



# Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

*Araştırma Makalesi*

## Bazı Antidepresan ve Antiepileptik İlaçların İnsan Kanında Eş Zamanlı Analizi için LC-MS/MS Yöntemi Geliştirilmesi

 Mehmet Kamil TEMEL<sup>a,\*</sup>,  Osman AKSU<sup>a</sup>,  Ertuğrul KAYA<sup>b</sup>,  Mert DÖNMEZ<sup>c</sup>,  Ümit ERGUN<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kimya Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Düzce Üniversitesi, Düzce, TÜRKİYE

<sup>b</sup> Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Düzce Üniversitesi, Düzce, TÜRKİYE

<sup>c</sup> Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Düzce Üniversitesi, Düzce, TÜRKİYE

\* Sorumlu yazarın e-posta adresi: mehmetkamil71@gmail.com

DOI : 10.29130/dubited.514385

### ÖZET

Bu çalışmada, sık kullanılan antidepresan ilaç etken maddeleri olan Paroksetin, Sitolapram, Essitolapram, Venlafaksin ile antiepileptik ilaç etken maddeleri olan Karbamazepin ve Oxkarbamazepin moleküllerinin tayini için, insan kanında Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) cihazı ile basit, hızlı ve güvenilir olan bir metot geliştirilmiştir. Her bir ilaç etken maddesi için geri kazanım, doğruluk, yüzde bağıl standart sapma (%RSD), gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) 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 0,06-0,36 ng.mL<sup>-1</sup>, LOQ değerleri ise 0,21-1,21 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında elde edilmiştir. Gün içi tekrarlanabilirlik değerlerinde %RSD sonuçları 0,15-10,71 ng.mL<sup>-1</sup>, günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinde ise %RSD sonuçları 0,23-13,75 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında bulunmuştur.

**Anahtar sözcükler:** Depresyon, epilepsi, ilaç, antidepresan, antiepileptik, LC-MS/MS

## Development of LC-MS / MS Method for the Simultaneous Analysis of Some Antidepressant and Antiepileptic Drugs in Human Blood.

### ABSTRACT

In this study, a simple, fast 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, Sitolapram, Essitolapram, Venlafaxine and the antiepileptic agents such as Carbamazepine and Oxkarbamazepin in human blood. The aim of this study is to measure each active substances' concurrent minimum value with the highest sensitivity and as soon as possible by setting some analytical parameters such as recovery, accuracy, percentage relative standard deviation (% RSD), limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ). It is observed that for the concentrations prepared for each active substance, the LOD values are in the range of 0,06 to 0,36 ng.mL<sup>-1</sup> and the LOQ values are that from 0,21 to 1,21 ng.mL<sup>-1</sup>. In terms of

intraday repeatability, RSD% results are found between 0,15 ng.mL<sup>-1</sup> and 10,71 ng.mL<sup>-1</sup>, while in terms of interday repeatability, those are found between 0,23 ng.mL<sup>-1</sup> and 13,75 ng.mL<sup>-1</sup>.

*Keywords: Depression, epilepsy, drug, antidepressant, antiepileptic, LC-MS / MS*

## I. GİRİŞ

2020 yılına kadar dünyada ikinci en ciddi hastalık olması beklenen depresyon; çok değişken belirtiler dizisi olan ciddi bir psikiyatrik hastalıktır. Çaresizlik ve umutsuzluk, günlük aktivitelere karşı ilgisizlik, iştah ve kilo kaybı, uyku bozukluğu, öfke veya sinirlilik, enerji kaybı ve konsantrasyon bozukluğu gibi bireyin günlük sorumluluklarını yerine getirme yeteneği ile ilgili bir çok ruhsal bozukluğun temelinde depresyon vardır ve sonucu intihara bile yol açabilir [1-3]. Epilepsi, doğuştan ve sonradan edinilmiş bozukluklardan kaynaklanan merkezi sinir sistemi işlevsizliğinin neden olduğu, tekrarlayan nöbetlerle seyreden, çocukluk ve ergenlik döneminde en yaygın görülen kronik nörolojik bir hastalıktır. Bu hastalık kronik süreçte patolojik değişiklikler sonucu kalıcı bozukluk ve yetersizliğe neden olan, geri dönüşümsüz, uzun süre rehabilitasyon ve bakım gerektiren bir durumdur [4-7].

Bu rahatsızlıklarda; kandaki ilaç konsantrasyonlarını terapötik aralıkta tutmak hem tedaviden optimum verim alınması hem de muhtemel ilaç toksisitesi riskinin minimuma indirilmesi hedeflenir. Terapötik ilaç konsantrasyonunun ölçülmesi, sadece ilacın kandaki konsantrasyonunu ölçmek ve ölçülen değeri olması gereken konsantrasyon aralığı ile kıyaslamak olarak düşünülmemelidir. İlaç tedavisi izlemi, ilacın hastanın klinik durumuna göre bireyselleştirilmesi (yaş, kilo, böbrek fonksiyonu gibi) ve kullanılan diğer ilaçlar göz önünde tutularak, doz ve dozaj formunun seçilmesi ile başlar. İlaç kan düzeyi takibinde örnekleme zamanı, kararlı duruma ulaşılması ve arzulanan klinik hedef gibi faktörler değerlendirilerek, ilaçtan minimum toksisiteyle en uygun cevabın alınabilmesi için dozun uygun şekilde ayarlanması sağlanır [8].

Literatürde yer alan çalışmalara bakıldığında, LC-MS/MS yöntemiyle antidepresan ve antiepileptik ilaçlarda metot-validasyon parametrelerinin insan serumunda 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 oluşturulmuştur. 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 tanımlanmıştır [9-11]. İnsan vücudu dışında yapılan çalışmalar da ise şehirlerin atık sularında bulunan antidepresanların LC-MS/MS ile eş zamanlı tayini yapılmış ve 38 psikoaktif ilacın (benzodiazepinler, antidepresanlar ve istismar ilaçları dahil) ortalama ve maksimum konsantrasyon seviyelerinin literatürde daha önce rapor edilen seviyelerin üzerinde çıktığı bulunmuştur. 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 metot geliştirilmiştir [12-14].

Literatürde toksikolojik amaçlar için çokça reçetelenmiş antidepresan ve antiepileptik ilaçları tespit edebilen ve ölçebilen, çalışma süresi 11 dakika olan bir LC-MS/MS yöntemine de rastlanmıştır. Daha sonraları antidepresanların, benzodiazepinlerin ve ilaçların 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 analiz için tam kan, plazma ve serumda bir yöntem tanımlanmıştır [15,16].

LC-MS/MS yöntemi ile insan kanında analiz edilmek üzere eş zamanlı olarak uyuşturucu- uyarıcı madde analizleri de yapılmıştır. Daha sonra 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 yapılmıştır. Çalışmada insan kanında 13 tane parametreyi hızlı, yüksek doğruluk, kesinlik ve oldukça düşük LOD ve LOQ sonuçları elde etmişlerdir [17,18].

Tam kan ve serum örneklerinde aynı anda en sık karşılaşılan antiepileptik ilaçların analizi için eş zamanlı ölçüm yöntemleri oluşturulmuştur. 22 farklı antiepileptik ilacın ve metabolitlerinin eş zamanlı olarak ölçülmesi için basit, doğru ve uygun maliyetli LC-MS/MS metodu geliştirilmiş ve uluslararası uygunluğu onaylanmıştır [19,20]. Daha sonraları Karbamazepin ve onun beş metabolitinin eş zamanlı analizi için LC-MS/MS ile kantitatif bir metod tanımlanmıştır. Hedef bileşikleri kanalizasyon arıtma tesisinden (STP) atık su ve yüzey suyundan toplanan sulu örneklerin geri kazanımları; arıtılmamış kanalizasyonda % 83.6-102.2, (etkilenen) arıtılmış kanalizasyonda % 90.6-103.5 (atık su) ve yüzey su örneklerinde % 95.7-102.9 bulunmuştur. STP girişi ve atık su ve yüzey suyu için geliştirilen yöntem çevresel sulu örneklerin analizi ile doğrulanmıştır [21].

İnsan plazmasındaki antiepileptik ilaçların kantitatif olarak yüksek verimli analizi için paralel iki kolonlu bir LC-MS/MS sistemini tanımlanmıştır. İki yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemini tek bir kütle spektrometresine çoğaltılarak, iki kat yüksek bir verim artışı sağlanmıştır. Özgünlük, matriks etkileri, iyileşme, doğrusallık, kesinlik ve doğruluk sonuçları tatmin edici seviyede olduğu görülmüştür. Sekiz antiepileptik ilacın analizi için gün içi hassasiyet ve gün içi kesinliği % 5.62'den az olduğu ve doğruluk % 14.00–5.06 arasında olduğu görülmüştür. Bu yöntem, düzenli olarak 1773 hastada sekiz antiepileptik ilacın plazma düzeylerini izlemek için kullanılmıştır. Sonuç olarak paralel HPLC-MS / MS yönteminin, büyük analitik numuneleri işleyebildiği gösterilmiştir [22].

Bu çalışmada sık kullanılan antidepresan ve antiepileptik ilaç etken maddeleri olan Paroksetin, Sitolapram, Essitolapram, Venlafaksin, Karbamazepin ve Oxkarbamazepin moleküllerinin insan kanının serum kısmı alındıktan sonra 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 ve geri kazanım gibi validasyon parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## II. MALZEME ve YÖNTEM

### *A. KİMYASALLAR ve CİHAZLAR*

Tüm kimyasal maddeler ve çözücüler analitik saflıkta kullanılmıştır. Standart çözeltiler Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Asetonitril ve metanol LC-MS/MS saflığında (%99,9) Sigma-Aldrich, Trifloraasetikasit (TFA) ve amonyum format MERCK firmasından temin edilmiştir. Ultra saf su çalışma laboratuvarımızda bulunan Human Ultrapure 400 cihazından kullanılmıştır. Çözeltilerin ve standartların uygun sıcaklıktaki muhafazası için buzdolabı olarak Profilo, dondurucu olarak Uğur derin dondurucu kullanılmıştır. Tartımlar için hassas terazi olarak Precisa XB 220A Hassas Terazi kullanılmıştır. Falcon

tüpler İnterlab firmasından temin edilmiştir. Mikropipetler, Eppendorf ve Brand firmalarından temin edilmiş ve kalibrasyonları ilgili firmalara tarafından yapılmıştır. Santrifüj için Nüve NF 800 marka ve modelli cihaz kullanılmıştır.

## **B. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI**

### **Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması**

#### **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.

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

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

#### **Paroksetin;**

**500  $\text{ng.mL}^{-1}$  çözelti** : Ara stok çözeltiden 1 mL alınıp insan kanının serum kısmı ile 2 mL'ye tamamlandı. 100  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 50  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 10  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 5  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 2,5  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 1  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 0,1  $\text{ng.mL}^{-1}$  çözeltileri ara stok çözeltiden ya da bir önceki konsantrasyonun seyreltilmesi ile elde edilmiştir.

#### **Essitolapram;**

**500  $\text{ng.mL}^{-1}$  çözelti** : Ara stok çözeltiden 1 mL alınıp insan kanının serum kısmı ile 2 mL'ye tamamlandı. 100  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 50  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 10  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 5  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 2,5  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 1  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 0,1  $\text{ng.mL}^{-1}$  çözeltileri ara stok çözeltiden ya da bir önceki konsantrasyonun seyreltilmesi ile elde edilmiştir.

#### **Sitolapram;**

**500  $\text{ng.mL}^{-1}$  çözelti** : Ara stok çözeltiden 1 mL alınıp insan kanının serum kısmı ile 2 mL'ye tamamlandı. 100  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 50  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 10  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 5  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 2,5  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 1  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 0,1  $\text{ng.mL}^{-1}$  çözeltileri ara stok çözeltiden ya da bir önceki konsantrasyonun seyreltilmesi ile elde edilmiştir.

#### **Venlafaksin;**

**500  $\text{ng.mL}^{-1}$  çözelti** : Ara stok çözeltiden 1 mL alınıp insan kanının serum kısmı ile 2 mL'ye tamamlandı. 100  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 50  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 10  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 5  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 2,5  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 1  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 0,1  $\text{ng.mL}^{-1}$  çözeltileri ara stok çözeltiden ya da bir önceki konsantrasyonun seyreltilmesi ile elde edilmiştir.

#### **Karbamazepin;**

**500  $\text{ng.mL}^{-1}$  çözelti** : Ara stok çözeltiden 1 mL alınıp insan kanının serum kısmı ile 2 mL'ye tamamlandı. 100  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 50  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 10  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 5  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 2,5  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 1  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 0,1  $\text{ng.mL}^{-1}$  çözeltileri ara stok çözeltiden ya da bir önceki konsantrasyonun seyreltilmesi ile elde edilmiştir.

#### **Oxkarbamazepin;**

**500  $\text{ng.mL}^{-1}$  çözelti** : Ara stok çözeltiden 1 mL alınıp insan kanının serum kısmı ile 2 mL'ye tamamlandı. 100  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 50  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 10  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 5  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 2,5  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 1  $\text{ng.mL}^{-1}$  , 0,1  $\text{ng.mL}^{-1}$  çözeltileri ara stok çözeltiden ya da bir önceki konsantrasyonun seyreltilmesi ile elde edilmiştir.

## Numune Çözeltilerinin Hazırlanması

Jelli tüpteki her kan numunesi 5 dakika santrifüjlendikten sonra tüpün üst kısmı olan serum\* örneğinden 500 µL alınıp, sırasıyla 250 µL metanol, 250 µL asetonitril ve 100 µL TFA (Trifloraasetik asit) çözeltileri eklenir ve her ekleme arasında her bir çözelti 2 dakika vortekslenir. Daha sonra çözelti 10 dakika 4000 rpm de santrifüjlenir. Süpernatant kısmı alınır, bir falkon tüpe aktarılır ve etken madde konsantrasyonunu artırmak için azotta uçurma yapılır. Falkon tüpün iç çeperlerindeki kalıntıları çözmek için 200 µL metanol ilave edilir ve vortekslenir. 10 dakika 4000 rpm santrifüjlendikten sonra çözeltilerin süpernatant kısmı alınır 0,22 µm'lik PTFE filtreden geçirilerek cihaza verilir.

\*Jelli tüplere alınan insan kanı 5 dakika santrifüjlendikten sonra jelli tüpün süpernatant kısmıdır.

## C. SIVI KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ ÖZELLİKLERİ VE ÇALIŞMA KOŞULLARI

Sıvı kromatografi analizleri için Shimadzu LC-20ADXR sistemi kullanılmıştır. Kolon olarak XB-C18 Welch (2,1x150x3µm) kullanılmış olup kolon sıcaklığı 40 °C'de sabit tutulmuştur. Enjeksiyon hacmi 10 µL, mobil faz akışı 0.4 mL olarak 12 dakika boyunca uygulanmıştır. Metot da gradiyent dönüşüm esas alınmak üzere; Tampon çözelti olarak 2 mM amonyum format içerisinde %0.1 formik asit ( mobil faz A ) çözeltisi kullanılıp, %5 asetonitril (mobil faz B) ile başlanarak 10. dakikada %95 asetonitril olacak şekilde devam edilmiştir. 10. dakikadan sonra metot optimizasyonu için tekrar %5 asetonitril ile devam edilmiş olup 12. dakikada metot sonlandırılmıştır. LC-MS/MS analizleri için SHIMADZU Upgrade with UF-Lens LC- MS/MS 8040 sistemi kullanılmıştır. Elektrosprey iyonlaştırma yöntemi kullanılarak pozitif ve negatif iyon modunda yavru iyonlar belirlenmiştir.

**Mobil faz A** : 2 mM Amonyum Format içerisinde %0.1'lik formik asit çözeltisi hazırlandı ve 10 dakika süre ile ultrasonik banyoda bekletildi.

**Mobil faz B** : % 99,9 saflıkta asetonitril içerisinde %0.1'lik formik asit çözeltisi hazırlandı ve ultrasonik banyoda 10 dakika süre ile bekletildi.

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

## D. LC-MS/MS ANALİZ METODUNUN VALİDASYONU

### Kesinlik

Pik alanının ölçümü ve numune uygulamanın tekrarlanabilirliği ( gün içi ) aynı numunenin on tekrar olacak şekilde kullanılmasıyla gerçekleştirildi ve % bağıl standart sapma (%RSD) olarak ifade edildi.

Kesinlik parametresi günler arası (yeniden üretilebilirlik) olarak üç farklı konsantrasyonda (5 ng.mL<sup>-1</sup>, 50 ng.mL<sup>-1</sup>, 500 ng.mL<sup>-1</sup>) yapılmış ve her konsantrasyonda on tekrar olacak şekilde uygulanmıştır.

## Geri Kazanım Çalışmaları

Analiz edilen numunelere Paroksetin, Sitolapram, Essitolapram, Venlafaksin, Karbamazepin ve Oxkarbamazepin stok çözeltilerinden doğrusal aralık içinde bulunan en düşük, orta ve en yüksek konsantrasyonları temsilen 3 noktada ( % 80, %100, %120 oranında) standart ekleme şeklinde ilave edilerek karışım tekrar analiz edildi. Numunelerin farklı düzeylerindeki Paroksetin, Sitolapram, Essitolapram, Venlafaksin, Karbamazepin ve Oxkarbamazepin geri kazanımını kontrol etmek için her bir konsantrasyonda on kez tekrar yapıldı. Elde edilen % Geri Kazanım ve % bağıl standart sapma (%RSD) değerleri kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu tespit edildi.

## Özgünlük

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;

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

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Ortalama Pik Alanı}} \times 100 \text{ (EURACHEM)} \quad (2)$$

$S_0$  ; sıfır veya yakınındaki derişimlerde, m tekli sonuçlardan tahmin edilen standart sapma değeridir.

$S'_0$  ; LOD ve LOQ hesaplamak için kullanılan standart sapma değeridir.

$n$  ; tüm ölçüm prosedürü takip edilerek elde edilen, sonuçlar raporlanırken ortalaması alınan tekrarlı gözlemlerin sayısıdır.

$n_b$ ; ölçüm prosedürüne göre boş düzeltmesinin hesaplanmasında ortalaması alınan boş gözlemlerin sayısıdır.

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

LOQ için ;  $S'_0 \times 10 = \text{LOQ}$  değeri şeklinde yapılmıştır [23].

### III. BULGULAR ve TARTIŞMA

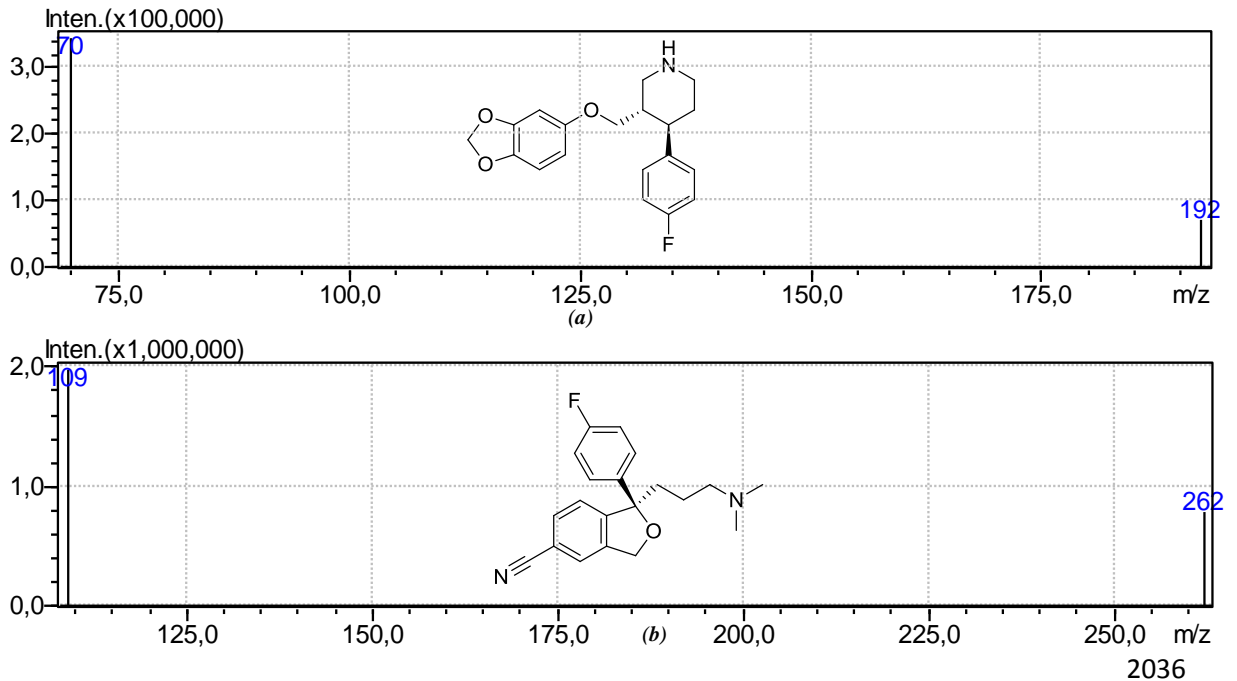
#### A. ETKEN MADDELERİN METOT OPTİMİZASYON PARAMETRELERİ

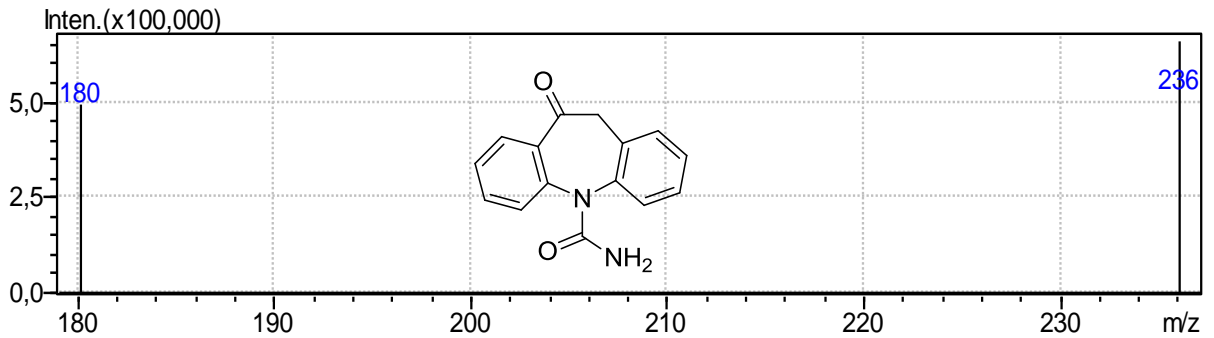
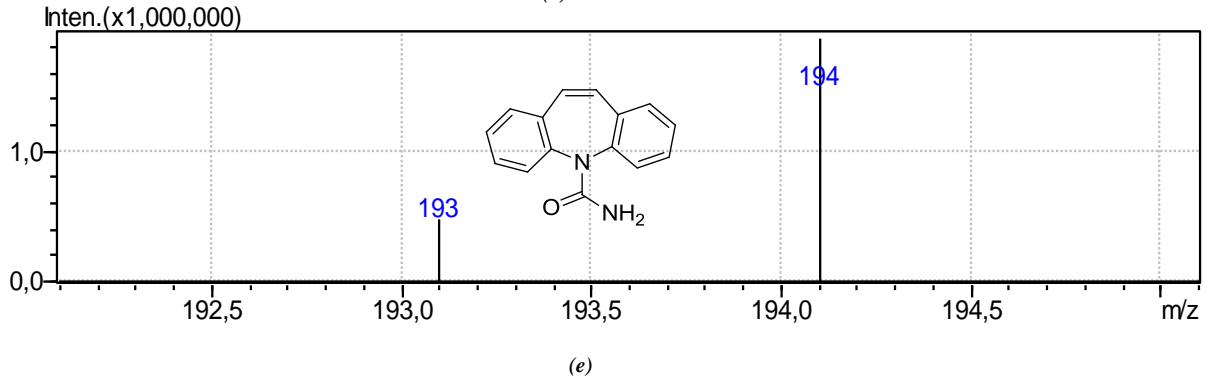
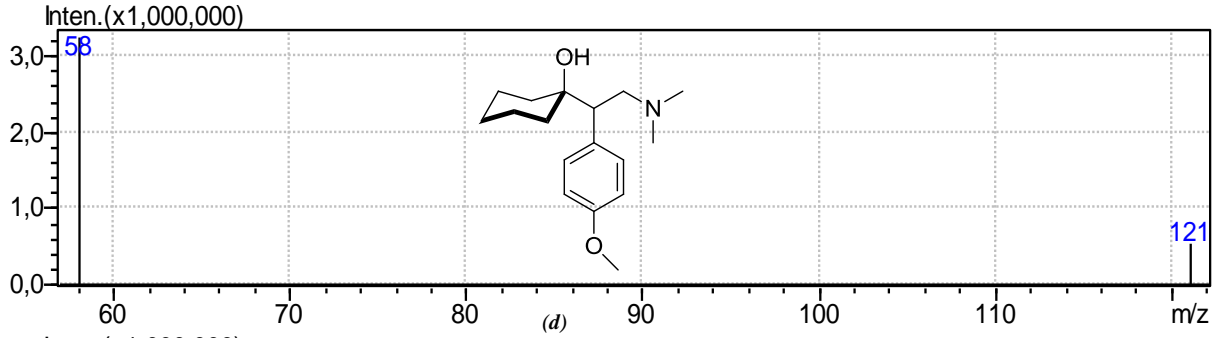
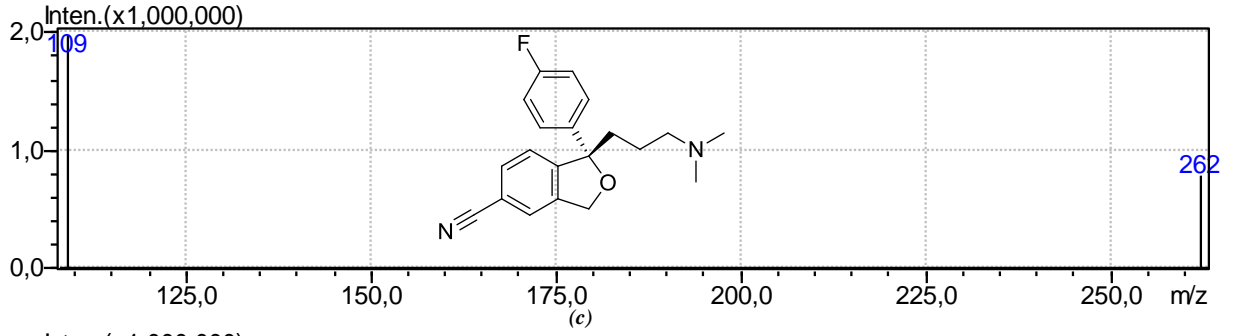
Tablo 1. Etken Maddelerin Metot Optimizasyon Parametreleri

Etken madde	Ana İyon (m/z)	Ürün İyon (m/z)	Q1 Ön Basınç (v)	Kapiler Voltaj	Q3 Çıkış Basınç (v)	Altkonma Zamani (dk)	İyonlaşma Türü
Paroksetin	330,10	69,90	-16,0	-35,0	-24,0	8,856	+
		192,20	-16,0	-32,0	-15,0		
Sitolapram	325,20	109,10	-16,0	-31,0	-18,0	8,446	+
		262,20	-16,0	-16,0	-30,0		
Essitolaprom	325,20	109,10	-24,0	-27,0	-21,0	8,427	+
		262,10	-24,0	-20,0	-30,0		
Venlafaksin	278,20	121,10	-30,0	-30,0	-21,0	8,178	+
		58,00	-30,0	-22,0	-22,0		
Oxkarbamazepin	253,20	180,10	-19,0	-31,0	-20,0	8,397	+
		236,10	-12,0	-13,0	-26,0		
Karbamazepin	236,8	194,1	-16	-20	-22	7,642	+
		193,1	-15	-32	-21		

#### B. ETKEN MADDELERİN MRM GRAFİKLERİ ve MOLEKÜL GEOMETRİSİ

Şekil 1’de verilen MRM spektrumları elde etmek için ilk olarak etken maddelerin ana iyonları tek tarama olarak yapılmıştır. Sonra ana iyonlar yavru iyonlara parçalandığında aşağıdaki spektrumlar elde edilmiştir. Bu çalışma, 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 [9,20].



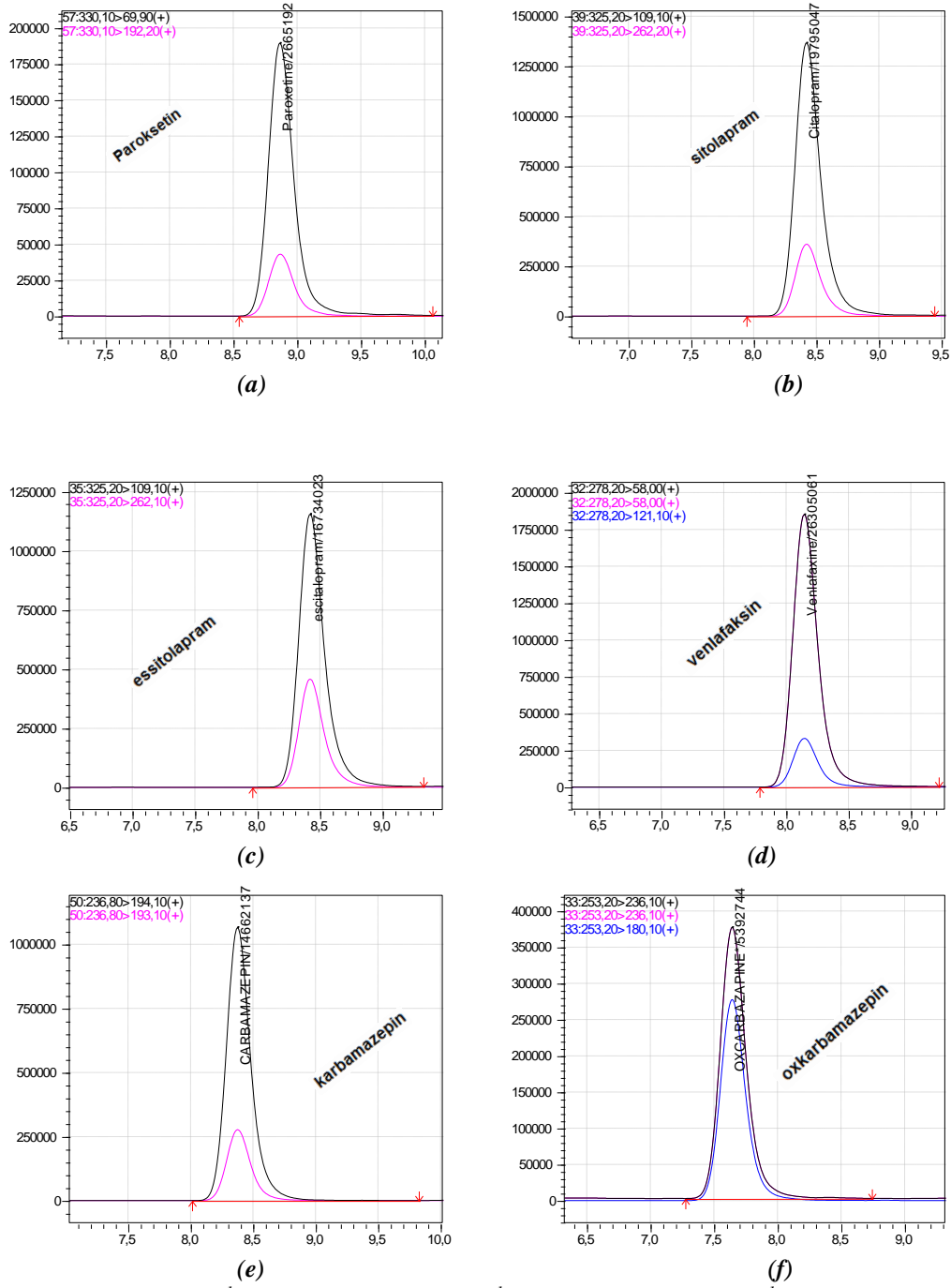


(f)

**Şekil 1.** (a) 50 ng.mL<sup>-1</sup>'lik Paroksetin çözeltisinin (b) 50 ng.mL<sup>-1</sup>'lik Sitolapram çözeltisinin (c) 50 ng.mL<sup>-1</sup>'lik Essitolapram çözeltisinin (d) 50 ng.mL<sup>-1</sup>'lik Venlafaksin çözeltisinin (e) 50 ng.mL<sup>-1</sup>'lik Karbamazepin çözeltisinin (f) 50 ng.mL<sup>-1</sup>'lik Oxkarbamazepin çözeltisinin iç standartlı LC-MS/MS spektrumları



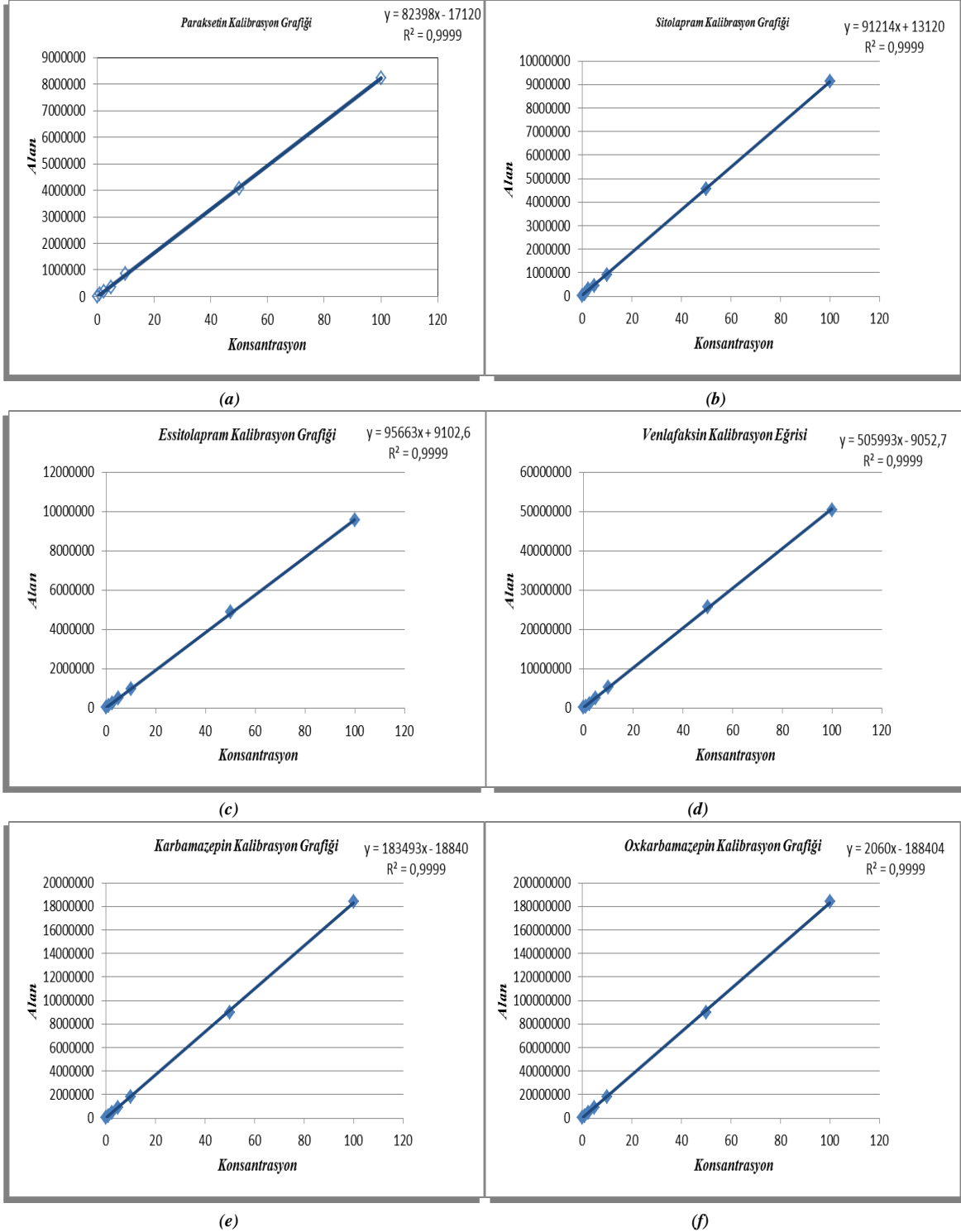
## B. ETKEN MADDELERİN ALIKONMA ZAMANLARI (Seçicilik/Özgüllük)



**Şekil 2.** (a)  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$  Paroksetin, (b)  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$  Sitolapram, (c)  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$  Essitolapram, (d)  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$  Venlafaksin, (e)  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$  Karbamazepin, (f)  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$  Okskarbamazepin çözeltilerinin alıkonma zamanlarını içeren LC-MS/MS kromatogramları

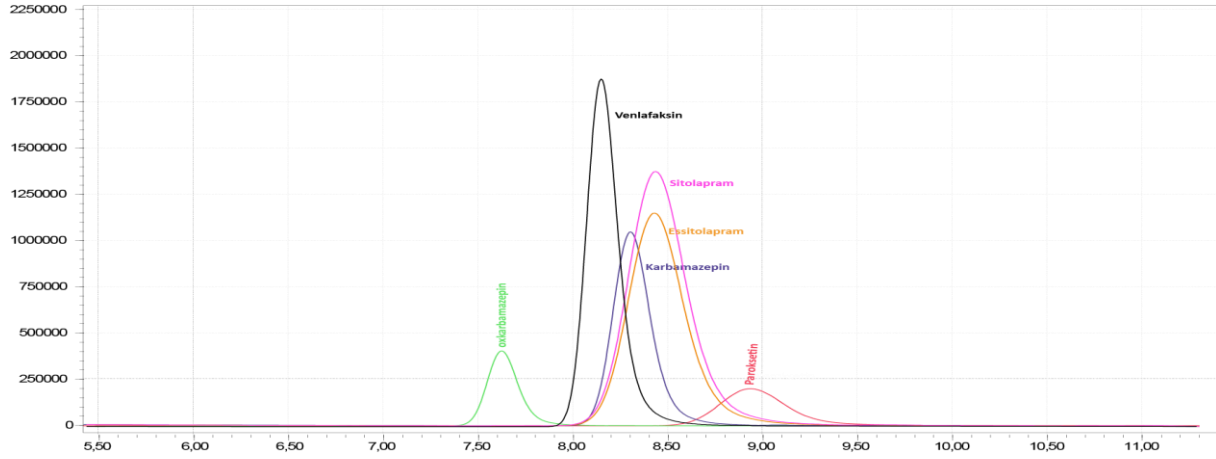
Kromatografide mobil faz ile taşınan numunenin enjeksiyon anından sabit faz içeren kolondan çıkıp dedektörde tespit edildiği ana kadar geçen süreyi alıkonma zamanı olarak tanımlarsak; numunede analizi yapılacak etken maddelerin  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$  konsantrasyonda standartları hazırlanıp optimizasyonunu yaptığımız metotta cihaza uygulandığında Şekil 2'deki grafikler elde edilmiş olup bu sayede kalibrasyon eğrisi çizilir. Kromatogramda bu piklerin altında kalan alanlardan faydalanarak bu bileşenlerin konsantrasyonları hesaplanır. Burada belirleyici nokta alıkonma zamanıdır.

### C. ETKEN MADDELERİN KALİBRASYON GRAFİKLERİ



Şekil 3. 100 ng.mL<sup>-1</sup>, 50 ng.mL<sup>-1</sup>, 10 ng.mL<sup>-1</sup>, 5 ng.mL<sup>-1</sup>, 2,5 ng.mL<sup>-1</sup>, 1 ng.mL<sup>-1</sup>, 0,1 ng.mL<sup>-1</sup> (a) Paroksetin, (b) Sitolapram, (c) Essitolapram, (d) Venlafaksin, (e) Karbamazepin ve (f) Oxkarbamazepin çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi grafikleri

Şekil 3.'de herbir etken madde için  $100 \text{ ng.mL}^{-1}$  ,  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$  ,  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$  ,  $5 \text{ ng.mL}^{-1}$  ,  $2,5 \text{ ng.mL}^{-1}$  ,  $1 \text{ ng.mL}^{-1}$  ,  $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$  olmak üzere yedi farklı konsantrasyon kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir. Nokta konsantrasyonların düşük tutulması bize daha düşük dedeksiyon limitleri için avantaj sağlamıştır. İlk ve son konsantrasyon arasında 1000 kat olmasına rağmen kalibrasyon eğrilerinin regresyon katsayıları tüm etken maddeler için 0,9999 seviyelerinde tutulması bize doğruluk ve geri kazanım için bize mükemmel sonuçlar vermiştir.



Şekil 4. Serum kısmı alınmış kana ilaç etken maddelerinin herbirinden 50 ppb'lik iç standart eklemesi ile hazırlanan numunenin oluşturulan yöntemle analizi sonucu oluşan eş zamanlı kromatogram

#### D. METOT-VALİDASYON

##### Kesinlik

Tablo 2'de her bir konsantrasyon için en az 10 tekrar yapılmak şartıyla aynı günde aynı şartlarda aynı kişi tarafından yapılan gün içi analiz sonuçlarının %RSD değerleri verilmektedir. Tablo 3'de ise her bir konsantrasyon için en az 10 tekrar yapılmak şartıyla üç gün süre ile her gün aynı saatte aynı şartlarda aynı kişi tarafından yapılan analiz sonuçlarının %RSD değerleri verilmektedir. Gün içi tekrarlanabilirlik değerlerinde %RSD sonuçları  $0,15 \text{ ng.mL}^{-1}$  -  $10,71 \text{ ng.mL}^{-1}$ ; günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinde ise %RSD sonuçları  $0,23 \text{ ng.mL}^{-1}$  -  $13,75 \text{ ng.mL}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Bu değerler her bir konsantrasyon için kabul edilebilir sınırlar içindedir.

Tablo 2. Gün içi tekrarlanabilirlik değerleri (n=10)

Etken madde	KAN (% RSD)		
	$1 \text{ ng.mL}^{-1}$	$50 \text{ ng.mL}^{-1}$	$100 \text{ ng.mL}^{-1}$
Paroksetin	6,50	0,29	0,20
Sitolapram	7,41	0,27	0,23
Essitolapram	8,54	0,48	0,47
Venlafaksin	6,04	0,21	0,15
Karbamazepin	7,81	1,12	0,81
Oxkarbamazepin	10,71	0,63	0,28

Tablo 3. Günler arası tekrarlanabilirlik değerleri (n=10)

Etken Madde	GÜN	KAN (%RSD)			Ort.
		1 ng.mL <sup>-1</sup>	50 ng.mL <sup>-1</sup>	100 ng.mL <sup>-1</sup>	
Paroksetin	1.gün	11,06	0,27	0,30	3,88
	2.gün	9,30	0,88	0,76	3,65
	3.gün	9,06	0,74	0,62	3,47
Sitolapram	1.gün	13,75	0,29	0,33	4,79
	2.gün	11,90	1,07	0,47	4,48
	3.gün	11,58	1,32	0,66	4,52
Essitolapram	1.gün	8,54	0,48	0,53	3,18
	2.gün	7,52	0,91	0,74	3,06
	3.gün	7,35	0,66	0,55	2,85
Venlafaksin	1.gün	6,04	0,62	0,35	2,34
	2.gün	6,37	0,83	0,23	2,48
	3.gün	4,72	0,91	0,37	2,00
Karbamazepin	1.gün	11,98	0,51	0,42	4,30
	2.gün	12,82	0,89	1,04	4,92
	3.gün	11,03	1,44	0,82	4,43
Oxkarbamazepin	1.gün	13,54	1,35	0,27	5,05
	2.gün	11,09	1,04	0,88	4,34
	3.gün	12,65	0,95	0,75	4,78

### Geri Kazanım ve Özgünlük

Tablo 4’de gözlenebilme sınırı (LOD), metodun laboratuvar koşullarında örnekteki etken madde varlığını tespit edebildiği ancak kesin miktarını ölçemediği en düşük analit konsantrasyon; alt tayin sınırı (LOQ) ise örnekteki etken madde varlığını miktarsal olarak tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyon değerlerini vermektedir. % Geri kazanım ise belirtilen konsantrasyonlarda sonuçların doğruluğunu bir sonucudur ve değerler uluslararası standartlara uyumludur. Tablo 5’de ki etken maddelerin terapötik limitlerine bakıldığında bulunan sonuçlar son derece tatmin edicidir.

Tablo 4. LOD, LOQ ve % Geri Kazanım Değerleri

Etken Madde	LOD			LOQ			%Geri Kazanım		
	1 ng.mL <sup>-1</sup>	50 ng.mL <sup>-1</sup>	100 ng.mL <sup>-1</sup>	1 ng.mL <sup>-1</sup>	50 ng.mL <sup>-1</sup>	100 ng.mL <sup>-1</sup>	1 ng.mL <sup>-1</sup>	50 ng.mL <sup>-1</sup>	100 ng.mL <sup>-1</sup>
Paroksetin	0,08	0,17	0,22	0,27	0,56	0,74	98,90	98,90	98,90
Sitolapram	0,09	0,16	0,26	0,25	0,53	0,85	97,20	97,20	97,20
Essitolapram	0,10	0,26	0,36	0,32	0,87	1,21	98,30	98,30	98,30
Venlafaksin	0,06	0,12	0,16	0,21	0,39	0,54	98,80	98,80	98,80
Karbamazepin	0,13	0,12	0,30	0,43	0,40	0,99	97,10	97,10	97,10
Oxkarbamazepin	0,15	0,35	0,20	0,49	1,17	0,67	98,40	98,72	99,03

*Tablo 5. Etken Maddelerin Terapötik Konsantrasyonları*

Etken madde	Terapötik Konsantrasyon	
	En Düşük	En yüksek
Paroksetin	8 ng.mL <sup>-1</sup>	50 ng.mL <sup>-1</sup>
Sitolapram	20 ng.mL <sup>-1</sup>	100 ng.mL <sup>-1</sup>
Essitolapram	25 ng.mL <sup>-1</sup>	125 ng.mL <sup>-1</sup>
Venlafaksin	75 µg.mL <sup>-1</sup>	450 µg.mL <sup>-1</sup>
Karbamazepin	2x10 <sup>3</sup> µg.mL <sup>-1</sup>	15x10 <sup>3</sup> µg.mL <sup>-1</sup>
Oxkarbamazepin	1x10 <sup>3</sup> µg.mL <sup>-1</sup>	10x10 <sup>3</sup> µg.mL <sup>-1</sup>

#### IV. SONUÇ

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, Sitolapram, Essitolapram, Venlafaksin, Karbamazepin ve Oxkarbamazepin'nin insan kan serumunda LC-MS/MS ile eş zamanlı analizi için metot validasyon yöntemi geliştirilmiştir.

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 10 tekrar yapılması LOD ve LOQ değerlerinin tayin sınırını düşük tutma açısından başarılı olmuştur. Metot % geri kazanım yönünden düşük konsantrasyonlarda %97 seviyeleri, yüksek konsantrasyonlarda ise %99 seviyeleri elde edilmiş olup EURACHEM kılavuzuna göre sonuçların son derece uygun olduğu görülmüştür. Etken maddelerin her birini tüm konsantrasyonlarında LOD ve LOQ değerleri EURACHEM kılavuzuna uygun olarak hesaplanmış ve LOD değerleri için 0,06 ng.mL<sup>-1</sup>-036 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında, LOQ değerleri için 0,21 ng.mL<sup>-1</sup>-1,21 ng.mL<sup>-1</sup> sonuçları elde edildiği görülmüştür. Gün içi tekrarlanabilirlik değerlerinde %RSD sonuçları 0,15 ng.mL<sup>-1</sup>-10,71 ng.mL<sup>-1</sup>; günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinde ise %RSD sonuçları 0,23 ng.mL<sup>-1</sup>-13,75 ng.mL<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Bu değerler her bir konsantrasyon için kabul edilebilir sınırlar içindedir.

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

Validasyon parametrelerine bakıldığında düşük konsantrasyonlar da %RSD değerinin yüksek konsantrasyonlara göre orantısal olarak arttığı görülmüştür. Bu da düşük konsantrasyonlar da kandaki ön hazırlıktaki etken madde kaybını veya metodun optimizasyonunda daha hassas davranılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada Paroksetin, Sitolapram, Essitolapram, Venlafaksin, Karbamazepin ve Oxkarbamazepin'nin insan kanında belirsizlik değerleri oldukça düşük, doğrusal aralığı geniş, geri kazanım değerleri yüksek, %RSD, LOD, LOQ değerleri kabul edilebilir sınırlarda ve analiz süresi oldukça kısa olarak geliştirilen yöntemin, gerek rutin tarama çalışmalarında etken maddelerin düşük değerlerinin tespiti ve izlenmesi açısından gerekse postmortem örneklerdeki analizlerde oldukça faydalı olacağı düşünülmektedir.

## V. KAYNAKLAR

- [1] R. M. Procyshyn, K. Z. Bezchlibnyk-Butler, J. J. Jeffries, *Clinical Handbook Psychotropic Drugs*, 22. baskı, Göttingen, Almanya: Hogrefe Yayıncılık, 2017, ss. 12.
- [2] S. Özden, Klinik Toksikoloji, *Klinik Toksikoloji Ders Notları*, İstanbul, 2015.
- [3] E. Köroğlu, DSM - 5 Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal Elkitabı, 5. Baskı, Ankara, Türkiye, 2015, ss.34-35.
- [4] M. Öztürk, *Kronik Hastalık ve Çocuk. İçinden: Çocuk Hastalıklarında Biyopsikososyal Yaklaşım*," 1. baskı, İstanbul, Türkiye: Epsilon Yayıncılık, 2007, ss. 49-59.
- [5] K. Fazlıoğlu, Ç. Hocaoğlu, F. M. Sönmez, "Çocukluk Çağı Epilepsisinin Aileye Etkisi," *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, ss. 190-205, 2010.
- [6] A. İşler, "Epileptik Çocuklarda Semiyolojik Nöbet Sınıflamasında Modüler Eğitim," Doktora Tezi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği Bölümü, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye, 2006.
- [7] K. Fazlıoğlu, Ç. Hocaoğlu, F. M. Sönmez, A. Cansu, "Epilepsi Tanısı Konan Çocukların Aile İşlevleri, Anne-Babalarındaki Kaygı Ve Başa Çıkma Tutumları," *New Symposium Journal*, c. 48, ss. 190-205, 2010.
- [8] K. Demirkan, "Terapötik İlaç Monitörizasyonu," *Yoğun Bakım Dergisi*, c. 7, s. 3, ss. 365-369, 2007.
- [9] A. Castro, M. Concheiro, O. Quintela, A.Cruz, M.López, 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*, vol.48, pp.183-193, 2008.
- [10] Q. Zhong, L. Shen, J. Liu, D. Yu, S. Li, Z. Li, J. Yao, T. Huang, S. I. Kawano, Y. Hashi, T. Zhou, "Automatic on line solid phase extraction with ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of ten antipsychotics in human plasma," *Journal of Separation Science*, vol. 39, pp. 2129-2137, 2016.
- [11] L. Hu, X. Li, J. Hu, X. Ni, H. Lu, J. Wang, X.Huang, C. Xian, L. Shang, Y. Wen, A "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*, vol. 41, pp. 37-44, 2017.
- [12] I. González M. Verónica, C. Rosa, M. Rosario, R. Analores, R. Cela, J. B. Quintana, "Multi-residue determination of psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs and related metabolites in wastewater by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography Analyse*, vol. 1569, pp. 91-100, 2018.

- [13] A. G. Asimakopoulos, P. Kannan, S. Higgins, K. Kannan, "Determination of 89 drugs and other micropollutants in unfiltered wastewater and freshwater by LC-MS/MS: an alternative sample preparation approach," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, c. 409, ss. 6205–6225, 2017.
- [14] A. Pouliopoulos, E. Tsakelidou, A. Krokos, H.G. Gika, G. Theodoridis, N. Raikos, "Quantification of 15 Psychotropic Drugs in Serum and Postmortem Blood Samples after a Modified Mini-QuEChERS by UHPLC–MS-MS," *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 42, pp. 337–345, 2018.
- [15] D. Montenarh, M. Hopf, H. H. Maurer, P. Schmidtaand, A. H. Ewalda\*, "Development and validation of a multi-analyte LC-MS/MS approach for quantification of neuroleptics in whole blood, plasma and serum," *Drug Test Analysis*, vol. 8, pp. 1080–1089, 2016.
- [16] M. Licata, C. Rustichelli, F. Palazzoli, A. Ferrari, C. Baraldi, D. Vandelli, P. Verri, F. Marchesi, E. Silingardi, "Hair testing in clinical setting: Simultaneous determination of 50 psychoactive drugs and metabolites in headache patients by LC tandem MS," *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, vol. 126, pp. 14-25, 2016.
- [17] M. Jang I. Shin, J. Kim, 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*, vol. 33, pp. 221-234, 2015.
- [18] 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*, vol. 32, pp. 645-652, 2016.
- [19] S. Deeb, D. A. McKeown, J. H. Torrance, F. M. Wylie, B. K. Logan, K. S. Scott, "Simultaneous Analysis of 22 Antiepileptic Drugs in Postmortem Blood, Serum and Plasma Using LC–MS-MS with a Focus on Their Role in Forensic Cases," *Journal Analytical Methods Chemistry*, vol. 38, pp. 485-494, 2014.
- [20] M. Shibataa, S. Hashib, H. Nakanishia, S. Masudab, T. Katsurab and I. Yanoa\*, "Detection Of 22 Antiepileptic Drugs by Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled With Tandem Mass Spectrometry Applicable To Routine Therapeutic Drug Monitoring," *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 38, pp. 485-494, 2014.
- [21] X. Miao and C. Metcalfe\*, "Determination of Carbamazepine and Its Metabolites in Aqueous Samples Using Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry," *Analytical Chemistry*, vol. 75, pp. 3731-3738, 2003.
- [22] L. Yin, M. Shi, T. Wang, M. Zhang, X. Zhao, Y. Zhang, J. Gu, "Parallel Column LC–MS/MS Method for High Throughput Analysis of Eight Antiepileptic Drugs in Clinical Therapeutic Drug Monitoring," *Chromatographia*, vol. 80, pp. 137-143, 2017.
- [23] F. Akçadağ, M. Bilsel, B. Binici, O. Cankur, K. Topal, A. Yılmaz, P. Yolcu, "Metodun Geçerli Kılınması ve İlgili Konular için Laboratuvar Kılavuzu (EURACHEM)," İstanbul, Türkiye: 2.baskı, ss. 28-29, 2018.