753	37.372
	2	38.324	
	3	37.038	
50	1	74.920	76.212
	2	76.879	
	3	76.838	
100	1	155.710	154.377
	2	153.510	
	3	153.910	

3.3.7. Sertralin

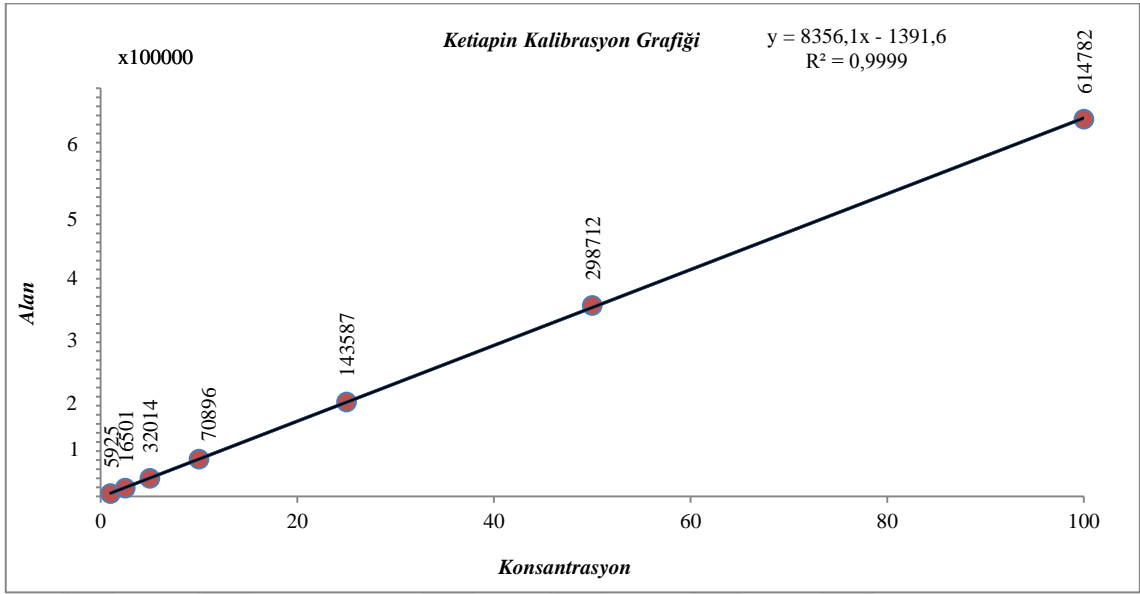


Şekil 3.10. Sertralin kalibrasyon eğrisi grafiği.

Çizelge 3.8. Sertralin etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.

Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Tekrar	Alan	Ortalama Alan
1	1	4.982	5.187
	2	5.187	
	3	5.393	
2,5	1	13.078	13.078
	2	12.758	
	3	13.397	
5	1	30.277	29.068
	2	29.068	
	3	27.859	
10	1	55.067	55.067
	2	53.258	
	3	56.876	
25	1	118.789	153.236
	2	120.587	
	3	220.332	
50	1	274.045	276.574
	2	279.102	
	3	276.574	
100	1	580.973	579.104
	2	577.236	
	3	579.104	

3.3.8. Ketiapin

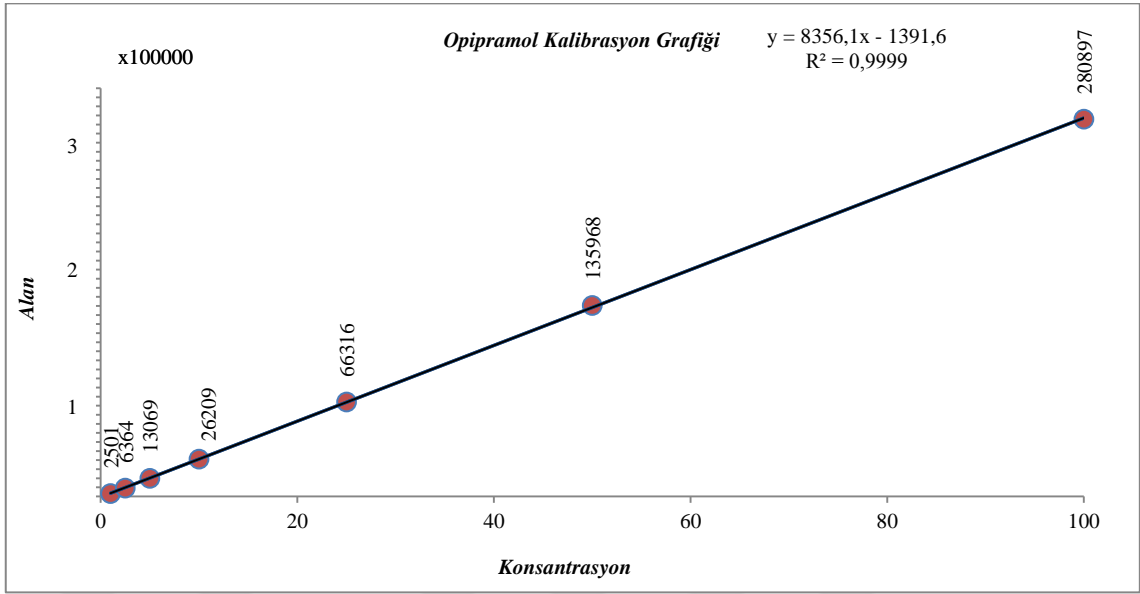


Şekil 3.11. Ketiapin kalibrasyon eğrisi grafiği.

Çizelge 3.9. Ketiapin etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.

Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Tekrar	Alan	Ortalama Alan
1	1	5.821	5.925
	2	5.732	
	3	6.221	
2,5	1	16.704	16.501
	2	16.501	
	3	16.298	
5	1	31.897	32.014
	2	32.131	
	3	32.014	
10	1	70.098	70.896
	2	70.896	
	3	71.693	
25	1	145.242	143.587
	2	141.932	
	3	143.587	
50	1	295.843	298.712
	2	298.712	
	3	301.581	
100	1	614.782	614.782
	2	612.987	
	3	616.576	

3.3.9. Opipramol

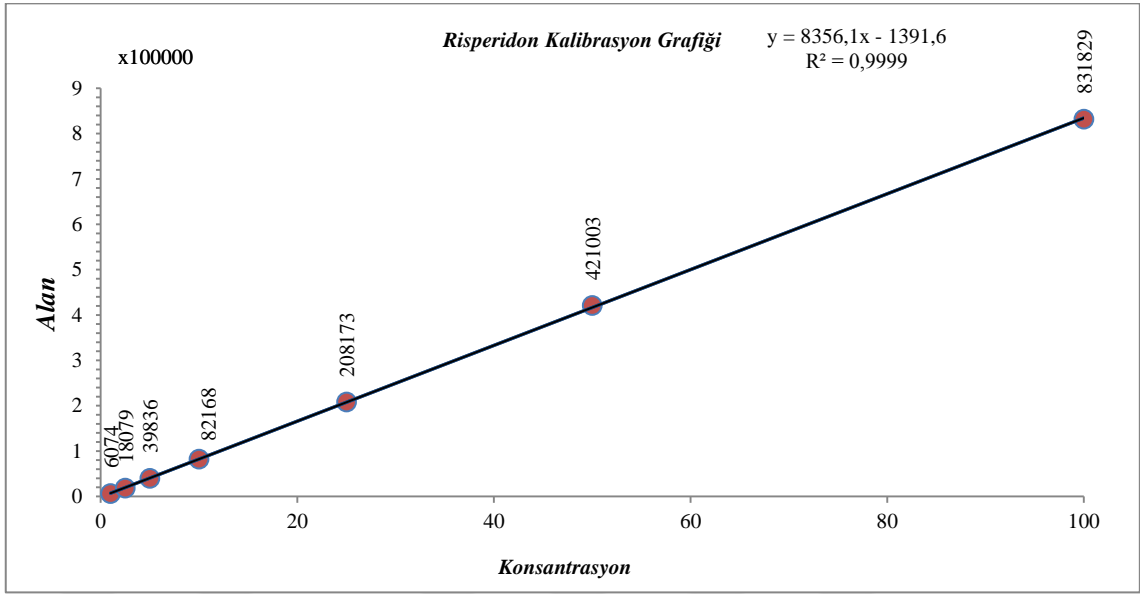


Şekil 3.12. Opipramol kalibrasyon eğrisi grafiği.

Çizelge 3.10. Opipramol etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.

Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Tekrar	Alan	Ortalama Alan
1	1	2.359	2.501
	2	2.643	
	3	2.501	
2,5	1	6.697	6.364
	2	6.268	
	3	6.126	
5	1	13.609	13.069
	2	13.069	
	3	12.530	
10	1	25.347	26.209
	2	26.876	
	3	26.404	
25	1	65.983	66.316
	2	66.910	
	3	66.056	
50	1	135.912	135.968
	2	136.690	
	3	135.301	
100	1	281.830	280.897
	2	279.897	
	3	280.963	

3.3.10. Risperidon



Şekil 3.13. Risperidon kalibrasyon eğrisi grafiği.

Çizelge 3.11. Risperidon etken maddesinin 3'er tekrarlı ortalama alan verileri.

Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Tekrar	Alan	Ortalama Alan
1	1	6.142	6.074
	2	6.107	
	3	5.973	
2,5	1	17.786	18.079
	2	17.378	
	3	19.073	
5	1	39.501	39.836
	2	40.836	
	3	39.172	
10	1	82.835	82.168
	2	82.632	
	3	81.037	
25	1	214.715	208.173
	2	200.173	
	3	209.632	
50	1	418.204	421.003
	2	429.136	
	3	415.670	
100	1	834.038	831.829
	2	829.830	
	3	831.620	

3.4. GERİ KAZANIM

Validasyon yöntemlerinde uluslararası şartlara göre en az bir LOQ değerinde ve en az 5 tekrarlı geri kazanım çalışması yapılmalıdır. Bu sonuca göre, %80, %100 ve %120 geri kazanım yeterlidir. Doğrusal aralık içinde bulunan en düşük, orta ve en yüksek konsantrasyonlarda kan numunelerinin serum kısmına belirtilen konsantrasyonlarda (1 ng.mL⁻¹ , 50 ng.mL⁻¹ , 100 ng.mL⁻¹) 10 tekrar şeklinde yapılan çalışmaların ortalama sonuçlarından elde edilen geri kazanım değerleri sırasıyla Çizelge 3.12’de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Etken maddelerin konsantrasyonları ve geri kazanımları (n=10).

Etken Madde	Konsantrasyon (ng.mL⁻¹)	Bulunan Konsantrasyon (ng.mL⁻¹)	Geri Kazanım %
Paroksetin	1	0,989	98,90
	50	49,324	98,64
	100	99,451	99,45
Fluoksetin	1	0,971	97,10
	50	49,753	99,50
	100	99,659	99,65
Duloksetin	1	0,977	97,70
	50	48,981	97,96
	100	99,196	99,19
Sitolapram	1	0,972	97,20
	50	49,756	99,51
	100	99,298	99,29
Essitolapram	1	0,983	98,30
	50	49,410	98,82
	100	99,856	98,85
Venlafaksin	1	0,988	98,80
	50	49,953	99,90
	100	99,925	99,92
Sertralin	1	0,99	99,00
	50	49,982	99,96
	100	99,89	99,89
Ketiapin	1	0,979	97,90
	50	49,260	98,52
	100	100,658	99,34
Opiromal	1	0,9785	97,85
	50	50,700	98,61
	100	99,639	99,63
Risperidon	1	0,9882	98,82
	50	49,602	99,20
	100	99,598	99,59

3.5. KESİNLİK (TEKRARLANABİLİRLİK - TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİK)

Her bir etken maddenin çalışma aralığında olan üç adet konsantrasyonu için 15'şer adet hazırlanan numunelerin aynı günde analiz edilmesiyle Denklem 1'e elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan %RSD değerleri Çizelge 3.13'de verilmiştir. %RSD değerlerinin kabul edilebilirliği %15'den küçük olup olmadığı referans alınmış ve bulunan %RSD değerleri Çizelge 3.16'ya bakıldığında uygunlukları görülmektedir. [33].

Tekrar üretilebilirlik diye adlandırılan günler arası tekrarlanabilirlik değerleri 3 farklı konsantrasyona göre yapılmış olup, 1 ng.mL⁻¹ Çizelge 3.14'de, 50 ng.mL⁻¹ Çizelge 3.15'de, 100 ng.mL⁻¹ Çizelge 3.16'da verilmiştir. Her bir konsantrasyon değeri her gün aynı zamanda 15 kez cihazda oluşturulan metotla analiz edilmiştir. Elde edilen değerlere bakıldığında %RSD değerleri %15'nin altında olduğu görülmektedir ve metodumuzun kesinlik değerlerinin istenilen sınırlar içerisinde olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.17'ye bakıldığında LOD ve LOQ değerleri görülmektedir. Gözlenebilme sınırı olan LOD değerlerine bakıldığında 0,05 ng.mL⁻¹ seviyelerine kalitatif tayin yapılabileceği bulunmuştur. Aynı şekilde LOQ değerlerine bakıldığında 0,16 ng.mL⁻¹ miktarlarına inildiği görülmüştür. Eş zamanlı analiz metodumuzda etken maddelerin kalitatif tayini için 0,05 ng.mL⁻¹ miktarlarına inildiği, kantitatif analizler için ise 0,16 ng.mL⁻¹ değerlerine inildiği sonucunun ortaya çıktığı görülmektedir.

Çizelge 3.13. Günler içi tekrarlanabilirlik (n=15).

Etken Madde	Konsantrasyon								
	1 ng.mL ⁻¹			50 ng.mL ⁻¹			100 ng.mL ⁻¹		
	Standart Sapma	Ortalama Değer	%RSD	Standart Sapma	Ortalama Değer	%RSD	Standart Sapma	Ortalama Değer	%RSD
Paroksetin	0,074	1,139	6,50	0,152	51,596	0,29	0,203	102,2495	0,20
Fluoksetin	0,081	1,089	7,44	0,212	52,196	0,41	0,336	103,2495	0,33
Duloksetin	0,079	1,097	7,20	0,282	53,196	0,53	0,435	104,986	0,41
Sitolapram	0,069	0,931	7,41	0,145	49,196	0,29	0,234	101,2495	0,23
Essitolapram	0,088	1,031	8,54	0,238	49,696	0,48	0,331	99,696	0,67
Venlafaksin	0,058	0,961	6,04	0,107	49,796	0,21	0,149	99,796	0,15
Sertralin	0,043	0,952	4,52	0,259	50,796	0,51	0,159	99,709	0,16
Ketiapin	0,164	1,152	14,24	0,558	49,296	1,13	0,687	103,457	0,66
Opipromal	0,099	0,952	10,40	0,596	50,296	1,18	0,686	101,376	0,68
Risperidon	0,091	1,017	8,95	0,189	50,196	0,38	0,264	100,976	0,26

Çizelge 3.14. Günler arası tekrarlanabilirlik (1 ng.mL⁻¹) (Tekrar üretilebilirlik değerleri)
(n=15).

Etken Madde	Gün	Konsantrasyon			
		1 ng.mL ⁻¹			
		Standart Sapma	Ortalama Değer	%RSD	Ortalama %RSD
Paroksetin	1	0,126	1,139	11,06	10,00
	2	0,103	1,107	9,30	
	3	0,112	1,163	9,63	
Fluoksetin	1	0,136	1,089	12,49	10,62
	2	0,121	1,135	10,66	
	3	0,098	1,126	8,70	
Duloksetin	1	0,158	1,097	14,40	12,18
	2	0,132	1,102	11,98	
	3	0,117	1,152	10,16	
Sitolapram	1	0,128	0,931	13,75	12,41
	2	0,114	0,958	11,90	
	3	0,109	0,941	11,58	
Essitolapram	1	0,088	1,031	8,54	7,80
	2	0,075	0,997	7,52	
	3	0,081	1,102	7,35	
Venlafaksin	1	0,058	0,961	6,04	5,71
	2	0,062	0,973	6,37	
	3	0,043	0,911	4,72	
Sertralin	1	0,043	0,952	4,52	5,03
	2	0,059	1,073	5,50	
	3	0,051	1,003	5,08	
Ketipin	1	0,124	1,152	10,76	10,76
	2	0,141	1,162	12,13	
	3	0,101	1,078	9,37	
Opipramol	1	0,138	0,952	14,50	12,30
	2	0,093	0,899	10,34	
	3	0,119	0,988	12,04	
Risperidon	1	0,041	1,017	4,03	5,90
	2	0,083	1,091	7,61	
	3	0,064	1,057	6,05	

Çizelge 3.15. Günler arası tekrarlanabilirlik (50 ng.mL⁻¹) (Tekrar üretilebilirlik değerleri) (n=15).

Etken Madde	Gün	Konsantrasyon			
		50 ng.mL ⁻¹			
		Standart Sapma	Ortalama Değer	%RSD	Ortalama %RSD
Paroksetin	1	0,152	51,596	0,29	0,76
	2	0,631	51,124	1,23	
	3	0,371	50,098	0,74	
Fluoksetin	1	0,212	52,196	0,41	0,89
	2	0,614	52,563	1,17	
	3	0,571	51,954	1,10	
Duloksetin	1	0,282	53,196	0,53	0,91
	2	0,713	52,963	1,35	
	3	0,45	52,172	0,86	
Sitolapram	1	0,145	49,196	0,29	0,89
	2	0,542	50,854	1,07	
	3	0,661	49,953	1,32	
Essitolapram	1	0,238	49,696	0,48	0,68
	2	0,442	48,345	0,91	
	3	0,324	49,124	0,66	
Venlafaksin	1	0,307	49,796	0,62	0,78
	2	0,413	50,057	0,83	
	3	0,446	49,124	0,91	
Sertralin	1	0,259	50,796	0,51	0,61
	2	0,343	51,734	0,66	
	3	0,352	52,629	0,67	
Ketiapin	1	0,558	49,296	1,13	1,66
	2	0,952	48,845	1,95	
	3	0,946	49,958	1,89	
Opipramol	1	0,596	50,296	1,18	1,10
	2	0,745	49,415	1,51	
	3	0,309	51,002	0,61	
Risperidon	1	0,189	50,196	0,38	0,82
	2	0,483	48,957	0,99	
	3	0,553	49,832	1,11	

Çizelge 3.16. Günler arası tekrarlanabilirlik (100 ng.mL⁻¹) (Tekrar üretilebilirlik değerleri) (n=15).

Etken Madde	Gün	Konsantrasyon			
		100 ng.mL ⁻¹			
		Standart Sapma	Ortalama Değer	%RSD	Ortalama %RSD
Paroksetin	1	0,303	102,2495	0,30	0,56
	2	0,776	102,156	0,76	
	3	0,636	101,834	0,62	
Fluoksetin	1	0,436	103,2495	0,42	0,52
	2	0,612	104,005	0,59	
	3	0,564	102,871	0,55	
Duloksetin	1	0,535	104,986	0,51	0,53
	2	0,513	105,219	0,49	
	3	0,622	104,772	0,59	
Sitolapram	1	0,334	101,2495	0,33	0,49
	2	0,472	100,841	0,47	
	3	0,662	100,098	0,66	
Essitolapram	1	0,531	99,696	0,53	0,61
	2	0,734	99,146	0,74	
	3	0,548	98,791	0,55	
Venlafaksin	1	0,349	99,796	0,35	0,32
	2	0,228	99,129	0,23	
	3	0,365	98,806	0,37	
Sertralin	1	0,259	99,709	0,26	0,30
	2	0,349	100,288	0,35	
	3	0,301	98,463	0,31	
Ketiapin	1	0,687	103,457	0,66	0,73
	2	0,687	104,563	0,66	
	3	0,91	103,991	0,88	
Opipramol	1	0,786	101,376	0,78	0,64
	2	0,646	101,136	0,64	
	3	0,506	101,865	0,50	
Risperidon	1	0,364	100,976	0,36	0,32
	2	0,286	99,239	0,29	
	3	0,301	99,972	0,30	

Çizelge 3.17. LOD ve LOQ Değerleri (n=15).

Etken Madde	LOD			LOQ		
	1 ng.mL ⁻¹	50 ng.mL ⁻¹	100 ng.mL ⁻¹	1 ng.mL ⁻¹	50 ng.mL ⁻¹	100 ng.mL ⁻¹
Paroksetin	0,08	0,17	0,22	0,27	0,56	0,74
Fluoksetin	0,09	0,23	0,37	0,30	0,77	1,23
Duloksetin	0,09	0,31	0,48	0,29	1,03	1,59
Sitolapram	0,08	0,16	0,26	0,25	0,53	0,85
Essitolapram	0,10	0,26	0,36	0,32	0,87	1,21
Venlafaksin	0,06	0,12	0,16	0,21	0,39	0,54
Sertralin	0,05	0,28	0,17	0,16	0,95	0,58
Ketiapin	0,18	0,61	0,75	0,60	2,04	2,51
Opipromal	0,11	0,65	0,75	0,36	2,18	2,50
Risperidon	0,10	0,21	0,29	0,33	0,69	0,96

3.6. STABİLİTE

Çalışmada kullanılan + 4 °C sıcaklıkta saklanan stok çözeltiler çalışma başlangıcında ve sonunda analiz edilerek bir hafta boyunca çözeltilerin bu sıcaklıkta stabil oldukları gözlenmiştir. Numunelerin otomatik örnekleyicide ki stabilitesinden emin olarak doğru ve güvenilir sonuçlar aldığımızı kanıtlamak için en az bir değeri LOQ değerlerinden bir değer olmak üzere üç farklı konsantrasyondaki (2 ng.mL⁻¹, 40 ng.mL⁻¹, 95 ng.mL⁻¹) bütün etken maddeler için kalite kontrol numunelerinden 10'ar adet validasyonun herhangi bir serisiyle ekstre edilmiştir. Hazırlanan stabilite serisi 120 saat boyunca 25 °C'de oto örnekleyicide bekletildikten sonra analiz edilmiştir. Stabilite serisinin birlikte hazırlandığı validasyon serisine ait kalibrasyon eğrisi ile okutulmuş ve kabul kriterleri arasında bulunan değerler sonucunda numunelerin oda sıcaklığında 120 saat boyunca stabil olduğu kanıtlanmıştır.

Çizelge 3.18. 25 °C’da 120 saat bekletilen etken maddeler için istatistiksel veriler.

Etken Madde	Konsantrasyon (ng.mL⁻¹)	Bulunan Konsantrasyon	Doğruluk %	Standart Sapma	%RSD
Paroksetin	2	2,03	98,52	0,124	6,11
	40	40,80	98,04	0,152	0,37
	95	96,00	98,96	0,203	0,21
Fluoksetin	2	2,05	97,56	0,181	8,83
	40	40,70	98,28	0,212	0,52
	95	95,60	99,37	0,336	0,35
Duloksetin	2	2,04	98,04	0,179	8,77
	40	40,50	98,77	0,282	0,70
	95	95,40	99,58	0,435	0,46
Sitolapram	2	2,04	98,04	0,119	5,83
	40	40,30	99,26	0,145	0,36
	95	95,30	99,69	0,234	0,25
Essitolapram	2	2,03	98,52	0,118	5,81
	40	40,80	98,04	0,238	0,58
	95	96,00	98,96	0,331	0,34
Venlafaksin	2	2,02	99,01	0,098	4,85
	40	40,60	98,52	0,107	0,26
	95	95,90	99,06	0,149	0,16
Sertralin	2	2,03	98,52	0,143	7,04
	40	40,40	99,01	0,259	0,64
	95	95,60	99,37	0,159	0,17
Ketiapin	2	2,08	96,15	0,164	7,88
	40	40,60	98,52	0,558	1,37
	95	95,30	99,69	0,687	0,72
Opiromal	2	2,07	96,62	0,199	9,61
	40	40,50	98,77	0,596	1,47
	95	95,80	99,16	0,686	0,72
Risperidon	2	2,04	98,04	0,091	4,46
	40	40,40	99,01	0,189	0,47
	95	95,70	99,27	0,264	0,28

3.7. MATRİKS ETKİSİ VE PROSES ETKİNLİĞİ

1 ng.mL⁻¹ konsantrasyonunda tüm etken maddelerin standart çözeltileri ile yapılan ölçümler (A); kör kan örneklerinin ekstraksiyonu sonrası analite 1 ng.mL⁻¹ konsantrasyonlarında tüm etken maddelerin standartlarının eklenmesiyle oluşan çözeltilerde yapılan ölçümler (B); Ekstraksiyon işlemi başında son konsantrasyonu 1 ng.mL⁻¹ olacak şekilde ekleme yapılarak hazırlanan kan örnekleriyle yapılan ekstraksiyon işlemi sonrası analitte yapılan ölçümler (C). Değerlerin CV sınırı %15 olarak kabul edilmiştir ve bazı değerlerin bu sınırın dışına çıktığı gözlemlenmiştir.

Matriks Etkisi (%) = B/A . 100

Proses Etkinliği (%) = C/A . 100 formülleri ile hesaplanmıştır.

Çizelge 3.19. Etken maddelerin matriks etkisi ve proses etkinliği (n=10).

Etken Madde	A (ng.mL ⁻¹)	B (ng.mL ⁻¹)	C (ng.mL ⁻¹)	Matriks Etkisi (%)	Proses Etkinliği (%)
Paroksetin	1	0,932	0,893	93,2	89,3
Fluoksetin	1	0,911	0,852	91,1	85,2
Duloksetin	1	0,932	0,811	93,2	81,1
Sitolapram	1	0,909	0,889	90,9	88,9
Essitolapram	1	0,910	0,877	91,0	87,7
Venlafaksin	1	0,937	0,915	93,7	91,5
Sertralin	1	0,962	0,929	96,2	92,9
Ketiapin	1	0,897	0,762	89,7	76,2
Opipramol	1	0,869	0,708	86,9	70,8
Risperidon	1	0,953	0,899	95,3	89,9

3.8. SAĞLAMLIK

Sağlamlık testleri; çalışma şartlarında ve ortam koşullarında yapılan değişikliklerin ortaya çıkardığı sonuçların tümüdür. Mobil fazın cinsinin, pH'nın veya bileşimindeki değişiklikler, metodun akış hızında, kolon sıcaklığındaki değişimler, analist farklılıkları gibi örnekler verilebilir. Bu çalışmada akış hızında Çizelge 3.20'de, kolon sıcaklığında ki değişimler Çizelge 3.21'de ve farklı analistlerle olan değişikliklerin sonuçları Çizelge 3.22'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.20. Etken maddelerin sağlamlık verileri (akış hızı).

Etken Madde	Konsantrasyon	Akış Hızı (mL/dk)					
		0,2		0,3		0,5	
		LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Paroksetin	1	1,04	2,54	0,61	1,98	0,52	1,86
	50	0,9	1,86	0,47	1,24	0,38	1,12
	100	0,97	2,24	0,54	1,62	0,45	1,5
Fluoksetin	1	1,13	2,39	0,71	1,78	0,62	1,66
	50	1	2,02	0,58	1,41	0,49	1,29
	100	1,08	2,21	0,66	1,61	0,57	1,49
Duloksetin	1	1,26	2,84	0,88	2,34	0,79	2,22
	50	1,11	2,62	0,69	2,05	0,6	1,93
	100	1,23	2,69	0,8	2,16	0,71	2,04
Sitolapram	1	1,07	2,14	0,64	1,61	0,55	1,49
	50	0,92	1,76	0,49	1,22	0,4	1,1
	100	0,99	1,92	0,57	1,4	0,49	1,28
Essitolapram	1	1,06	2,27	0,68	1,84	0,6	1,72
	50	0,97	1,93	0,55	1,47	0,47	1,35
	100	1,05	2,07	0,64	1,58	0,56	1,46
Venlafaksin	1	0,97	2,05	0,51	1,54	0,43	1,42
	50	0,86	1,78	0,39	1,26	0,31	1,14
	100	0,91	1,87	0,46	1,37	0,38	1,25
Sertralin	1	0,95	1,86	0,5	1,34	0,42	1,22
	50	0,8	1,62	0,39	1,1	0,31	0,98
	100	0,87	1,78	0,43	1,25	0,35	1,13
Ketiapin	1	1,49	3,08	1,03	2,6	0,93	2,48
	50	1,26	2,6	0,81	2,14	0,71	2,02
	100	1,45	2,9	0,9	2,42	0,8	2,3
Opiromal	1	1,09	2,33	0,65	1,8	0,55	1,68
	50	0,98	2,1	0,54	1,58	0,44	1,46
	100	1,02	2,22	0,58	1,69	0,48	1,57
Risperidon	1	0,94	1,97	0,49	1,44	0,39	1,32
	50	0,88	1,68	0,42	1,19	0,32	1,07
	100	0,9	1,79	0,45	1,3	0,35	1,18

Çizelge 3.21. Etken maddelerin sağlamlık verileri (kolon sıcaklığı).

Etken Madde	Konsantrasyon	Kolon Sıcaklığı (°C)					
		20		30		50	
		LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Paroksetin	1	0,85	2,32	0,57	1,98	0,54	1,89
	50	0,71	1,64	0,43	1,30	0,40	1,15
	100	0,78	2,02	0,50	1,68	0,47	1,53
Fluoksetin	1	0,94	2,17	0,66	1,83	0,64	1,69
	50	0,81	1,8	0,53	1,46	0,51	1,32
	100	0,89	1,99	0,61	1,65	0,59	1,52
Duloksetin	1	1,07	2,62	0,79	2,28	0,81	2,25
	50	0,92	2,4	0,64	2,06	0,62	1,96
	100	1,04	2,47	0,76	2,13	0,73	2,07
Sitolapram	1	0,88	1,92	0,60	1,58	0,57	1,52
	50	0,73	1,54	0,45	1,20	0,42	1,13
	100	0,8	1,7	0,52	1,36	0,50	1,31
Essitolapram	1	0,87	2,05	0,59	1,71	0,61	1,75
	50	0,78	1,71	0,50	1,37	0,48	1,38
	100	0,86	1,85	0,58	1,51	0,57	1,49
Venlafaksin	1	0,78	1,83	0,50	1,49	0,44	1,45
	50	0,67	1,56	0,39	1,22	0,32	1,17
	100	0,72	1,65	0,44	1,31	0,39	1,28
Sertralin	1	0,76	1,64	0,48	1,30	0,43	1,25
	50	0,61	1,4	0,33	1,06	0,32	1,01
	100	0,68	1,56	0,40	1,22	0,36	1,16
Ketiapin	1	1,3	2,86	1,02	2,52	0,96	2,51
	50	1,07	2,38	0,79	2,04	0,74	2,05
	100	1,26	2,68	0,98	2,34	0,83	2,33
Opiromal	1	0,9	2,11	0,62	1,77	0,58	1,71
	50	0,79	1,88	0,51	1,54	0,47	1,49
	100	0,83	2	0,55	1,66	0,51	1,60
Risperidon	1	0,75	1,75	0,47	1,41	0,42	1,35
	50	0,69	1,46	0,41	1,12	0,35	1,10
	100	0,71	1,57	0,43	1,23	0,38	1,21

Çizelge 3.22. Etken maddelerin sağlamlık verileri (kişi).

Etken Madde	Konsantrasyon	Kişi (mL/dk)					
		Analist 1		Analist 2		Analist 3	
		LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Paroksetin	1	0,57	1,91	0,55	1,91	0,56	1,93
	50	0,43	1,17	0,41	1,17	0,42	1,19
	100	0,5	1,55	0,48	1,55	0,49	1,57
Fluoksetin	1	0,67	1,71	0,65	1,71	0,66	1,73
	50	0,54	1,34	0,52	1,34	0,53	1,36
	100	0,62	1,54	0,6	1,54	0,61	1,56
Duloksetin	1	0,84	2,27	0,82	2,27	0,83	2,29
	50	0,65	1,98	0,63	2,01	0,64	2
	100	0,76	2,09	0,74	2,12	0,75	2,11
Sitolapram	1	0,6	1,54	0,59	1,57	0,59	1,56
	50	0,45	1,15	0,44	1,18	0,44	1,17
	100	0,53	1,33	0,52	1,36	0,52	1,35
Essitolapram	1	0,64	1,77	0,63	1,8	0,63	1,79
	50	0,51	1,4	0,5	1,43	0,5	1,42
	100	0,6	1,51	0,59	1,54	0,59	1,53
Venlafaksin	1	0,47	1,47	0,46	1,5	0,46	1,49
	50	0,35	1,19	0,34	1,22	0,34	1,21
	100	0,42	1,3	0,41	1,31	0,41	1,32
Sertralin	1	0,46	1,27	0,46	1,28	0,45	1,29
	50	0,35	1,03	0,35	1,04	0,34	1,05
	100	0,39	1,18	0,39	1,19	0,38	1,2
Ketiapin	1	0,99	2,53	0,99	2,54	0,98	2,55
	50	0,77	2,07	0,77	2,08	0,76	2,09
	100	0,86	2,35	0,86	2,36	0,85	2,37
Opiromal	1	0,61	1,73	0,61	1,74	0,6	1,75
	50	0,5	1,51	0,5	1,52	0,49	1,53
	100	0,54	1,62	0,54	1,63	0,53	1,64
Risperidon	1	0,45	1,37	0,45	1,38	0,44	1,39
	50	0,38	1,12	0,38	1,13	0,37	1,14
	100	0,41	1,23	0,41	1,24	0,4	1,25

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

İlaç etken maddelerinin kantitatif tayinleri rutin analizler, hasta takipleri ve ilaç kimyası sektöründe çok önemli yere sahiptir. Bu çalışmada antidepresan ve antiepileptik ilaç etken maddeleri olan Paroksetin, Fluoksetin, Duloksetin, Sitolapram, Essitolapram, Venlafaksin, Sertralin, Ketiapin, Opipromal, Risperidon'nin insan kanının serum kısmı kullanılarak eş zamanlı analizi için LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve yöntem valide edilmiştir.

Oluşturulan metodun özgünlük/spesifiklik açısından uygunluğu Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Kör okutulan numunelerde istenilen piklerin gelmediği fakat spike yöntemiyle hazırlanan numunelerde istenilen piklerin geldiği görülmüştür. Validasyon parametreleri tamamlandıktan sonra elde edilen eş zamanlı kromatogram Şekil 3.13'de verilmiştir.

Yöntem öncesi ön hazırlık ve numune hazırlamanın basit, kısa, güvenilir, anlaşılır olması, maliyetin az olması, kontaminasyonun en alt seviyede tutulması açısından diğer yöntemlerden ayrıldığı görülmüştür. Oluşturulan yöntem kesinlik açısından; her numune ve her konsantrasyon için 15 tekrar yapılması LOD ve LOQ değerlerinin tayin sınırını düşük tutma açısından başarılı olmuştur.

Metot % geri kazanım yönünden 1 ng.mL^{-1} konsantrasyonunda %97 seviyelerinde, yüksek konsantrasyonlarda ise %99 seviyelerinde tutulmuş olup EURACHEM kılavuzuna göre %95 değerlerinin üzerinde olduğu her bir etken maddenin konsantrasyonu için uygun olduğu ispatlanmıştır.

Gün içi tekrarlanabilirlik değerlerine Çizelge 3.13'de bakıldığında %RSD değerleri için

1 ng.mL^{-1} ; $4,52 \text{ ng.mL}^{-1}$ - $14,24 \text{ ng.mL}^{-1}$ aralığında

50 ng.mL^{-1} ; $0,21 \text{ ng.mL}^{-1}$ - $1,18 \text{ ng.mL}^{-1}$ aralığında

100 ng.mL^{-1} ; $0,15 \text{ ng.mL}^{-1}$ - $0,68 \text{ ng.mL}^{-1}$ aralığında sonuçlar alınmıştır. Tüm konsantrasyonlarda değerler %15'in altında olduğu görülmekte ve bize gün içi tekrarlanabilirliklerin uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu değerler bize LOD ve

LOQ değerlerinin hesaplanmasında rol oynadığından validasyon açısından çok önemli olduğu görülmektedir.

Günler arası tekrarlanabilirlik değerlerine Çizelge 3.14'e, Çizelge 3.15'e ve Çizelge 3.16'ya bakıldığında %RSD değerleri için

1 ng.mL⁻¹ ; 5,03 ng.mL⁻¹ - 12,41 ng.mL⁻¹ aralığında

50 ng.mL⁻¹ ; 0,61 ng.mL⁻¹ - 1,66 ng.mL⁻¹ aralığında

100 ng.mL⁻¹; 0,30 ng.mL⁻¹ - 0,73 ng.mL⁻¹ aralığında sonuçlar alınmıştır. Tekrar üretilebilirlik değerleri olarak da ifade edilen bu sonuçlar oluşturulan metodun tekrar tekrar kullanıldığında elde edilecek sonuçları göstermektedir. %RSD değerleri her bir etken madde için 3 farklı konsantrasyonda da %15'nin altında bulunmuştur ve bu değerlerin EURACHEM standartlarına göre doğruluğu ispatlanmıştır.

Etken maddelerin her biri için LOD ve LOQ değerleri EURACHEM kılavuzuna uygun olarak hesaplanmıştır.

LOD değerleri için;

1 ng.mL⁻¹ ; 0,05 ng.mL⁻¹ - 0,18 ng.mL⁻¹ aralığında

50 ng.mL⁻¹ ; 0,12 ng.mL⁻¹ - 0,65 ng.mL⁻¹ aralığında

100 ng.mL⁻¹; 0,16 ng.mL⁻¹ - 0,75 ng.mL⁻¹ aralığında tespitler yapılmıştır. Bu sonuçlar bize kalitatif olarak inebildiğimiz değerleri göstermekte olup 1 ng.mL⁻¹ konsantrasyonunda en alt sınırlar inildiği görülmektedir.

LOQ değerleri için;

1 ng.mL⁻¹ ; 0,16 ng.mL⁻¹ - 0,60 ng.mL⁻¹ aralığında

50 ng.mL⁻¹ ; 0,53 ng.mL⁻¹ - 2,18 ng.mL⁻¹ aralığında

100 ng.mL⁻¹ ; 0,54 ng.mL⁻¹ - 2,51 ng.mL⁻¹ aralığında tespitler yapılmıştır. Bu sonuçlar ise bize kantitatif olarak sonuç verebileceğimiz değerleri göstermektedir. 1 ng.mL⁻¹ konsantrasyonunda yine en alt sınırlar inildiği görülmektedir.

Yüksek duyarlılık ve düşük konsantrasyonları yakalamak için kalibrasyon eğrileri 7 noktalı her nokta 3'er tekrarlı olarak çizilmiş ve her etken madde için en az 0,9999 regresyon katsayısı bulunmuştur.

Stabilite değerleri için Çizelge 3.18'e bakıldığında çalışmada kullanılan + 4 °C sıcaklıkta saklanan stok çözeltilerin çalışma başlangıcında ve sonunda analiz edilerek

120 saat boyunca çözeltilerin bu sıcaklıkta stabil oldukları gözlenmiştir. Numunelerin stabilitesinden doğru ve güvenilir şekilde emin olmak için en az bir değeri LOQ değerlerinden bir değer olmak üzere üç farklı konsantrasyondaki (2 ng.mL^{-1} , 40 ng.mL^{-1} , 95 ng.mL^{-1}) bütün etken maddeler için kalibrasyon için hazırlanan çözeltilerden 10'ar tekrar olacak şekilde 120 saat boyunca + 4 °C'de bekletildikten sonra tekrar cihaza verilmiştir. Stabilite serisinin birlikte hazırlandığı validasyon serisine ait kalibrasyon eğrisi ile okutulmuş ve kabul kriterleri arasında bulunan değerler sonucunda numunelerin oda sıcaklığında 120 saat boyunca stabil olduğu kanıtlanmıştır.

Matriks Etkisi ve Proses Etkinliği için yapılan çalışmalar Çizelge 3.19'da verilmiştir. Rudzki ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışma referans alındığında matriks etkilerinde %15 sapma değerinin sağlandığı fakat proses etkinliği değerlerine bakıldığında Duloksetin, Ketiapin, Opipramol etken maddeleri için %15 sapma değerinin sağlanamadığı görülmüştür. Bu yüksek sapmanın da kandaki ön hazırlık aşamalarında kaybedilen etken maddeler için daha hassas davranılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada sağlamlık verileri üç parametrede değerlendirilmiştir. Akış hızı ve kolon sıcaklığındaki değişimin yanı sıra 3 farklı analist ile metodun tekrarlanabilirlik değerleri çalışılmıştır. Akış hızındaki küçük değişimlerin ($\pm 0,1$) metodun sağlamlığına etkisi çok düşük olduğu görülmektedir. Akış hızındaki değişimlerin piklerin alıkonma zamanlarını etkilediği fakat pik alanlarını çok küçük etkilediği ortaya çıkmaktadır. Sistem sıcaklığında küçük değişiklikler (± 10) yapıldığında ortaya çıkan sonuçlara bakıldığında sonuçların sadece 20 °C az da olsa değiştiği görülmektedir. Kişi değişkeni sonuçlarına bakıldığında değişimlerin az olduğu görülmekte olup metodun kişiye değil uygulanan metoda ve cihaza bağlı olduğu anlaşılmaktadır. Sonuç olarak, kullanılan metodun gerçekleştirilen değişimlerden çok fazla etkilenmediği ve sağlam olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmada Paroksetin, Fluoksetin, Duloksetin, Sitolapram, Essitolapram, Venlafaksin, Sertralin, Ketiapin, Opipromal, Risperidon etken maddelerinin insan kanının serum kısmında belirsizlik değerleri oldukça düşük, doğrusal aralığı geniş, geri kazanım değerleri yüksek, %RSD, LOD, LOQ değerleri kabul edilebilir sınırlarda, stabilite ve sağlamlık değerleri uygun, matriks etkileri, proses etkinlikleri çalışılmış bir yöntem oluşturulmuştur. Oluşturulan yöntemin gerek rutin tarama çalışmalarında etken maddelerin düşük değerlerinin tespiti ve izlenmesi açısından gerekse postmortem örneklerdeki analizlerde oldukça faydalı olacağı düşünülmektedir.

5. KAYNAKLAR

- [1] R. Plotnik, *Psikoloji'ye Giriş*, 1. baskı, İstanbul, Türkiye: Kaknüs Yayıncılık, 2009.
- [2] Amerikan Psikiyatri Birliği, "Tanı ölçütleri," *DSM – 5 Tanı Ölçütleri El Kitabı*, 1.baskı, İstanbul, Türkiye: HYB Yayıncılık, 2003.
- [3] R. M. Procyshyn, K. Z. Bezchlibnyk-Butler and J. J. Jeffries, "*Clinical Handbook Psychotropic Drugs*", 22. baskı, Göttingen, Almanya: Hogrefe Yayıncılık, 2017, ss. 12.
- [4] Ö. Uzun. (2019, 18 Mart). [Online]. Erişim: <http://gundempsiyatri.com>.
- [5] K. Demirkan, "Terapötik ilaç monitörizasyonu," *Yoğun Bakım Dergisi*, c. 7, ss. 365-369, 2007.
- [6] A. Castro, M. Concheiro, O. Quintela, A.Cruz, M.López and A. Rivadulla, "LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, c. 48, ss. 183-193, 2008.
- [7] I. González, M. Verónica, C. Rosa, M. Rosario, R. Analores, R. Cela and J. B. Quintana, "Multi-residue determination of psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs and related metabolites in waste water by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography Analyze*, c. 1569, ss. 91-100, 2018.
- [8] A. G. Asimakopoulos, P. Kannan, S. Higgins and K. Kannan, "Determination of 89 drugs and other micropollutants in unfiltered waste water and fresh water by LC-MS/MS: an alternative sample preparation approach," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, c. 409, ss. 6205–6225, 2017.
- [9] A. Pouliopoulos, E. Tsakelidou, A. Krokos, H.G. Gika, G. Theodoridis and N. Raikos, "Quantification of 15 Psychotropic Drugs in Serum and Postmortem Blood Sample after a Modified Mini-QuEChERS by UHPLC–MS-MS," *Journal of Analytical Toxicology*, c. 42, ss. 337–345, 2018.
- [10] M. Jang, I. Shin, J. Kim and W. Yang, "Simultaneous quantification of 37 synthetic cannabinoid metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Japanese Association of Forensic Toxicology and Springer*, c. 33, ss. 221-234, 2015.
- [11] A. Song, "Determination of 13 organic toxicants in human blood by liquid-liquid extraction coupling high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Japan Society for Analytical Chemistry*, c. 32, ss. 645-652, 2016.
- [12] D. Montenarh, M. Hopf, H. H. Maurer, P. Schmidtaand and A. H. Ewald, "Development and validation of a multi-analyte LC-MS/MS approach for quantification of neuroleptics in whole blood, plasma and serum," *Drug Test*

Analysis, c. 8, ss. 1080–1089, 2016.

- [13] L. Jun Hu, X. Li, J. Hu, X. Ni, H. Lu, J. Wang, X. Huang, C. Xian, L. Shang and Y. Wen, "Simple HPLC–MS/MS method for determination of tryptophan, kynurenine and kynurenic acid in human serum and its potential for monitoring antidepressant therapy," *Journal of Analytical Toxicology*, c. 41, ss. 37–44, 2017.
- [14] V. G. Berezkin, "Contributions from N.A. Izmailov and M.S. Schraiber to the development of thin-layer chromatography (On the 70th anniversary of the publication of the first paper on thin-layer chromatography)," *Journal of Analytical Chemistry*, c. 63, sayı 4, ss. 400-404, 2011.
- [15] N. A. Izmailov and R. A. Schraiber, "Pioneers of thin-layer chromatography" *Farmatsiya*, c. 3, ss. 1, 1938.
- [16] L. S. Ettre and A. Zlatkis, "A historical dialogue," *75 Years of Chromatograph*, Amsterdam, Hollanda, 1979.
- [17] J. D. H. Cooper and D. C. Turnell, "Automated preparation of biological samples prior to high pressure liquid chromatography," *Journal of Automatic Chemistry/Journal of Clinical Laboratory Automation*, c. 7, sayı 4, ss. 181-184, 1985.
- [18] T. Gündüz, *İnstrümantel Analiz*, 7. baskı, Ankara, Türkiye: Gazi Kitabevi Yayıncılık, 2004, ss. 1115.
- [19] D. A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman, *Enstrümantel Analiz İlkeleri*, 64. baskı, Ankara, Türkiye: Bilim Yayıncılık, 1998, ss. 726.
- [20] T. Gündüz, *İnstrümantel Analiz*, 7. baskı, Ankara, Türkiye: Gazi Kitabevi Yayıncılık, 2004, ss. 624.
- [21] Mike Sargent, (2019, 25 Mart). [Online]. Erişim: http://www.rsc.org/images/AMC%20LCMS%20Guide_tcm18-240030.pdf.
- [22] Anonim, (2019, 3 Nisan). [Online]. Erişim: <http://www.rsc.org/images/AMC%20LCMS%20Guidetcm18-240030.pdf>.
- [23] A. E. Ashcroft, (2018, 15 Aralık), *An Introduction to Mass Spectrometry*. [Online]. Erişim: <http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>.
- [24] M. Onul, "Shimadzu Triple Quadrupole Kütle Spektrometresi LC-MS/MS 8030/8040," yayımlanmamış rapor.
- [25] B. Anılanmert, F. Çavuş, İ. Narin, S. Cengiz, S. Sertler and A.A. Özdemir, "Simultaneous analysis method for GHB, ketamine, norketamine, phenobarbital, thiopental, zolpidem, zopiclone and phenytoin in urine, using C18 poroshell colum," *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, c. 1022, ss. 230-241, 2016.
- [26] M. Dekker, "Analytical Method Development and Validation," *Journal of the American Chemical Society*, c. 120, sayı 14, ss. 3540-3541, 1998.
- [27] J. Vessman, R.I. Stefan, J. F. van Staden, K. Danzer, W. Lindner, D. T. Burns, A. Fajgelj and H. Müller, "Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001)," *Selectivity in analytical chemistry*, c. 73, sayı 8, ss. 1381, 2001.
- [28] EURACHEM. (2018, 16 Kasım), *Analitik Metotların Amaca Uygunluğu*

Metodun Geçerli Kılınması ve İlgili Konular için Laboratuvar Kılavuzu. [Online]. Erişim: <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MVguide2ndedTR.pdf>.

- [29] Anonim. (2018, 23 Kasım). [Online]. Erişim: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
- [30] Anonim. (2019, 3 Ocak). [Online]. Erişim: https://media.iupac.org/publications/analytical_compendium.
- [31] Anonim. (2019, 11 Şubat). [Online]. Erişim: <https://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html>.
- [32] Piotr J.Rudzki, E. Gniazdowska and K. Kwaśnik, “Quantitative evaluation of the matrix effect in bioanalytical methods based on LC–MS: A comparison of two approaches,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, c. 155, ss. 314-319, 2018.
- [33] Anonim. (2018, 1 Aralık). [Online]. Erişim: https://www.labware.com/en/p/Industries/BiobankingandClinicalResearch/BioAnalysisSolution/MethodValidation?gclid=Cj0KCQjwpPHoBRC3ARIsALfx_IME8vCdxz2IDE4TOFa5amuZS5IUz819E1tZ5KQXOPyPDAGuqd44aAgw0EALw_wcB.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mehmet Kamil TEMEL
Doğum Tarihi ve Yeri : 16.09.1985 – Adıyaman
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : mehmetkamil71@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya	Düzce Üniversitesi	2019
Lisans	Kimya	Düzce Üniversitesi	2015
Lise	Sayısal/Fen	Yıldırım Beyazıt Lisesi	2004