

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Doç. Dr. Zeynep TÜRKMEN

SİGARA BIRAKMA TEDAVİSİ GÖREN HASTALARININ PLAZMA VE
İDRARINDA VARENİKLİNİN KROMATOĞRAFİK TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Siti RAHMAWATİ

İSTANBUL, 2021

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Doç. Dr. Zeynep TÜRKMEN

SİGARA BIRAKMA TEDAVİSİ GÖREN HASTALARININ PLAZMA VE
İDRARINDA VARENİKLİNİN KROMATOĞRAFİK TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Siti RAHMAWATİ

İSTANBUL, 2021



Bu tez projesi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: **34248**).

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimleriyle desteklerini eksik etmeyen saygıdeğer hocalarım **Doç. Dr. Zeynep Türkmen, Doç. Dr. Selda Mercan ve Doç. Dr. Gönül Filoğlu Tüfek'e,**

Her koşulda zorlukları ve engelleri aşmama yardımcı olan, bilgi birikimi ile bir hoca; güler yüzü ve pozitifliği ile danışman hocam ve mentorum **Doç. Dr. Zeynep Türkmen'e,**

Çalışmam boyunca her türlü destek veren ve bilgilerle aydınlatan saygıdeğer hocam **Doç. Dr. Şermin Börekçi'ye,**

Çalışmalarım boyunca her türlü yardım ve manevi desteklerini hissettiğim dönem arkadaşım **Simge Zengin'e,** Adli Toksikoloji Laboratuvarı ekibi **Kim. Tuğba Tekin Bülbül, Ar.Gör. Merve Kuloğlu Genç ve Bio. Murat Yayla'ya,**

Her türlü yardım ve manevi desteklerini hissettiğim arkadaşlarım **Emine Öztürk, Virzah Syalvira ve Rizky Fauzan'a,**

Ve bugünlere gelmemi sağlayan, uzakta olsalar dahi kendilerini hep yanımda hissettiğim **Annem, Babam** ve tüm **Aileme** teşekkürü bir borç bilirim.

Siti Rahmawati

İstanbul, Temmuz 2021

İÇENDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇENDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Varenicline	3
2.1.1. Varenicline’in Farmakolojisi ve Farmakokinetiği	4
2.1.2. Varenicline’in Sigara Bırakma Tedavisinde Kullanımı.....	8
2.1.3. Varenicline’in İnsan Psikolojisi Üzeine Etkileri ve Adli Bilimlerdeki Önemi... 10	
2.2. Kromatografi	12
2.2.1. Kromatografik Yöntemin Çeşitleri	15
2.2.2. Sıvı Kromatografisi – Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS).....	20
2.2.3. Ekstraksiyon (Çekitleme İşlemi).....	22
2.3. Validasyon Çalışması	24
2.3.1. Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specificity).....	26
2.3.2. Doğruluk (Accuracy)	26
2.3.3. Doğrusallık (Linearite) ve Çalışma Aralığı (Range)	27
2.3.4. Tespit Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ)	28

2.3.5. Sağlamlık (Robustness).....	29
2.3.6. Ölçüm Belirsizliği	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Çalışmada Kullanılan Ekipmanlar.....	30
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	31
3.3. Çalışma Planı.....	31
3.4. Varenicline Analizi	32
3.4.1. Varenicline Analizinde Kullanılan Çözeltiler.....	32
3.4.2. Örnek Hazırlama Prosedürü (Çekitleme Yöntemi).....	34
3.4.3. Yöntemin LC-MS/MS Sistemi ile Geliştirilmesi.....	37
3.4.4. Validasyon Çalışmaları	39
3.4.5. Hasta Örneklerin Analizi	43
4. BULGULAR.....	46
4.1. Validasyon İşlemleri	48
4.1.1. Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specifity)	48
4.1.2. Tespit Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ) Hesaplamaları	50
4.1.3. Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma Aralığı (Range)	53
4.1.4. Doğruluk (Accuracy)	55
4.2. Hasta Örneklerin Sonuçları.....	60
4.2.1. Hasta Plazma Örneklerin Sonuçları	60
4.2.2. Hasta İdrar Örneklerin Sonuçları	61
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	62
6. KAYNAKLAR.....	70
EKLER.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: VRC'nin kimyasal yapısı.....	3
Şekil 2: Nikotinin vücuda alım mekanizması	4
Şekil 3: (A) Nikotin alınımında dopaminin salgılanışı, (B) nikotin bırakmada dopaminin azalışı, (C) VRC varlığında yeterince dopamin salgılanma mekanizmaları.....	5
Şekil 4: VRC metabolizması ve metabolitleri.....	7
Şekil 5: Modern bir GC sistemi	17
Şekil 6: Temel bir LC sistemi	19
Şekil 7: Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonun temel prensibi.	23
Şekil 8: Çoklu SPE manifoldu	23
Şekil 9: Validasyon ve verifikasyon ayrımı	25
Şekil 10: Cihaz ve metodun çalışma aralığının belirlenmesi için çizilen kalibrasyon grafiği	28
Şekil 11: Çalışmada kullanılan referans standart (Varenicline Tartrate, 5 mg, Sigma).....	33
Şekil 12: 5 mL'lik balon jodede hazırlanan 100 ppm'lik VRC ana stok çözelti.....	33
Şekil 13: Geri kazanım çalışması için çekitlenme işleminden geçirilmiş azot uçurmaya hazır plazma örnekleri	35
Şekil 14: Geri kazanım çalışması için çekitlenme işleminden geçirilmiş azot uçurmaya hazır idrar örnekleri	37
Şekil 15: Çalışmada kullanılan LC-MS/MS düzeneği.....	39
Şekil 16: Geri kazanım çalışması için kullanılan kan örnekleri.....	41
Şekil 17: Hasta kan örnekleri (n=16)	44
Şekil 18: Hasta idrar örnekleri (n=16)	45
Şekil 19: MeOH içinde 1 ppb VRC çözeltisine ait LC kromatogramı	47

Şekil 20: MeOH içinde 5 ppb VRC çözeltisine ait LC kromatogramı	47
Şekil 21: MeOH içinde 50 ppb VRC çözeltisinin LC kromatogramı	48
Şekil 22: Sadece MeOH çözeltisine ait LC kromatogramı	49
Şekil 23: MeOH içinde 25 ppb Diazepam-d5 (dk.) (IS) çözeltisine ait LC kromatogramı	49
Şekil 24: Blank plazma içinde 25 ppb Diazepam-d5 (dk.) (IS) çözeltisinin LC kromatogramı	49
Şekil 25: Blank idrar içinde 25 ppb Diazepam-d5 (dk.) (IS) çözeltisine LC kromatogramı ..	50
Şekil 26: 0,2-100 ppb aralığında VRC için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi (9 noktalı)	53
Şekil 27: 1-100 ppb aralığında VRC'nin plazma spike örneklerinden elde edilmiş kalibrasyon eğrisi (7 noktalı).....	54
Şekil 28: 0,5-100 ppb aralığında VRC'nin idrar spike örneklerinden elde edilmiş kalibrasyon eğrisi (8 noktalı).....	54

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo I.	VRC'nin empirik formülü, moleküler ağırlığı ve CAS numarası	4
Tablo II.	Sigara Bırakma Tedavisinde Kullanılan Farmakolojik Girişimler.....	9
Tablo III.	Ayrılma süreçlerine göre, faz tiplerine göre ve uygulama biçimine göre kromatografik yöntemin sınıflandırılması	15
Tablo IV.	Kromatografik yöntemin özellikleri, kullanılan mobil ile sabit fazları ve ayırma şekli	16
Tablo V.	Kullanılan tüm ekipman ile markaları ve modelleri	30
Tablo VI.	Çalışmada kullanılan standard ve kimyasal maddeler.....	31
Tablo VII.	Kalibrasyon noktalarının hesaplanması.....	34
Tablo VIII.	İdrar spike konsantrasyon için hesaplamalar	36
Tablo IX.	LC sistemin parametreleri.....	38
Tablo X.	Mobil fazın zamana göre akış değişimi	38
Tablo XI.	Geri kazanım çalışması için belirtilen çözeltilerden alınan miktarlar	42
Tablo XII.	Maddelerin alıkonma zamanları (dk.) ve MS spektrumundaki başlıca iyonları (m/z) (1 ppb).....	46
Tablo XIII.	10 adet VRC-free plazma örneğinin bulunan miktarı (ppb), standart sapma ve %RSD değerleri	51
Tablo XIV.	10 adet VRC-free idrar örneğinin bulunan miktarı (ppb), standart sapma ve %RSD değerleri	52
Tablo XV.	MeOH içinde 0,2-100 ppb aralığında çizilmiş olan kalibrasyon eğrisinin denklemi ve korelasyon katsayısı (≥ 0.9996). İdrar içinde 0,5-100 ppb ve plazma içinde 1-100 ppb aralığında çizilmiş olan kalibrasyon eğrisinin	

denklemleri ve korelasyon katsayıları (R^2 idrar ve plazma sırasıyla 0,9944 ve 0.9971).....	55
Tablo XVI. 2 ppb VRC içeren plazma örneğinin geri kazanım tablosu	56
Tablo XVII. 10 ppb VRC içeren plazma örneğinin geri kazanım tablosu	56
Tablo XVIII. 50 ppb VRC içeren plazma örneğinin geri kazanım tablosu	57
Tablo XIX. Plazma verilerine göre tekrarlanabilirlik çalışması sonuç tablosu	57
Tablo XX. 2 ppb VRC içeren idrar örneğinin geri kazanım tablosu	58
Tablo XXI. 10 ppb VRC içeren idrar örneğinin geri kazanım tablosu	58
Tablo XXII. 50 ppb VRC içeren idrar örneğinin geri kazanım tablosu	59
Tablo XXIII. İdrar verilerine göre tekrarlanabilirlik çalışması sonuç tablosu	59
Tablo XXIV. Hasta plazma sonuçları	60
Tablo XXV. Hasta idrar sonuçları	61

KISALTMALAR DİZİNİ

µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
AERS	: Advers Olaylar Raporlama Sistemi
amu	: Atomik Kütle Birimi
CDD	: İletkenlik Dedektörü
C _{max}	: Maksimum Plazma Konsantrasyonu
dH ₂ O	: Ultra Saf Su
EI	: Elektron İyonizasyonu
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
FDA	: Amerikan gıda ve ilaç dairesi
g	: Gram
GC	: Gaz Kromatografisi
GK	: Geri Kazanım
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IS	: İç Standart
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
L	: Litre
LC	: Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografi-Ardışık Kütle Spektrometresi
LLE	: Sıvı Faz Ekstraksiyonu
LOD	: Tespit Limiti
LOQ	: Tayin Limiti
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram

mL	: Mililitre
MRM	: Çoklu Kalıntı Yöntemi (Multiple Reaction Monitoring)
MS	: Kütle Spektrometrisi
nAChR	: Nikotinik Asetilkolin
NaOH	: Sodyum Hidroksit
ng	: Nanogram
NPS	: Yeni Psikoaktif Maddeler
NRT	: Nikotin Replasman Tedavileri
ppb	: Milyarda bir (Parts-Per Billion)
ppm	: Milyonda bir (Parts-Per Million)
R ²	: Korelasyon Katsayısı
RSD	: Bağlı Standart Sapma
SD (σ)	: Standart Sapma
SIM	: İyon İzleme Modu (Selected Ion Monitoring)
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
STA	: Sistematik Toksikoloji Analizi
t _{1/2}	: Yarılanma Ömrü
TGA	: Terapötik Ürünler İdaresi
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
TOF	: Zaman-Yol Bağımlı Analizör
t _R (RT)	: Alıkonma Zamanı
VRC	: Varenicline
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan Sigara Bıraktırma Tedavisi Destek Programı ile birlikte 1 Ocak 2009 – 30 Eylül 2018 tarihleri arasında 2.283.871 kişinin tedavi için başvuruda bulunduğu ve Varenicline (Champix®, Pfizer) ve Bupropion (Zyban®, GlaxoSmithKline) ilaçların katılımcıya uygulandığı bildirilmektedir.

Konu ile ilgili yapılan güncel araştırmalar, bu ilaçların akıl hastalığı olan ya da önceden psikiyatrik bozukluğu var olan kişilerde hatta hiçbir psikiyatrik bozukluğu olmayan kişilerde bile davranış değişikliği, depresyon, şiddet ve intihar girişimleri gibi ruhsal hastalık riskleri taşıdığı yönünde uyarılar sunmaktadır.

Ortaya çıkan ciddi yan etkilerin daha iyi anlaşılabilmesi ve hukuk açısından daha iyi adli inceleme yapabilmesi için basit, hızlı ve spesifik bir Varenicline'in analiz yöntemi geliştirilmesinin faydalı olacağı düşünülmüştür.

Bu çalışmada kan ve idrar biyolojik örneklerinde Varenicline'in tayini için en hassas tayin yöntemlerinden biri olan LC-MS/MS ile hızlı, özgün, kolay, düşük tayin limitli, tekrar edilebilirliği ve geri kazanımı yüksek bir yöntem valide edilmiştir. Ayrıca geliştirilen bu yöntem Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Sigara Bıraktırma Polikliniğinde sigara bıraktırma tedavisi gören 16 hastanın idrar ve kan örnekleri üzerinde uygulanmıştır.

Çalışmada, plazma örneğinde 7 noktalı, idrar örneğinde 8 noktalı kalibrasyon çözeltileri ile Varenicline doğrusal aralığı plazma için 1-100 ng/mL aralığı, idrar örneği için 0,5-100 ng/mL aralığı olarak belirlenmiştir. Bu aralıktaki korelasyon katsayıları plazmada $R^2=0.9971$, idrar örneği için $R^2= 0.9944$ olarak bulunmuştur. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla plazma için 0.36 ng/mL ve 0.46 ng/mL; idrar için 0.29 ng/mL ve 0.50 ng/mL'dir. Plazma örneğine çekitleme öncesi katım yapılarak yürütülen çalışmada geri

kazanım oranı 112.31 ± 6.55 ; 129.68 ± 5.73 ; 111.65 ± 7.12 bulunmuştur. İdrar örneğine çekitleme öncesi katım yapılarak yürütülen çalışmada geri kazanım oranı 115.63 ± 7.25 ; 107.31 ± 3.73 ; 113.59 ± 2.33 bulunmuştur.

Çalışmamızda plazma örneği için geliştirilen LC-MS/MS yönteminin belirlenen plazmada ortalama geri kazanım oranı göz önüne alınarak 13 hasta plazma örneklerinde 15.5-60.1 ng/mL arasında bulunmuştur. Ayrıca idrar örneği için geliştirilen bu LC-MS/MS yönteminin yukarıda belirtilen idrar ortalama geri kazanım oranı göz önüne alınarak 13 hastaya ait idrar örneklerinde 0.7-3.22 ng/mL arasında bulunmuştur. Diğer taraftan 3 hastanın ne idrar ne de plazma örneklerinde Varenicline belirlenememiştir. Bu durumun, örneklerin uygun koşullarda toplanamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışma ile geliştirilen LC-MS/MS yöntemine, ileride metabolitlerin de dahil edilmesi ile biyolojik örneklerde Varenicline üzerinden yürütülen çalışmaların daha verimli hale geleceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Adli Toksikoloji, Analitik Kimya, Madde Analizi, Varenicline, Sigara Bırakma, LC-MS/MS

SUMMARY

A program to support smoking cessation is provided by the Turkish Ministry of Health. The program has recorded 2.283.871 applications between 2009 January 1st – 2018 September 30th and has administered Varenicline (Champix®, Pfizer) and Bupropion (Zyban®, GlaxoSmithKline) to its participants.

In recent studies, Varenicline is found to be associated with neuropsychiatric disorders such as behavior changes, depression, hostility and suicidal thoughts; particularly in patients with mental health problems and also in patients with no records of any mental illnesses.

A fast, specific and simple Varenicline analysis method was developed to gain a better understanding of the adverse side effects and to run a more accurate Forensic examination in terms of Law.

The present study proposes the development and validation of Varenicline in plasma and urine using LC-MS/MS with a fast, specific, easy, low detection limit, high repeatability and high recovery method. The developed method was then applied to the plasma and urine samples of 16 patients currently receiving smoking cessation treatment at Smoking Cessation Polyclinic, Department of Chest Disease, Cerrahpaşa Medical Faculty.

The study was determined 7 calibration points for plasma with 1-100 ng/mL linear range; 8 calibration points for urine with 0,5-100 ng/mL linear range. The correlation coefficient between these ranges was found to be $R^2=0.9971$ for plasma; $R^2= 0.9944$ for urine. The LOD and LOQ was found respectively 0.36 ng/mL and 0.46 ng/mL for plasma; 0.29 ng/mL and 0.50 ng/mL for urine. The percentage recoveries from spike plasma samples were found $\%112.31\pm6.55$; $\%129.68\pm5.73$; $\%111.65\pm7.12$. The percentage recoveries from spike urine samples were found $\%115.63\pm7.25$; $\%107.31\pm3.73$; $\%113.59\pm2.33$.

According to the developed method's recovery rates in this study, Varenicline concentration was found at the range of 15.5-60.1 ng/mL in the plasma; and 0.7-3.22 ng/mL in the urine samples of 13 patients. However, Varenicline could not be determined either in plasma or urine samples of 3 patients. The main reason is thought to be because the sample collecting has not been done properly.

The developed LC-MS/MS method is believed to become a more efficient method for the determination of Varenicline and even its metabolites in biological specimens in the future.

Keywords: Forensic Toxicology, Analytical Chemistry, Substance Analysis, Varenicline, Smoking Cessation, LC-MS/MS

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ocak – Kasım 2011 ayları arasında T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan Sigara Bıraktırma Tedavisi Destek Programında Varenicline (Champix®, Pfizer) ve Bupropion (Zyban®, GlaxoSmithKline) ilaçları 164.733 katılımcıya bedava verilmiştir ve bırakma oranı %29'un üzerinde olduğu açıklanarak programın başarılı olduğu görülmüştür (1).

Fakat yapılan güncel araştırmalara göre bu ilaçların akıl hastalığı olan ya da önceden psikiyatrik bozukluğu var olan kişilerde hatta hiçbir psikiyatrik bozukluğu kaydı olmayan kişilerde bile davranış değişikliği, depresyon, şiddet ve intihar girişimleri gibi ruhsal hastalık riskleri taşıdığı tespit edilmiştir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'ne göre Mayıs 2006'dan Temmuz 2009'a kadar bu ilacın 100 intihar, 200 intihar girişimleri ve 5000 ciddi psikiyatrik durum kaydedilmiştir. Daha sonra, Temmuz 2009'da FDA tarafından ilaç kullanımında ruh sağlığı riskleri taşıyan en ciddi tedbir olan "Black Box" uyarı etiketi verilmiştir. Oysaki 2016'da çok fazla olgu kaydı olmadığı için bu uyarı kaldırılmıştır (2).

Varenicline (VRC) 1977'de Pfizer tarafından *Cytisus laburnum* bitkisinin doğal insektisidi olan Cytisine'nin molekül yapısından ilham alarak üretilmiştir. Cytisine'nin molekül yapısı, nikotin ve Varenicline'e çok benzemektedir. Beyindeki nikotin reseptörlerini bloke ederek şiddetli nikotin arzusunu ve tütün ürünlerinin hoş etkilerini azaltarak etki göstermektedir (3). Yapılan çalışmalara göre depresyon ve intihar girişimlerinin yanı sıra diğer yan etkileri; saldırganlık, şiddet, aşırı duyarlılık, anjiyoödem ve ciddi kardiyovasküler durumlarla da ilişkili olduğu düşünülmektedir (4–6).

Moore ve ark.'nın Amerika'da gerçekleştirdiği 1998-2010 yıllarını kapsayan, FDA'nın Advers Olaylar Raporlama Sistemi (AERS)'ten alınan 3.249 intihar ve depresyon olgularından 2.925 (%90)'ı Varenicline, 229 (%7)'si Bupropion, ve 95 (%3)'ü nikotin

replasmanından kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bu çalışma Varenicline'in en çok intihar, intihar girişimi ve depresyona yol açan bir madde olduğunu göstermiştir (5).

Guardian Elektronik Gazete Yayınına göre Terapötik Ürünler İdaresi (TGA) 'nin Avustralya'da 2010'a kadar Varenicline'in kullanımına bağlı 206 intihar girişimi olduğunu raporlamıştır. Bu raporların birinde geçen Nisan 2013'te 22 yaşında bir erkeğin Varenicline'i 8 gün kullandıktan sonra intihar ederek ölmüş olması, ayrıca yapılan otopsi sonucunda vücudunda sadece Varenicline ve İbuprofen tespit edilmesi ve ailenin çocuklarının intihara kalkışmasında yatan sebebin Varenicline'in ilacın etkisinden olduğunu öne sürerek imza kampanyası başlatmış olması ilacın intihardaki etkisini doğrular niteliktedir. Bu olguyu değerlendiren hekimlere göre bu vakada psikiyatrik bozukluk hikayesi var olduğu, akıl hastalığı olan ya da önceden psikiyatrik bozukluğu var olan kişilerde Champix'in intihar riskini arttığını ve imalatçı firma tarafından bunun ilaç kutularına yazılması gerektiği yorumunu yapmışlardır. Oysaki, imalatçı firma Varenicline'in tek bir madde olarak psikiyatrik yan etki oluşturduğunu, ölümden tek başına sorumlu olmadığını söylemiştir (7).

Bu ilaç kaynaklı ortaya çıkan ciddi yan etkilerin daha iyi anlaşılabilmesi ve hukuki açıdan daha iyi adli inceleme yapılabilmesi için hem klinik farmakokinetik incelenmesinde hem de adli toksikoloji incelenmesinde kullanılabilen basit, hızlı ve spesifik bir Varenicline'in analiz yöntemi geliştirilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

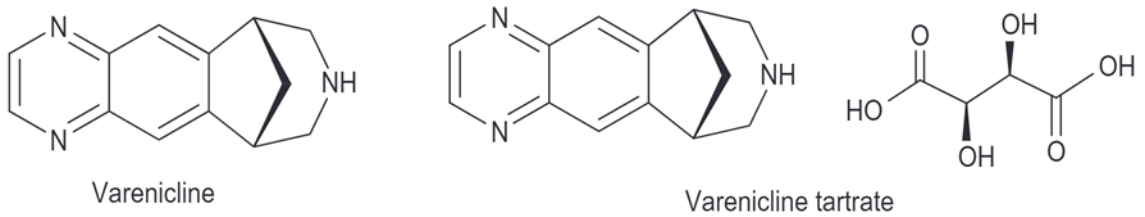
2.1. Varenicline

Varenicline (VRC), piyasada daha çok Champix®/Chantix® ticari adı ile bilinen 0.5 ve 1 mg'lık dozlarda tartarat tuzu olarak reçeteli halde bulunan sigara bırakma tedavisinde kullanılan bir ilaçtır (8,9).

VRC, bir $\alpha 4\beta 2$ reseptörlerinin kısmi agonistidir. Beyinin mezolimbik bölgesinde bulunan nAChR nikotinik reseptörlere bağlanarak dopamin salgılar ve yoksunluk semptomlarını hafifletmeye yardımcı olur (10,11).

Bu ilaç 1997 yılında Pfizer tarafından *Cytisus Laburnum L.* (Golden Rain) bitkisinde doğal olarak bulunan alkaloid (Cytisine) bileşiminden ilham alınarak türetilmiştir. 2006 yılında Chantix ticari adı altında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ve Champix ticari adı altında Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanmıştır (11,12).

VRC'nin kimyasal yapısı (7,8,9,10-tetrahydro-6,10-methano-6H-pyrazino[2,3h][3]benzazepine[2R,3R]-2,3-dihydroxybutanedioate) formundadır. Bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1: VRC'nin kimyasal yapısı

VRC'nin empirik formülü, moleküler ağırlığı ve CAS numarasını Tablo 1'de verilmiştir.

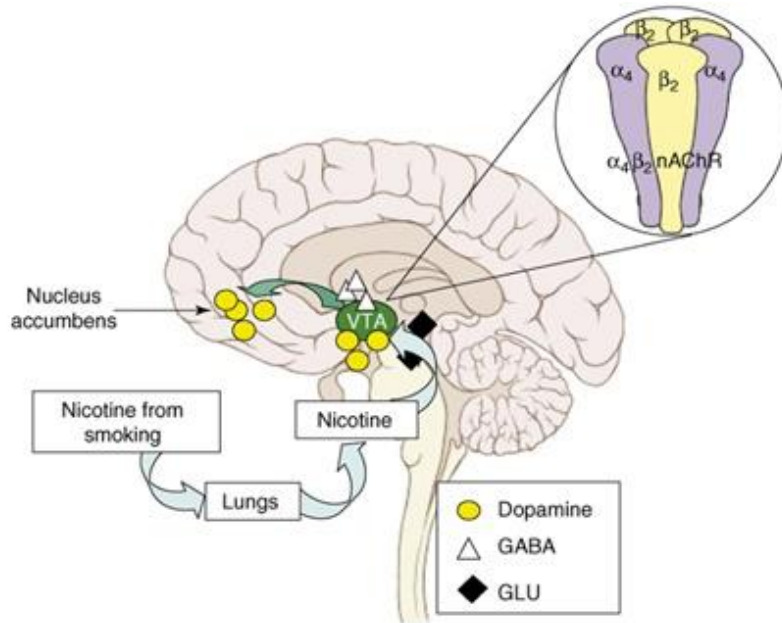
Tablo I. VRC'nin empirik formülü, moleküler ağırlığı ve CAS numarası

	Empirik Formülü	Moleküler Ağırlığı	CAS Numarası
Varenicline	$C_{13}H_{13}N_3$	211.26	[249296-44-4]
Varenicline Tartrate	$C_{13}H_{13}N_3 \cdot C_4H_6O_6$	361.35	[375815-87-5]

2.1.1. Varenicline'in Farmakolojisi ve Farmakokinetiği

Farmakoloji

Şekil 2'deki sigara bağımlılığına neden olan nikotin alım mekanizmasında, sigara dumanını soluduktan sonra nikotin akciğerden kan dolaşımına hızlıca geçerek kan-beyin bariyerine girer ve beyindeki nikotinik asetilkolin (nAChR) reseptörlerine bağlanarak dopamin salgılanmasını aktifleştirir. Dopamin salgılanması, ödüllendirme sistemi ile nikotin arzusunu tetikler ve etkisini sürdürür (13).

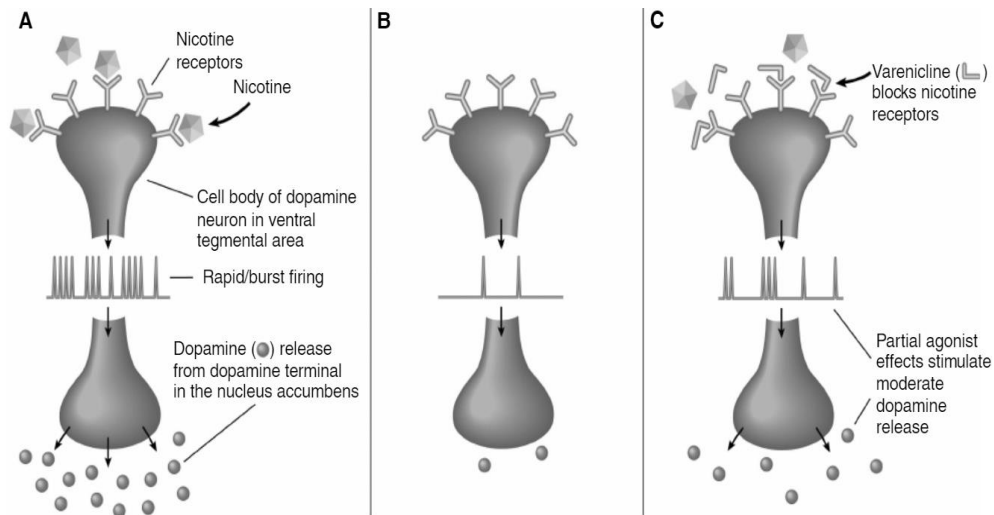
**Şekil 2:** Nikotin vücuda alım mekanizması (13)

VRC, nikotini taklit ederek beyinde bulunan nikotinik reseptörlere bağlanabilme kapasitesine sahip oldukları için sigara bırakma tedavisinde kullanılan yardımcı araçlardan biridir (14).

VRC nikotinik asetilkolin reseptörlere kısmi agonist olarak çalışır, böylece nikotinik reseptörlere nikotin yerine VRC bağlanır. Bu sayede dopamin salgılanması ile birlikte nikotin yokken bile varmış gibi bir his verir ve sigara arzusu azaltılır (13,15).

Hem agonist hem de antagonist olarak etki gösterebilir. Agonist etkisi ile dopamin salgılanmasını yeterli bir düzeyde tutarak yoksunluk semptomu hafifletirken, antagonist etkisi ile sigara içildiğinde sigaranın verdiği tatmini azaltır ve ikisinin beraber etki göstermesi sigarayı bırakmaya yardımcı olur (11).

Nikotinik reseptörlerin nikotin tarafından aktifleştirmesinden kaynaklı dopamin salınımı, sigaranın bırakılmasıyla dopamin salınımındaki azalış, VRC nikotinik reseptörleri bloke edilmesinden dolayı yeterli seviyede dopamin salınımı ve sigara arzusunun baskılanmasına yardım etmesi Şekil 3'teki şemada anlatılmıştır (16,17).



Şekil 3: (A) Nikotin alınımindaki dopaminin salgılanışı, (B) nikotin bırakmada dopaminin azalışı, (C) VRC varlığında yeterince dopamin salgılanma mekanizmaları (17)

Farmakokinetik

VRC'nin klinik farmakoloji çalışmaları yapılmıştır. Faesel ve ark. VRC'nin farmakokinetiğini aydınlatan bir yayınına göre VRC metabolizmaya uğramadan idrar yoluyla atıldığı ve yaptıkları böbrek fonksiyonu hesaplamasına göre ise yaş, cinsiyet ve ırk gibi faktörlerin VRC farmakokinetik özelliklerini etkilemediği tespit edilmiştir (8).

Absorpsiyon (Emilim)

VRC 'nin ağız yolu ile alınmasıyla hemen hemen tamamı vücut tarafından absorbe edilir ve biyoyararlanım %90'a kadardır (10). Biyoyararlanım, yemek veya alım süresinden etkilenmez. VRC yüksek çözünürlüğe ve geçirgenliğe sahip bir ilaç maddesi olduğundan Biyofarmasötik İlaç Sınıflandırma Sistemine göre sınıf 1 kategorisine girmiştir (8).

Distribüsyon (Dağılım)

Plazma protein bağlanma kapasitesi çok düşüktür (yaklaşık ~20%) (yaş ve böbrek fonksiyonuna bağlıdır). Bundan dolayı VRC tam kan ile plazma arasında eşit dağıldığına rağmen kanda zor bulunur. Ayrıca, kararlı durumundayken ortalama dağılım hacmi yüksek (415 L'ye kadar) olması, beyin olmak üzere tüm dokulara geniş bir dağılımın göstergesidir (8,10).

Metabolizma

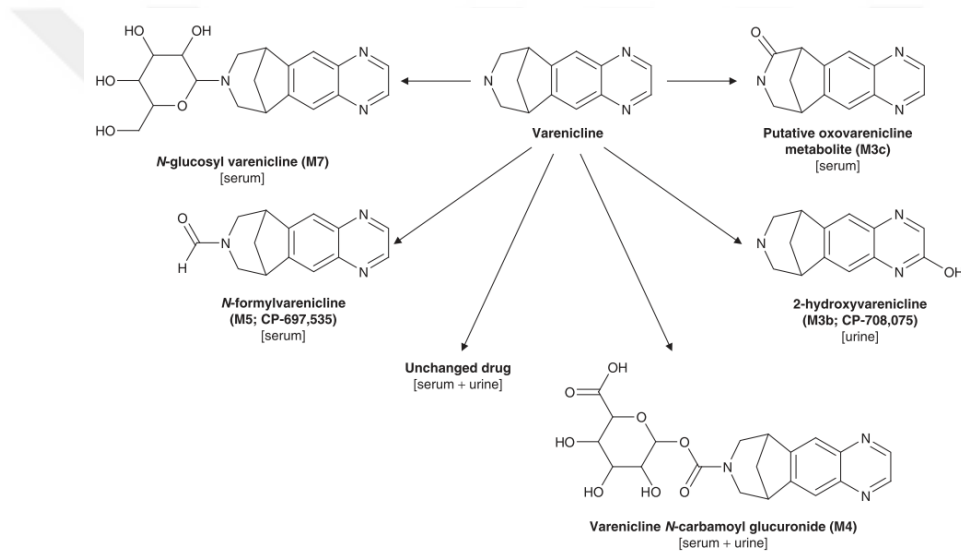
VRC'nin birçoğu (%92) minimum metabolizmaya uğrar ve ilacın kendisi (ana madde) olarak idrar yolu ile vücuttan atılır. Fakat çok az miktarda idrarda metabolitlerine rastlanmaktadır. Bunun yanı sıra, VRC sitokrom P450 enzimini inhibe edememesi ve uyaramaması, klinik anlamda ilaç-ilac etkileşimin düşük bir olasılığı olduğunu gösterir (10).

Scott Obach ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada 1 mg VRC'nin ağız yolu ile alınımında ortalama geri kazanım %88 bulunurken, kişiye bağlı olarak %81-%95 aralığında geri kazanım bulunmuştur. Geri kazanılan ilaçların %95'i (>%90 ana madde olarak, %1'den az dışkıda) idrar yolu ile atılır (18).

VRC metabolizmasının 4 ana yolu (8):

- N-karbamoil glukuronidasyon
- N-formilasyon
- Heksoz şeker ile konjugasyonu
- Oksidasyon

VRC'nin metabolizmaya uğradıktan sonra çıkan metabolitleri, bulunduğu yerler ile birlikte Şekil 4'te gösterilmiştir (8).



Şekil 4: VRC metabolizması ve metabolitleri (8)

İdrar yolu ile atılan metabolitler sadece 2-hydroxyvarenicline ve N-karbamoilglukuronit'dir (alınan dozun %10'unu temsil eder). Tüm metabolitler VRC'nin kendisi ile kıyaslandığında çok düşük sayıda bulundukları için farmakolojik olarak aktif değildirler ve onların kimyasal yapılarına bakıldığında $\alpha 4\beta 2$ nAChR nikotinik reseptörlere çok az ya da hiç aktivite göstermediği düşünülmektedir (8).

Sigara içenlerde ve içmeyenlerde VRC'nin atılım yolları ve metabolit profilleri aynıdır (19–21).

Atılım

Ağız yolu ile tek doz alındıktan sonra maksimum plazma konsantrasyonu 3-4 saate kadar ulaşılırken, kararlı durum plazma konsantrasyonu sürekli alınımda 4. gününde ulaşır (yarılanma ömrü ~24 saattir) (9,10).

Faesel ve ark.'nın ortaya koydukları makaleye göre maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{max}) ulaştıktan sonra VRC plazma konsantrasyonu genellikle çift fazlı olarak azaltma göstermekte ve tek doz şekilde uygulandığında plazmadaki $t_{1/2}$ değeri 14.4-20.1 saat iken, tekrarlayan doz uyguladığında plazmadaki $t_{1/2}$ değeri 23.8-33.0 saattir (19,20).

2.1.2. Varenicline'in Sigara Bırakma Tedavisinde Kullanımı

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH), kanser ve kardiyovasküler hastalık gibi sigara tüketiminden kaynaklanan hastalıklar olup, her iki tütün kullanıcısından birinin ölümüne neden olmaktadır. Sigarayı bırakmak sağlığımızı korumanın en iyi yollarından biridir. Fakat, yardımsız sigarayı bırakma girişimleri çoğunlukla başarısızlıkla sonuçlanır ve sigara bırakanların sadece %3-5'i 1 yıl sonra sigarayı tamamen bırakabilmektedir. Bunun temel nedeni şiddetli arzu ve yoksunluk semptomun tetiklenmesinden gelen sigara içme arzusunun baskısıdır (8).

Dünyada ki yaklaşık 1 milyar sigara kullanıcısından sadece %5'i en az 6 ay boyunca yardımsız olarak sigara bırakmaya başarabilmektedir (22). Sigara bırakma programının başarı oranının artırılabilmesi için farmakoterapi (ilaç tedavisi) boyunca hem davranışsal hem de bilimsel danışmanlık hizmeti alınmasının daha verimli sonuçlar elde edilebildiğini ve abstinens (sigara içmemekten çekinme hissi)'nin arttığı tespit edilmiştir (23).

Son zamanlarda FDA tarafından sigara bırakma tedavisi için 7 farmakoterapiler (ilaç tedaviler) onaylanmıştır; bunlar Zyban (Bupropion), Chantix (Varenicline), ve 5 nikotin

replasmanları (sakız, bant, burun spreyi, inhaler ve pastil)'dir. Nikotin replasmanları vücuda nikotin göndererek etki ederken, Bupropion ve VRC merkezi sinir sistemine etki ederek sigara bırakmada yardımcı olurlar (16).

Tablo II. Sigara Bırakma Tedavisinde Kullanılan Farmakolojik Girişimler (24)

Farmakolojik Girişimler	Nikotin Replasman Tedavileri (NRT)	NRT birkaç şekilde mevcuttur; sakız, bant, burun spreyi, inhaler ve pastil şeklinde olabilir. Bunlar vücuda az ve kontrollü bir şekilde nikotin verir ve her seferinde dozlarını azaltarak sigara bırakmaya yardımcı olurlar.
	Nikotin olmayan farmakoterapileri	Bupropion, VRC ve Cytisine gibi ilaçlar bu gruba dahildir. Bu farmakoterapiler sigara içme arzunu baskılar ve sigara bıraktırmada yardımcı olurlar.

Ravva ve ark. tarafından yapılan farmakokinetik ve farmakodinamik bir çalışmada, VRC plaseboya göre sigara arzusunun ciddi azalttığı gözlemlenmiştir (25). VRC tedavisi, hastanın sigarayı bırakmayı hedeflediği tarihten bir hafta önce başlatılır. Günde bir kez 0.5 mg dozla başlar, 4. günden itibaren günde 2 kez 0.5 mg ile devam eder, ve hedef bırakma tarihi (8. gün)'den itibaren günde 2 kez 1 mg'lık dozla 12 hafta boyunca devam eder (15).

Avrupa'nın 4 ülkesinde (Belçika, Fransa, İngiltere, İsveç) yapılan sigara bırakma tedavilerinin karşılaştırılmasında VRC'nin diğer Nikotin Replasman Tedavileri (NRT)'e göre devamlı sigara içmeme (abstinens) oranının daha yüksek olduğu (VRC %26.1, diğer NRT %20.3) ve maliyet açısından daha uygun maliyetli olduğu tespit edilmiştir (26).

Tonstad ve ark. tarafından yapılan çalışmada 12 haftalık VRC tedavisinin randomize çalışmalarını abstinens (sigara içmemekten çekinme) devamlılığını karşılaştırarak VRC'nin

genel popülasyonda devamlı abstinens oranı diğer farmakoterapi maddeler (Bupropion ve nikotin replasmanları) ile kıyasladığında daha yüksek olduğunu kanıtlanmıştır (10).

VRC'nin verimliliği ile ilgili yapılan araştırmaların sonucunda diğer farmakoterapi ve nikotin replasmanları ile kıyasladığında daha yüksek bırakma başarı oranına sahip ve daha verimli bir sonuç verebildiği tespit edilmiştir (13,27). Hem kısa vadeli hem de uzun vadeli (52 hafta kadar) relapslarda VRC etkisini sürdürdüğü, sigara bırakma oranını arttırdığı ve verimli sonuçlar doğurduğu yapılan araştırmalarda ispatlanmıştır (11,16).

Günümüzde VRC, nikotin replasmanlar ile birlikte en çok tercih edilen ve hekimler tarafından önerilen sigara bırakma tedavilerindendir. Fakat, oluşan yan etkileri düşünüldüğünde psikiyatrik rahatsızlığı olanlarda bu ilacın alınımı önerilmemektedir.

2.1.3. Varenicline'in İnsan Psikolojisi Üzine Etkileri ve Adli Bilimlerdeki Önemi

Champix/Chantix, Dünya üzerinde bilinen ve sigara bırakma tedavisinde etkili ve uygun maliyetli olması nedeniyle geniş kapsamda kullanılan bir ilaçtır. Fakat, bu ilacın FDA ve EMEA tarafından onaylanıp piyasaya sunulduktan sonra birçok intihar ve intihar girişimi vakaları ortaya çıkmıştır. VRC'nin psikiyatrik rahatsızlıklar ve intihar eğilimi ile ilgili bir bağlantısı olduğu düşünülmüştür. Yayımlanan makalelere göre VRC özellikle akıl sağlığı yeterli olmayan kişilerin psikiyatrik olaylarla ilişkisi olduğunu bildirilmiştir (28–31).

39 yaşında bir adam son birkaç ay içinde VRC ile sigara bırakma tedavisi görürken el bileğinde kesik bir yara ile evinde ölü bulunmuş ve intihar etmiş olduğu düşünülmüştür. LC-MS/MS ile adli analizinde kanında VRC'i 10 ng/mL olarak bulunmuştur. Diğer adli toksikolojik incelemelerde herhangi bir ksenobiyotik tespit edilmeyip, kan alkol konsantrasyonu negatiftir. Anamnezden elde edilen bilgiye göre ölünün herhangi bir akıl hastalığı veya depresyon kaydı bulunamamış ve daha önce hiç intihar girişimi olmamıştır. Bu

bulgular, VRC'nin ruhsal davranışlara bir etki yaratabileceğini gösteren raporlar da birlikte düşünüldüğünde VRC'nin intihar eğilimini geliştirebileceği varsayılabilir (23).

Avustralya'nın Brisbane eyaletinde Nisan 2013'te geçmiş psikiyatrik rahatsızlığı olan 22 yaşında bir erkek Champix tedavisi başladıktan 8 gün sonra kendini asarak intihar etmiş. Yapılan otopside Champix ve İbuprofen'den başka herhangi bir alkol veya ilaçlar bulunamamıştır. Ailesinin ifadesine göre intihar etmeden önce ölünün garip davranışta bulunup, intihar düşüncesi gösterdiği gözlemlenmiştir. Avustralya'nın diğer iki eyaletinde (Victoria ve Tasmania) da Champix ile ilişkili intihar vakaları görülmüştür. Tedavi Ürünleri İdaresi (TGA)'ya göre 2010'a kadar Avustralya'da Champix kullanımında 206 intihar girişimleri raporlanmıştır (7).

Moore ve ark. gerçekleştirdiği bir araştırmada FDA tarafından yayınlanan 1998-2010 yıllarını kapsayan Advers Olayları Raporlama Sistemi (AERS)'den alınan verilerden yola çıkılarak 3.249 intihar ve depresyon olgularından 2.925 (%90)'ı VRC, 229 (%7)'u Bupropion ve 95 (%3)'ü nikotin replasmanları olduğu tespit edilmiştir. Bu keşif, VRC'nin diğer farmakoterapilerden daha çok intihar, intihar girişimi ve depresyona yol açan bir madde olduğunu göstermiştir (5).

Pazarlama sonrası gözetiminde NRT ile karşılaştırıldığında VRC (ve Bupropion)'nin depresyon, intihar ve intihar girişimi davranışlarını daha çok arttırdığı raporlanmıştır (4,5,32). Bu raporlar değerlendirilerek Temmuz 2009'da FDA ve EMEA "Black Box" uyarı etiketi (ciddi yan etkileri oluşturabilecek en sert uyarı şekli) hem VRC hem de Bupropion için verilmiştir (33). Daha sonra FDA sponsorluğunda gerçekleştirilen iki epidemiyolojik çalışmada, sigara bırakma ilaçları ile ilişkili nöropsikiyatrik advers olayların riskini değerlendirmede VRC ve diğer NRT'nin taşıdıkları risk açısından bir fark olmadığını ispatlanmıştır (34).

Chantix ve Zyban üreten firma (Pfizer ve GlaxoSmithKline) sponsorluğunda yapılan bir EAGLE araştırmada VRC'nin nöropsikiyatrik advers olayların riskini anlamlı arttırmadığını, ayrıca Bupropion ve nikotin bantlarından sigara bırakma için daha etkili olduğunu tespit etmiştir (35). FDA, bu bulguyu iyice incelenerek 2016'da VRC ve Bupropion için "Black Box" uyarısını kaldırmıştır (36). Fakat, her ikisinin de psikiyatrik riski ile ilgili uyarı etiketleri bulunmaktadır (37,38). Hatta ilaç kullanım kılavuzunda yazılan olası yan etkilerinden biri de "davranış veya düşüncede değişiklikler, saldırganlık, düşmanlık, ajitasyon, depresif ruh hali veya intihar düşünceleri veya eylemleri gibi yeni veya daha kötü ruh sağlığı sorunları" yazılı bir uyarı bulunmaktadır (39).

"Black Box" uyarısının kaldırılmasına rağmen sağlık hizmetleri kuruluşları psikiyatrik rahatsızlığı olan hastalar VRC kullanırken yakından kontrol edilmeli ve nöropsikiyatrik advers olayları gözlemlenmesi halinde sağlık uzmanlarıyla görüşülmelidir.

2.2. Kromatografi

Adli toksikoloji, hem antemortem hem de postmortem evrede elde edilen toksik ajanların çeşitli metot ve tekniklerle inceleyen bir birim dalıdır. Adli bilim insanları polis ekibiyle birlikte bu toksik ajanların cinayet, hırsızlık, intihar, trafik ve iş kazası gibi çeşitli suçlarla ilişkisini bilimsel yöntemlerle tespit etmeye çalışır.

Adli toksikoloji laboratuvarlarında toksik madde analizinde rutin olarak kullanılan birçok teknik vardır; bunlardan birkaçı ise İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresidir (LC-MS), immünoassay, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) (40).

Bilinmeyen madde analizi adli toksikolojideki analizlerin en önemli parçalarından biridir, bunu yapabilmek için genellikle 2 önemli analiz işlemi uygulanır; bunlar ayrıştırma ve

tanıma işlemidir. Günümüzde adli toksikolojide en sık kullanılan, önem taşıyan ve en gelişmiş ayırma teknolojilerinden biri de kromatografik yöntemlerdir (41).

Kromatografik yöntem, bir karışımın içerisindeki maddeleri birbirinden ayırmayı ve saflaştırmayı sağlayan bir işlemdir. Kromatografide, istediğimiz maddenin ayrımının sağlanması ve kantitatif olarak miktarının ölçülmesi hedeflenmektedir.

Kromatografik yöntemin çalışma prensibi, bir ya da birden fazla kimyasal madde içeren bir karışımdan elde etmek istediğimiz tek bir maddeyi iki faz arasındaki (mobil faz ve sabit faz) etkileşimleri sağlanarak saflaştıran bir ayırma tekniğidir. Daha sonra saf halinde elde ettiğimiz maddeyi tanıma analizi için işlev görür.

Ayırma işlemi bittikten sonra tanıma işlemi gerçekleştirmek için çeşitli dedektörlere ihtiyaç vardır. Bu dedektörler, cihazdan çıkan analitin varlığını ve miktarını saptamak için kullanılır. Kromatografik yöntemlere bağlı olan dedektörler, içinden geçen maddeyi zamana karşı sayar ve miktarını kaydederek bir grafiğe dönüştürürler, buna kromatogram denir.

Kütle spektrometresi genellikle madde tespiti için kromatografik yöntemlerle beraber en çok kullanılan dedektörlerden biridir. Kromatografik yöntemlerin her biri için kendine özgü farklı dedektör tipi vardır. Uygun dedektör seçerken analitin özellikleri dikkate alınır. Birkaç dedektörün çeşitleri aşağıda verilmiştir:

- Kütle Spektrometrisi (Mass Spectrometry - MS)
- Fotodiyot Array Dedektörü (Photodiode array detection - DAD)
- Ultraviole/Görünür Bölge Dedektörü (Ultraviolet/Visible Detector - UV/VIS)
- Refraktif İndeks Dedektörü (Refractive index detector - RID)
- İletkenlik Dedektörü (Conductivity detector - CDD)
- Elektrokimyasal Dedektör (Electrochemical detection - ECD)
- Floresans Dedektörü (Fluorescence detector - FLD)

Kromatografik yöntemin ayırma işlemini iki faz arasında yapılır; bunlar sabit faz ve mobil fazdır. Sabit faz, kolon içinde bulunan eşit bir şekilde dağılmış bir katı ya da sıvı maddedir. Mobil faz ise, analiti taşıyan bir sıvı (ya da sıvı solüsyonu) ya da basınç altında olan bir gazdır.

Madde ayırımı sağlayan faktörler arasında molekül büyüklüğü, polaritesi ve molekül yükü sayılabilir. Maddelerin ayırımını sağlayan faktörlerden en önemlisi maddenin kolon ve fazlara karşı olan afiniteleridir (maddenin birbirlerine gösteren tepkileşmesidir).

Analit maddeyi taşıyan mobil faz, sabit fazdan geçerek maddenin ilgisine göre sabit fazla etkileşim yaparak hızlı ya da yavaş kolondan geçer ve madde ayırımı gerçekleşir.

Kromatografik yöntemlerde kullanılan önemli terimler:

- Eluent: ekstraksiyonda yıkama işlemi esnasında solventleri ayırmada kullanılan madde
- Analit: analiz edilen madde
- Kolon: maddeleri geçiren, madde ayırımını sağlayan cisim
- Sabit faz (adsorban): mobil fazın etkileşime girdiği, çeşitli materyalden tasarlanmış maddenin tutunmasını sağlayan bir kolondur.
- Mobil faz (taşıyıcı): fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip, analiti taşıyan çözücü bir karışımdır
- Elüsyon: maddenin kolondan yıkama aşaması
- Eluat: elüsyon işlemiyle meydana gelen çözelti
- Alıkonma: maddenin fazlar arasında etkileşime girmesiyle belirli oranda tutulması, yavaşlatılması ve bu sayede daha geç olarak sabit fazı terk etmesi olayıdır

2.2.1. Kromatografik Yöntemin Çeşitleri

Farklı kromatografik yöntemler seçilerek maddenin varlığı ve/veya miktarı tespit edilebilir. Her maddenin kimyasal yapısına ve özelliklerine göre, kendine uygun bir kromatografik yöntem seçilmelidir. Kromatografik yöntemin sınıflandırılması Tablo III'te verilmiştir (42).

Tablo III. Ayrılma süreçlerine göre, faz tiplerine göre ve uygulama biçimine göre kromatografik yöntemin sınıflandırılması

Ayrılma Süreçlerine Göre Kromatografiler	Uygulama Biçimine Göre Kromatografiler	Faz Tiplerine Göre Kromatografiler
Adsorpsiyon Kromatografisi	Düzlemsel Kromatografisi	Sıvı Kromatografisi
Partisyon Kromatografisi	Kağıt Kromatografisi	Sıvı-Katı Kromatografisi
İyon Değiştirme Kromatografisi	TLC	Sıvı-Sıvı Kromatografisi
Jel Filtrasyon (Moleküler Eleme) Kromatografisi	Kolon Kromatografisi - GC - HPLC	GC

Aşağıdaki Tablo IV'te birkaç kromatografik yöntemin özellikleri, kullanılan mobil ile sabit fazları ve ayrışma şekli listelenmiştir (43).

Tablo IV. Kromatografik yöntemin özellikleri, kullanılan mobil ile sabit fazları ve ayrışma şekli

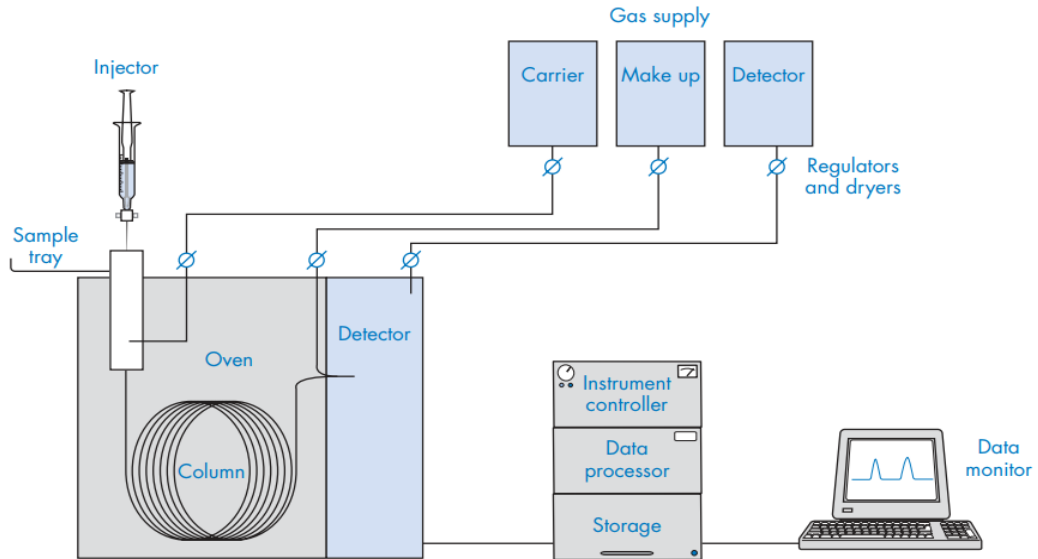
Metod	Mobil Faz	Sabit Faz	Ayrışma Şekli
Gaz-Sıvı Kromatografisi	Gaz	Sıvı	Molekül büyüklüğü/polarite
Gaz-Katı Kromatografisi	Gaz	Katı	Molekül büyüklüğü/polarite
Süperkritik Akışkan Kromatografisi	Süperkritikal sıvı	Katı	Molekül büyüklüğü/polarite
Ters Faz Kromatografisi	Polar sıvı	Apolar sıvı veya katı	Molekül büyüklüğü/polarite
Normal Faz Kromatografisi	Az polar sıvı	Daha polar sıvı veya katı	Molekül büyüklüğü/polarite
Iyon Değişim Kromatografisi	Polar sıvı-iyonik katı	Iyonik katı	Molekül yükü
Büyüklik Dışlanımlı Kromatografisi	Sıvı	Katı	Molekül büyüklüğü
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	Polar sıvı	Apolar sıvı veya katı	Molekül büyüklüğü/polarite
Afinite Kromatografisi	Su	Bağlanma bölgesi	Spesifik yapı

Genel rutinde adli toksikoloji analizlerinde kullanılan kromatografik yöntemler aşağıda bahsedilmiştir.

Gaz Kromatografisi (GC)

Modern bir GC sistemi, kapiler GC denilen 30 metreye kadar uzanabilen, kolonun içinde bulunan, kalın, yüksek kaynama noktalı ve viskoz sıvılı bir sabit fazı vardır. Mobil faz olarak genellikle Helyum (en yaygın kullanılan), Hidrojen ve Azot inert gazları tercih edilir. Analiz edilen madde gaz/buhar halinde bir mobil fazda yer aldığı için önce fırında yüksek sıcaklıkta ısıtılarak gaz/buhar haline getirilir. Daha sonra mobil faz yüksek bir basınç yardımı ile sabit faza geçer ve analiz cihazına geçer.

Gaz kromatografisinde, analiz edilecek maddeler 350° C (sabit fazın maksimum sıcaklığında) kısmi ya da tamamen buhara dönüştürebilmeli ve o sıcaklıkta kararlı halde kalabilmelidirler. İnert gaz vasıtasıyla mobil fazdaki tüm sistemin oksijenlerini temizler (purge yapar) ve normalde adli açıdan önemli olan, fakat yüksek sıcaklıkta kararlı olmadığından dolayı patlayıcı maddeler içeren numuneler için patlama olayı önlenerek analiz edilirler (44).



Şekil 5: Modern bir GC sistemi (45)

GC analizinde bazı maddeler parçalandıktan sonra, yüklü olmadıkları için kolona tutunamazlar. Dolayısıyla, bunun için bir takım türevlendirme işlemine ihtiyaç vardır. GC ile birlikte en yaygın kullanılan ve en iyi sonuç veren dedektör kütle spektrometresidir (MS).

GC/MS, adli toksikoloji kapsamındaki adli madde tanımlaması ve yangın/patlayıcı madde analizinde altın standart olarak adlandırılan bir yöntemdir (46). Bunun nedeni de kolondan çıktıktan sonra pek çok laboratuvar tarafından kullanılan parçalanma metodu (Electron Impact (EI) iyonizasyonu) ile hep 70 eV olarak standart bir parçalanma enerjisi uygulanır ve maddelerin bir kütle spektrum kütüphanesi oluşturulur. Her zaman, her yerde, tekrarlanabilir parçalanma ile birlikte pozitif madde tanımlanması ve kapsamlı bir ticari ilaç kütüphanesi mevcut olduğundan dolayı, geniş çaplı bir toksikoloji taraması için eşsiz bir yöntemdir (47).

İdrarda veya serumda GC-MS tarafından yapılan Sistemik Toksikoloji Analizi (STA), geniş referans kütüphaneleri (örneğin Maurer/Pfleger/Weber GC-MS kütüphaneleri) sayesinde, kapsamlı bir ilaç taraması için oldukça başarılıdır (48).

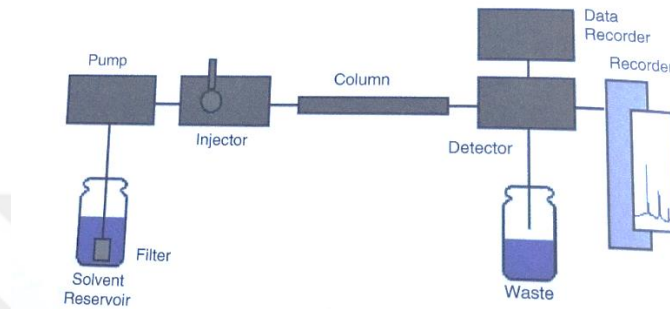
İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

TLC, bir karışımdaki analizlemek istenilen maddeyi ayırmak için sabit faz (bir plaka üzerine kaplanmış olan madde) ile hareketli faz (bir geliştirme tankında buhar olarak bulunan madde) arasındaki çözünürlük farklılıklarına göre ayırmayı sağlayan bir tekniktir (49).

TLC, numune veya numunenin parçacıklarının tanıtımında kesin bir sonuç vermese de, adli araştırmalarda sorgulanan numunelerin standartları bilinen (örneğin pozitif kontrol numunesi) maddeler ile karşılaştırılarak bir ön tanımlama sağlanabilmektedir. Bunun için, sorgulanan analit ile standart numuneyi aynı TLC plakada yürütüldüğünde, eşit zamanda, aynı hızda sürüklenip sürüklenmediği gözlemlenebilir (50).

Sıvı Kromatografisi (LC)

Günümüzde LC-MS ve LC-MS/MS klinik ve adli toksikolojide yüksek seçicilik, hassasiyet ve evrensellik özelliklere sahip olduğu için vücut örneklerindeki ilaç, zehir ve/veya metabolitlerinin tespiti ve tayininde vazgeçilmez bir araçtır (51). Temel bir LC sistemi Şekil 6'daki şemada gösterilmiştir.



Şekil 6: Temel bir LC sistemi (44)

Çözücü dağıtım sistemine göre ayırma türü belirlenir. Analiz boyunca tek bir çözücü (ya da çözücü karışımı) sistemi kullanılan ayırmaya izokratik elüsyon, polariteleri birbirinden farklı birden fazla çözücü sistemi ile yapılan ayırmaya da gradient elüsyon denir (52).

Tek aşamalı ya da ardışık kütle spektrometresi dedektörlerine bağlı olan sıvı kromatografisi (LC-MS, LC-MS/MS) ile bugünlerde popüler olmuş Uçuş Zaman (TOF) ya da Orbitrap analizör gibi yüksek çözünürlüğe sahip olan dedektörlerle bağlı bulunan LC sistemi, rutin toksikoloji analizinde, özellikle miktar saptanmasında çok önemli yeri vardır. MS dedektörlü LC'nin en önemli avantajlarından biri de numune hazırlanmasının basit ve hızlı oluşu, ayrıca genellikle türevlendirme gerektirmemesidir (53).

GC-MS, kapsamlı tarama için spesifik ve universal bir metot iken, LC-DAD de rutin tarama için kullanılır. Fakat, GC-MS'e göre daha az ayırma gücü ve spesifikliğe sahiptir. Bu iki metot kıyasladığında LC'nin MS (tek yada kuadropol) dedektörlü sistemi, klinik ve adli

toksikoloji açısından en ideal ayırma metoduna sahiptir. Özellikle daha polar, termolabil ve/veya düşük doz ilaçlar bilhassa kan plazma analizleri için uygundur (54).

LC-MS'in GC-MS'e karşı birkaç avantajları ise daha büyük bileşiklerin analiz kabiliyetinin olması (1000-2000 amu'ya kadar), analitin uçucu hale dönüştürülmeye gerek kalmaması ve analitin aköz matrislerden ekstrakte edilmesine ihtiyaç duyulmaması sayılabilir (55).

2.2.2. Sıvı Kromatografisi – Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

Kromatografik yöntemlerden adli açısından en önemli olanı LC-MS/MS'dir. Çok düşük miktarda madde analiz edebilme kabiliyeti ile birlikte, hem hassasiyet hem de doğruluk açısından iyi sonuçlar vermesi sayesinde LC-MS/MS adli toksikolojide altın standart yöntem olarak bilinmektedir (56). LC-MS/MS ile matrislerde eser miktarda ve de düşük konsantrasyonda bulunan maddelerin kalitatif ve kantitatif tayini yapmak mümkündür.

Vücut sıvısında psikoaktif maddelerin kapsamlı tarama prosedürü, klinik ve adli toksikolojinin esas külfetidir, dolayısıyla günden güne yeni psikoaktif maddelerin (NPS) ortaya çıkması ve yaygınlaşması ile birlikte LC-MS/MS gibi bilinmeyen bir maddenin tespitini yapmak için sürekli uygun olan metodunun güncel olarak takibi yapılması gerekmektedir (57).

Maublanc ve ark. rutin adli toksikoloji analizinde, çok düşük konsantrasyonda bulunabilen, fakat maddelerin en uzun süre tespit edilebildiği saç numunelerinden yola çıkarak yaptıkları çalışmada, gerçek klinik ve adli vakalardan 35 tane psikotrop ilaçlar ve metabolitlerinin tayini LOD ve LOQ tatmin edici düzeyde LC-MS/MS ile analiz edilmiştir (58).

Maurer ve ark. tarafından yapılmış diğer bir çalışmada ise LC-MS ve LC-MS/MS' in adli toksikoloji analizleri için tam kan, plazma ve serumda maddenin tespiti ve tayini için ideal bir yöntem olduğu ortaya konmuştur (59).

Bu çalışmalar sayesinde LC-MS/MS'in spesifikliği ve hassaslığı bir kez daha kanıtlanmıştır.

LC-MS/MS analizinde 3 veri toplanır: alıkonma zamanı, m/z ana iyonu (*precursor ion*), ve m/z parçalanma sonu oluşan iyonlar (*product ions*). Ana iyon ve ürün iyonlarının kütlesi, molekülün temel özelliklerini (moleküler ağırlığı ve yapısı) temsil etmektedir. LC-MS/MS, moleküllerin temel özelliklerine dayalı yüksek bir specificliğe sahip olan analitik yöntemdir (60).

MRM çalışma modu son derece seçici ve hassastır. Çünkü kütle analizörleri yalnızca hedef analitin özelliklere sahip olan iyonları iletir ve kimyasal gürültünün çoğunu ortadan kaldırır (60).

LC-MS/MS analizinde specificliği ve hassasiyetine etkileyen faktörler (60):

- Analitlerin kimyasal özellikleri
- İyonizasyon tipi
- İyonize ya da iyonize olabilen grupların bulunması
- Moleküllerin polariteleri
- Yüzey aktivitesi
- Mobil fazın kompozisyonu
- Parçalama modeli

LC-MS/MS tarama prosedürü genellikle Sistematik Toksikoloji Analizi (STA) yerine daha çok *multitarget* tarama prosedürlerine odaklanır, bunun için SIM veya MRM modunda analitlerin sadece belirli sayıda analiz edilir. Önceden seçilmeyen analizler tespit edilemez. Bu sayede, analitlerin analizi için kullanılan MS metotları daha hassas ve özgül bir şekilde geliştirilebilir, oysa ki GC-MS de hidrofilik ve termolabil özelliklerinden dolayı buna uygun değildir (56).

LC-MS/MS'in dezavantajlardan biri matriks etkisidir. Bu sorunu çözmek hakikaten zordur, çok iyi bir numune hazırlanma prosedürü olsa da yine de bu sorun tamamen ortadan kaldırılamıyor. Ayrıca kromatografik ayrımı genellikle birkaç analitin ayırmaya yönelik planlanmıştır, bu yüzden matriks etkisini en aza indirmek için yapılan ayırma, optimizasyonu için daha az seçenek kalır (61).

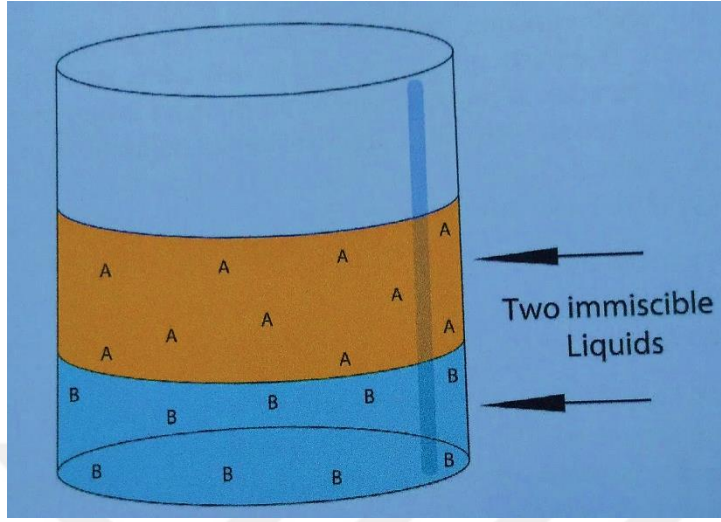
2.2.3. Ekstraksiyon (Çekitleme İşlemi)

Kromatografik sisteme analiti tanıtmadan önce analiz edilecek numuneler ön işleminden geçirilmesi gerekir, bu işleme ekstraksiyon (çekitlenme) denir. Bu işlemlerin amacı, istenilen maddeyi matriks numunenin içinden çekitlemek ve istenmeyen bileşenlerinden (kirliliklerinden) uzaklaştırmaktır. İki çeşit ekstraksiyon yöntemi mevcuttur; Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon ve Katı-Faz Ekstraksiyondur.

Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu (LLE)

Bir analitin ayrışması için birbirine karışmayan iki (ya da daha fazla) çözücünün arasındaki rekabete dayanarak bir bölme işlemidir. Bu işlem Şekil 7'deki diyagram ile anlatılmıştır. Analitin dağılımına etki eden en önemli kimyasal özellikleri de, polarite ve pH'dır (44).

Sıvı-sıvı ekstraksiyonun temeli; çözünürlüğe, asit baz dengesi ve analitin sulu faz ile organik faz arasındaki dağılımına dayalıdır (62).

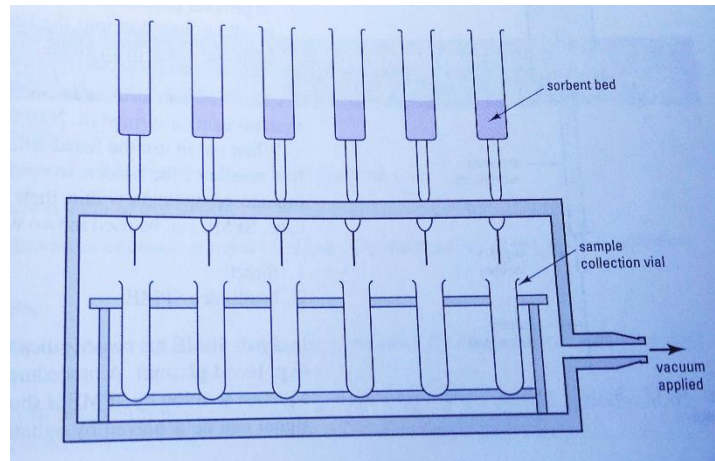


Şekil 7 : Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonun temel prensibi (44)

Birbirine karışmayan çözücüler tercih edilir. Yoğunluğu daha düşük olan, yoğunluğu daha yüksek olan çözücünün üstünde yer alır. Biri diğerinden daha polardır. Polar analitler, polar karışımında daha kolay çözünür.

Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Katı Faz Ekstraksiyonu, bir kartuş aracı ile adsorpsiyon (yüzeye tutunma) kabiliyetine dayanarak yapılan bir ayırma metodudur. Analitler, kartuş içindeki adsorbanlarla etkileşim yaparak madde ayırımı sağlar. Bir çoklu SPE manifoldu Şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 8: Çoklu SPE manifold (52)

Genelde SPE beş aşamada yapılır, bunlar:

1. Kartuşu ıslanması
2. Kartuşu şartlanması
3. Örneği yüklenmesi
4. Kartuşu yıkanması (istenmeyen maddeleri uzaklaştırmak için)
5. Elüsyon ve istenen maddenin elde edilmesi (52)

2.3. Validasyon Çalışması

Bir analiz yöntemin geçerli sayılabilmesi için belirleyen belli bir standarda göre yapılması lazım. Geçerli kılma (validasyon) işlemi, analitik metodun gerekli koşulları karşılayacak kabiliyete sahip olduğunun onaylanması işlemidir (63).

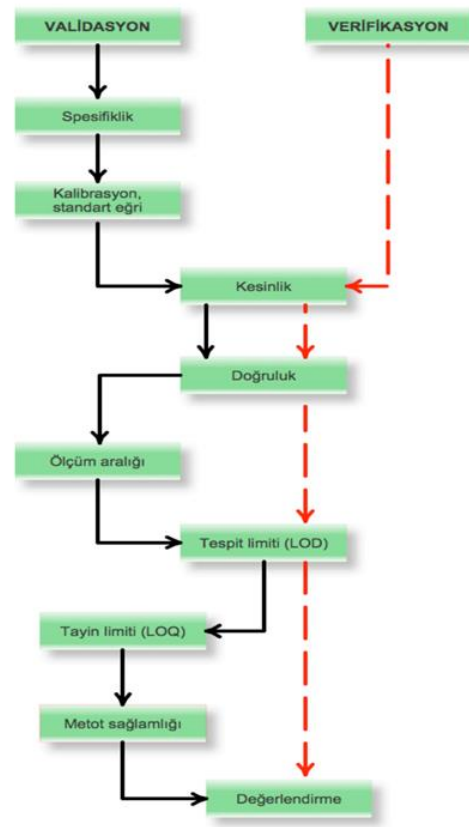
Bir validasyon çalışması planlarken matriks özellikleri, konsantrasyon seviyeleri, personelin becerikliliği ve validasyon parametreleri dikkate alınarak hem tekrarlanabilirlik, hem tekrar üretilebilirlik, hem de geçerlilik çalışmaları içeren bir çalışma düzeni dizayn edilir. (64).

Yeni bir metot geliştirme analizinde tam validasyon için kullanılan validasyon parametreleri (64):

- Seçicilik (Selectivity) / Spesifiklik (Specificity)
- Ölçüm Tespit Limiti (Limit of Detection)
- Limiti (Limit of Quantification)
- Ölçüm Aralığı/Doğrusallık (Range/Linearity)
- Doğruluk
 - Kesinlik (Presicion)
 - Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

- Tekrar Üretilirlik (Laboratuvarlar arası) (Reproducibility- Inter Laboratory)
- Gerçeklik (Trueness)
 - Bias
 - Geri kazanım
- Sağlamlık (Robustness/Ruggedness)

Bu çalışmada birbirinden sık karıştırılabilen 2 önemli terim mevcuttur; bunlar geçerli kılma (validasyon) ve doğrulama (verifikasyon)dur. Geçerli kılma (validasyon), metot parametrelerin uygulanacağı bir takım çalışmaya uygun olup olmadığını inceleyen bir geçerlilik çalışmasıdır; doğrulama (verifikasyon) ise laboratuvar arası belirlenmiş olan kriterleri bir metodun laboratuvar şartlarında kanıtlanmasıdır (65). Bu ikisinin arasındaki farkı Şekil 9'daki şemada anlatılmıştır.



Şekil 9: Validasyon ve verifikasyon ayrımı (65)

2.3.1. Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specificity)

Seçicilik/spesifiklik, metodun aranan analitin aynı örnek içinde bulunan başka analitleri ile ayırt edebilme kabiliyetidir. Bu özellik metodun analite özgü olup olmadığını göstermektedir.

Kromatografik yöntemlerde blank örneğinde hedef analite herhangi bir girişim oluşturabilecek bir pik olmamalıdır (64).

2.3.2. Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk, kullanılan yöntemlerle elde edilen ölçüm sonuçların referans (gerçek) değere yakınlığıdır (64). Sistemik ve rastgele hataları dikkate alınarak sonuçların doğruluğu değerlendirilir. Gerçeklik ve kesinlik olmak üzere iki tane ana bileşeni vardır.

2.3.2.1. Gerçeklik (Trueness)

Gerçeklik, belirli sayıda analiz sonucu ortalamasının gerçek değere yakınlığıdır (66). Gerçeklik çalışmasında sistemik hata hesabı (bias) da yapılabilir.

2.3.2.2. Kesinlik (Precision)

Kesinlik, bir analitik yöntemi tekrar tekrar uyguladığında birbirine yakın değerler tutarlılığıdır. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olmak üzere ikiye ayrılır.

2.3.2.2.1. Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Aynı laboratuvarında aynı analist tarafından aynı metot ve cihaz kullanarak kısa zaman aralığı içinde elde edilen ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesidir. ‘r’ ile ifade edilir.

Tekrarlanabilirlik, bir yöntemin aynı koşulları altında kısa zaman aralığında işlenilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçmesidir. Standart sapma (s_r), bağıl standart sapma (RSD_r) veya % bağıl standart sapma ($\%RSD_r$) ile ifade edilir.

2.3.2.2.2. Tekrar Üretebilirlik (Reproducibility)

Farklı laboratuvarlarda farklı analist, farklı ekipman ve kimyasallarla geniş zaman aralığı içinde elde edilen ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesidir. ‘‘R’’ ile ifade edilir.

Tekrar üretebilirlik çalışması için en az 6 tekrarlı olmalı ve her bir analit için belirlenen konsantrasyon seviyelerinde elde edilen verilerin standart sapması hesaplanarak tekrar üretebilirlik için s_R ve $\%RSD_R$ ($\%CV_R$) hesaplanır.

Kesinlik, kantitatif analizlerde standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (RSD) ile ifade edilir.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - X_r)^2}{N-1}} \quad \quad \quad \%RSD (CV) = \frac{SD}{X_r} * 100$$

X_r : Ölçüm sonuçlarının ortalaması

X_i : Her bir ölçüm sonucu

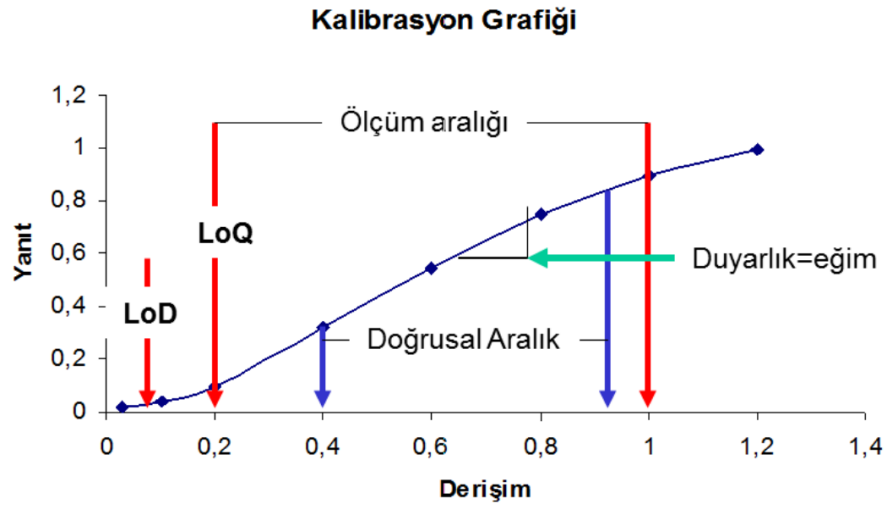
N : Yapılan çalışma sayısı

2.3.3. Doğrusallık (Linearite) ve Çalışma Aralığı (Range)

Doğrusallık, belirli konsantrasyon aralıklarında yapılan ölçüm sonuçlarının konsantrasyon ile orantılı olarak değişmesidir. Eurachem rehberine göre yapılan ölçüm en az 6 noktada ve 3 tekrarlı olmak üzere yapılmalıdır. Referans konsantrasyona karşı ölçüm

sonucu veya ölçüm sinyali olarak görüntülenebilir ve grafiksel olarak sonuç verilebilir. Doğrunun denklemi ($y=ax+b$) ve korelasyon katsayısı (r) ile ifade edilir. Korelasyon katsayısının ± 1 'e yakın olması kalibrasyon eğrisinin lineer olduğunun göstergesidir (64). Ayrıca F değeri ile karıştırılarak doğrusallık da kontrol edilebilir. Hesaplanan F değeri, F tablosundan (%95 güven aralığında $n-2$; $n \cdot p - n$ serbestlik derecesi ile) elde edilen değerden küçük ise kalibrasyon eğrisi doğrusal olarak kabul edilir (65).

Çalışma aralığı, yöntemin kabul edilebilir bir belirsizlik sonucu temin edilen aralıktır. Çalışma aralığının en alt sınırı, LOQ (tayin limiti)'dir. Çalışma aralığının üst sınırı, analitik duyarlılıkta önemli bir bozulmanın tespit edilen konsantrasyondur (63).



Şekil 10: Cihaz ve metodun çalışma aralığının belirlenmesi için çizilen kalibrasyon grafiği (66)

2.3.4. Tespit Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ)

Tespit limiti (LOQ) analite ait pikin gürültüden ayırt edebildiği ve maddenin varlığını belirlenebildiği en düşük konsantrasyondur. Algılama limiti olarak da bilinir. Tayin limiti

(LOQ) yöntemin performansının kabul edilebildiği hesaplanabildiği en düşük konsantrasyondur.

TURKLAB Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve Verifikasyonu Rehberine göre hesaplamalar; kör örneklerin sonuçları üzerinden, düşük analit miktarı üzerinden, yöntemin standart sapması üzerinden veya cihazın sinyal-gürültü oranından yapılabilir. Bunun yanı sıra elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin doğrulaması da yapmak lazım (65).

2.3.5. Sağlamlık (Robustness)

Sağlamlık, analitik yönteminde yapılan planlı değişikliklerinden ölçüm sonuçları üzerindeki etkisini incelenmesidir. Her ne kadar az değişiklik yapılırsa yöntem o kadar sağlamdır. Oda sıcaklığı, analistin tecrübesi, kimyasalların markası ya da saklama koşulları gibi faktörlerin üzerindeki değişiklik yaparak yöntem performansındaki etkisini de incelenebilir.

2.3.6. Ölçüm Belirsizliği

Belirsizlik, ölçülen büyüklüğe anlamlı olarak karşılık gelebilecek değerlerin dağılımını gösteren bir parametredir. Ölçüm Belirsizliği, geçerli kılma bileşenlerinden değildir. Ancak geçerli kılma aşamasında belirsizlik kaynakları tespit edilip belirsizlik değeri hesaplanmak analitik çalışması için daha sağlamdır. Validasyon çalışmasında en büyük belirsizlik kaynağı; kesinlik, gerçeklik ve doğrusallıktır. Her bir bileşenin standart belirsizliği üzerinden Relatif Standart Belirsizlik hesaplanır ve tüm Relatif Standart Belirsizlikler birleştirilerek Birleşik Standart Belirsizlik (U_c) değeri hesaplanabilir (67).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan tüm cihaz, araç ve gereçleri Tablo V’de gösterilmiştir.

Tablo V. Kullanılan tüm ekipman ile markaları ve modelleri

Ekipman Adı	Marka/Model
LC-MS/MS Sistemi	Shimadzu LCMS-8045
Yazılım	LSS Main Window
Analitik Kolon	Restek Raptor Biphenyl C18 2.7 µm 100 x 2.1 mm
Ön (Guard) Kolon	Welch HPLC Guard Column 4.6 x 10 mm
Santrifüj	Hettich Universal 320R
Vorteks	Weightlab Instruments WN-V2800
Azot altında uçurma düzeneği	Hyper Vap HV-300
Elektronik Hassas terazi	Mettler Toledo
Sıcak su banyosu	Bandelin Sonorex
Distile su cihazı	MilliQ Synthesis A10
pH kağıdı	McolorpHast Universal Indicator
Falkon Tüp (15, 50 mL)	ISOLAB
Balon Joje (5 mL)	ISOLAB
Otomatik pipet (20, 100, 200, 1000, 5000 µL)	Eppendorf
Pipet ucu	ISOLAB
Cam vial	Agilent
İnsert vial	Agilent
Şiringa	Set Inject
Şiringa Ucu Filtre (CA 0.22 µm)	ISOLAB
Tüp sporları	ISOLAB
Eppendorf	ISOLAB
Buzdolabı	Arçelik
Parafilm	ISOLAB

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan standart ve kimyasal maddelere ait bilgiler Tablo VI’te verilmiştir.

Tablo VI. Çalışmada kullanılan standard ve kimyasal maddeler

Madde Adı	Markası
Varenicline tartrate ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich PZ0004-5MG
Diazepam-d5 (iç standart, IS)	Lipomed DIA-826
Metanol	Merck 1060072500
Sodyum hidroksit	Sigma
Dietil eter	Merck
Amonyum format	Merck
Formik asit	Merck 1002632500
Asetonitril	Sigma-Aldrich 34851 HPLC, gradient grade, $\geq 99.9\%$

3.3. Çalışma Planı

Bu çalışmanın, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 05 Kasım 2019 tarihinde yapılan toplantıda, 170549 sayılı karar ile etik açıdan uygun olduğuna karar verildi (Ek-1).

Bu çalışmada kullanılan kan ve idrar örnekleri Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Sigara Bıraktırma Polikliniğinde sigara bıraktırma tedavisi gören hastalarda Champix ilaç tedavisine başlamış olup, üzerinden en az 2 hafta geçmiş olan hastalardan gönüllü olarak alındı. Hastalara, araştırmanın amacı, detay bilgileri ve katılacağını dair onay vermesi için açık bir şekilde bilgilendirilerek onam formları imzalatıldı. Örnek alımı

için her hastadan steril bir idrar kabına idrar ve 2 mL’lik mor kapaklı tüplere 2 tüp kan alındı. Toplanan biyolojik numuneler analiz edilinceye kadar -20°C’de saklandı. Toplam 16 hastadan kan ve idrar örnekleri alındı.

Hastaların plazma ve idrarında VRC tayini yapabilmek için LC-MS/MS cihazı kullanarak kromatografik bir yöntem geliştirildi ve validasyon işlemini yapıldı. Bu geliştirilen yöntemle toplanan numuneler LC-MS/MS sistemi ile analiz edildi.

3.4. Varenicline Analizi

3.4.1. Varenicline Analizinde Kullanılan Çözeltiler

- **İç Standart (IS) Çözeltisi**

Ana stok çözelti (10 ppm): 100 ppm Diazepam-d5 referans standart çözeltisinden 100 µL alınıp MeOH ile 10 mL’ye kadar tamamlandı.

Ara stok çözeltisi (250 ppb): 10 ppm Diazepam-d5 ana stok çözeltisinden 250 µL alınıp MeOH ile 10 mL’ye kadar tamamlandı.

Tüm çözeltilere son hacimde 25 ppb olacak şekilde IS eklendi.

- **VRC Standart Çözeltisi**

Ana stok çözeltisi (100 ppm): 1 mg %98 varenicline standardı (katı) tartıldı 10 mL’lik balon joje içerisinde 10 mL’ye kadar MeOH ile tamamlandı.

Ara stok çözeltisi (1 ppm): Ana stok çözeltisinden 10 µL alınıp 1 mL’ye kadar MeOH ile tamamlandı.

Ara stok çözeltisi (100 ppb): 1 ppm ara stok çözeltisinden 100 µL alınıp 1 mL’ye kadar MeOH ile tamamlandı.

Hazırlanan tüm IS ve standart çözeltiler parafilm ile kaplanarak +4°C’de buzdolabında muhafaza edildi.



Şekil 11: Çalışmada kullanılan referans standart (Varenicline Tartrate, 5 mg, Sigma)



Şekil 12: 5 mL'lik balon jode hazırlanan 100 ppm’lik VRC ana stok çözelti

- **Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması**

VRC ara stok çözeltilerinden ve IS çözeltisinden nihai hacim 1 mL olacak şekilde blank ve 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 ppb kalibrasyon noktaları Tablo VII’deki gibi hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler viallere koyup analiz için LC-MS/MS cihazına verildi.

Tablo VII. Kalibrasyon noktalarının hesaplanması

Kalibrasyon Noktaları	MeOH	IS MIX (25 Ppb)	VRC	Alınan VRC Ara Stok Solusyon
Blank (kör)	900 µL	100 µL	-	-
0.1 ppb	899 µL	100 µL	1 µL	100 ppb VRC ara stok çözeltiden alındı
0.2 ppb	898 µL	100 µL	2 µL	
0.5 ppb	895 µL	100 µL	5 µL	
1 ppb	890 µL	100 µL	10 µL	
2 ppb	880 µL	100 µL	20 µL	
5 ppb	895 µL	100 µL	5 µL	1 ppm VRC ara stok çözeltiden alındı
10 ppb	890 µL	100 µL	10 µL	
25 ppb	875 µL	100 µL	25 µL	
50 ppb	850 µL	100 µL	50 µL	
100 ppb	800 µL	100 µL	100 µL	

- **1 M NaOH (Sodyum Hidroksit) Çözeltisinin Hazırlanması**

4 g NaOH tartıldı, falkon tüpte ultra saf suda çözdürülerek 100 mL'ye kadar tamamlandı.

3.4.2. Örnek Hazırlama Prosedürü (Çekitleme Yöntemi)

VRC tayin analizi için geliştirilen bu yöntemde, numuneler LC-MS/MS sisteminde analiz edilmeden önce çekitleme ön işleminden geçirildi. Çeşitli konsantrasyonlarında VRC standart çözeltisi ile zenginleştirilen boş idrar ve plazma (spike) numuneleri, Sıvı Faz Ekstraksiyonu (çekitleme) işleminden geçirilerek ölçümlerini yapıldı. Ekstraksiyon işleminden çıkan sonuçlar geri kazanım değerleri hesaplanmak için kullanıldı.

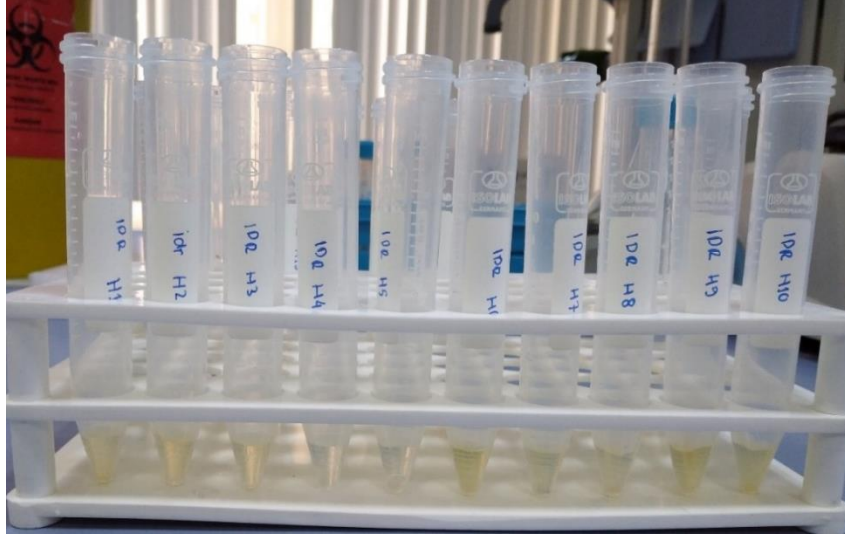
İdrar

1 blank, 3'er spike (10, 25, 50 ppb) idrar çalışıldı. Steril idrar kabına toplanan boş idrarından 15 mL'lik falkon tüpe 500 µL'şer idrar konuldu. Nihai hacim 500 µL, VRC konsantrasyonları 10, 25, 50 ppb ve IS konsantrasyonu 25 ppb olacak şekilde Tablo VIII'de gösterdiği gibi VRC ve IS eklendi.

Tablo VIII. İdrar spike konsantrasyon için hesaplamalar

Numune	IS (250 ppb Ara Stok Solusyonundan)	VRC (1 ppm Ara Stok Solusyonundan)
Blank	50 µL	-
Spike 10 ppb	50 µL	5 µL
Spike 25 ppb	50 µL	12.5 µL
Spike 50 ppb	50 µL	25 µL

Ardından 500 µL 1 M NaOH eklenip vortekslendikten sonra pH 11'e getirildi (pH kağıdıyla kontrol edildi). Bir sonraki aşama Sıvı Faz Ekstraksiyonudur (çekitleme). 2 mL dietil eter eklenip 3 dakika vortekslenip 3 dakika 5000 rpm hızla santrifüj edilerek üst fazı alındı. Bu ekstraksiyon basamağı 2 kere yapıldı. Daha sonra toplanan üst fazları azot uçurmaya bırakıldı. Numuneler tamamen uçurduktan sonra 500 µL mobil faz A+B (1:1) ile çözünüp 1 dakika vortekslenip viallere konuldu. Numuneler mobil faz ile çözüldükten sonra büyük partikülleri mevcut ise şiringa yardımı ile filtreden geçirilip, insert viallere konuldu. Numuneler LC-MS/MS'e verilmeye hazır hale getirildi.



Şekil 14: Geri kazanım çalışması için çekitlenme işleminden geçirilmiş azot uçurmaya hazır idrar örnekleri

3.4.3. Yöntemin LC-MS/MS Sistemi ile Geliştirilmesi

LC-MS/MS sistemi ile yöntem geliştirme çalışması için önceki çalışmadan yola çıkarak VRC'nin ürün iyonları, parçalanma enerjileri, VRC için uygun mobil faz çözeltisi, akış zamanı, uygun kolon bilgileri araştırıldı. Tablo IX'da gösterilen değerler LC-MS/MS sistemin parametreleri olarak seçildi ve eklendi. VRC'nin kimyasal özellikleri dikkate alınarak metoda uygun mobil fazları seçildi. Belirli konsantrasyonlarda VRC standart çözelti LC-MS/MS sisteminde analiz edilerek alıkonma zamanı tespit edildi. LC sistemi için uygun parametreler Tablo IX'de verilmiştir.

Akış zamanı ve mobil fazların oranları üzerinde değişiklik yapılarak iyi bir ayırım ve seçicilikte VRC piki elde edilmeye çalışıldı. Geliştirdiği yöntem için oluşturulan mobil fazların zamana göre değişimi Tablo X'da verilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki VRC'nin pik alanları değerlendirilerek yöntemin duyarlılığı değerlendirilip validasyon parametreleri çalışıldı. Çalışmada kullanılan LC-MS/MS düzeneği Shimadzu LCMS-8045 modeli Şekil

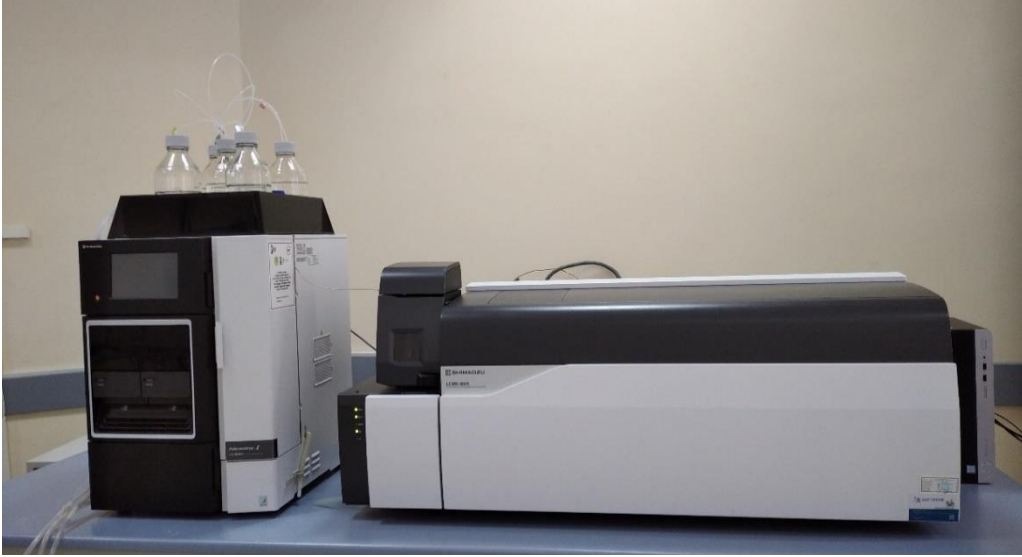
13'te gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan iyonizasyon modu Elektrosprey İyonizasyonu (ESI)'dir. Tarama türü MRM'dır.

Tablo IX. LC sistemin parametreleri

Akış Hızı	0,4 mL/dk
Analiz Süresi	17 dk
Enjeksiyon Hacmi	2 µL
Kolon Fırın Sıcaklığı	50 °C
Mobil Faz A	1L dH ₂ O (2 mM Amonyum Format + %0,1 Formik Asit)
Mobil Faz B	1L MeOH (2 mM Amonyum Format + %0,1 Formik Asit)
Kolon	Restek Raptor Biphenyl C18 2.7 µm 100 x 2.1 mm
Alıkonma Zamanı (t _R) VRC	3,816
Alıkonma Zamanı (t _R) Diazepam-d5	8,306

Tablo X. Mobil fazın zamana göre akış değişimi

Zaman	Akış Hızı (mL/dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
2,00	0,4	60	40
8,00	0,4	5	95
13,00	0,4	5	95
13,01	0,4	95	5
17,00	0,4	95	5



Şekil 15: Çalışmada kullanılan LC-MS/MS düzeneği

3.4.4. Validasyon Çalışmaları

3.4.4.1. Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specifity)

Varenicline analizi için geliştirilen madde 3.4.3'te açıklanan yöntemin VRC ve IS (Diazepam-d5)'in tespit edildiği alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim olup olmadığını gözlemlemek için; sadece VRC içeren MeOH, sadece IS içeren MeOH ve sadece spike edilen IS içeren blank plazmayı ve blank idrara analiz edildi. Çıkan pikleri karşılaştırılarak herhangi bir girişim olup olmadığı değerlendirildi.

3.4.4.2. Tespit Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ) Hesaplamaları

LOD ve LOQ hesaplayabilmek için hem idrar için hem de plazma için 10 adet blank (sadece IS içeren boş biyolojik numuneler) hazırlandı.

Plazma Blank Hazırlanışı

300 µL idrar örneğine 250 ppb IS MIX ara stok solusyonundan 50 µL eklendi (25 ppb IS için). Sonrasında 3.4.2. bölümündeki anlatılan örnek hazırlama basamağına göre ekstraksiyon işlemi yapıldı ve 3.4.3. bölümündeki geliştirilen parametrelere göre LC-MS/MS’de analiz edildi.

İdrar Blank Hazırlanışı

500 µL idrar örneğine 250 ppb IS MIX ara stok solusyonundan 50 µL eklendi (25 ppb IS için). Sonrasında 3.4.2. bölümündeki anlatılan örnek hazırlama basamağına göre ekstraksiyon işlemi yapıldı ve 3.4.3. bölümündeki geliştirilen parametrelere göre LC-MS/MS’de analiz edildi.

Blank numunelerden elde edilen VRC konsantrasyonun ortalaması ve standart sapması hesaplanarak aşağıdaki formülde yerine koyuldu.

$$\text{Standart sapma } (\sigma) = \sqrt{\sum |x - \bar{x}|^2 / n - 1}$$

x : veri kümesinde bir değer

$\bar{x}$: aritmetik ortalama

n : veri noktası sayısı

$$\text{RSD} = \sigma / \bar{x} \quad \% \text{ RSD} = \sigma / \bar{x} * 100$$

σ : standart sapma

$\bar{x}$: aritmetik ortalama

LOD ve LOQ hesaplamaları aşağıda gösterilen formül ile yapıldı.

$$\text{LOD} = \text{Ortalama blank konsantrasyonu} + (3 * \sigma)$$

$$\text{LOQ} = \text{Ortalama blank konsantrasyonu} + (10 * \sigma)$$

3.4.4.3. Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma Aralığı (Range)

Tablo VII’de verilen hesaplama göre hazırlanan 9 farklı konsantrasyonlarda (0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 ppb) Varenicline standart çözeltilerin her konsantrasyon için 3 tekrarlı olacak şekilde ölçüm yapıldı ($p=3$). LC-MS/MS sistemi üzerinde IS kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisine göre doğrusal aralık belirlendi. Doğrunun denklemi ve korelasyon katsayısı (R^2) hesaplandı. Korelasyon katsayısı için kabul kriteri $\geq 0,99$ olarak tespit edildi.

3.4.4.4. Doğruluk (Accuracy)

Madde 3.4.3.’de geliştirilen yöntemin doğruluğu; gün içi-günler arası tekrarlanabilirlik ve geri kazanım çalışma ile sağlandı.



Şekil 16: Geri kazanım çalışması için kullanılan kan örnekleri

Geri kazanım çalışması için kalibrasyon çözeltilerinden her kalibrasyon noktalarından düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyon noktası seçildi (2, 10, 50 ppb). Biyolojik örnekler (plazma ve idrar) her kalibrasyon noktası 6 tekrarlı olacak şekilde hazırlandı. Hem plazma hem idrar için nihai hacim 500 μ L olacak şekilde spikelerin IS ve Varenicline konsantrasyonları Tablo XI’de gösterildi. Daha sonra her bir numune 3.4.2. bölümündeki örnek hazırlama prosedürlerine göre ekstraksiyon yaparak LC-MS/MS cihazına verilip analiz edildi. Çıkan sonuçlara göre hesaplandı.

Tablo XI. Geri kazanım çalışması için belirtilen çözeltilerden alınan miktarlar

Geri Kazanım Konsantrasyonu	Plazma			İdrar		
	IS (µl) (250 ppb Ara Stok Solusyonundan)	VRC (µl)	Alınan VRC Ara Stok Solusyon	IS (µl) (250 ppb Ara Stok Solusyonundan)	VRC (µl)	Alınan VRC Ara Stok Solusyon
2 ppb (n=6)	50	10	100 ppb VRC ara stok çözeltiden alındı	50	10	100 ppb VRC ara stok çözeltiden alındı
10 ppb (n=6)	50	5	1 ppm VRC ara stok	50	5	1 ppm VRC ara stok
50 ppb (n=6)	50	25	çözeltiden alındı	50	25	çözeltiden alındı

Geri kazanım çalışması için 3 ayrı konsantrasyonda hazırlanan 6 tekrarlı çözeltilerin analizlerinden elde edilen miktarlar hesaplanarak, bu sonuçların standart sapması (σ) ve bağıl standart sapması (RSD) aşağıdaki formüller kullanılarak tekrarlanabilirlik çalışmasında kullanılmak üzere hesaplandı. Kabul edilebilir değerler standart sapma için <15 , bağıl standart sapma yüzdesi için <20 olarak belirlendi.

$$\text{Standart sapma } (\sigma) = \sqrt{\sum |x - \bar{x}|^2 / n - 1}$$

Σ : toplam

x : veri kümesinde bir değer

$\bar{x}$: aritmetik ortalama

n: veri noktası sayısı

$$RSD = \sigma / \bar{x} \quad \% RSD = \sigma / \bar{x} * 100$$

σ : standart sapma

$\bar{x}$: aritmetik ortalama

3.4.5. Hasta Örneklerin Analizi

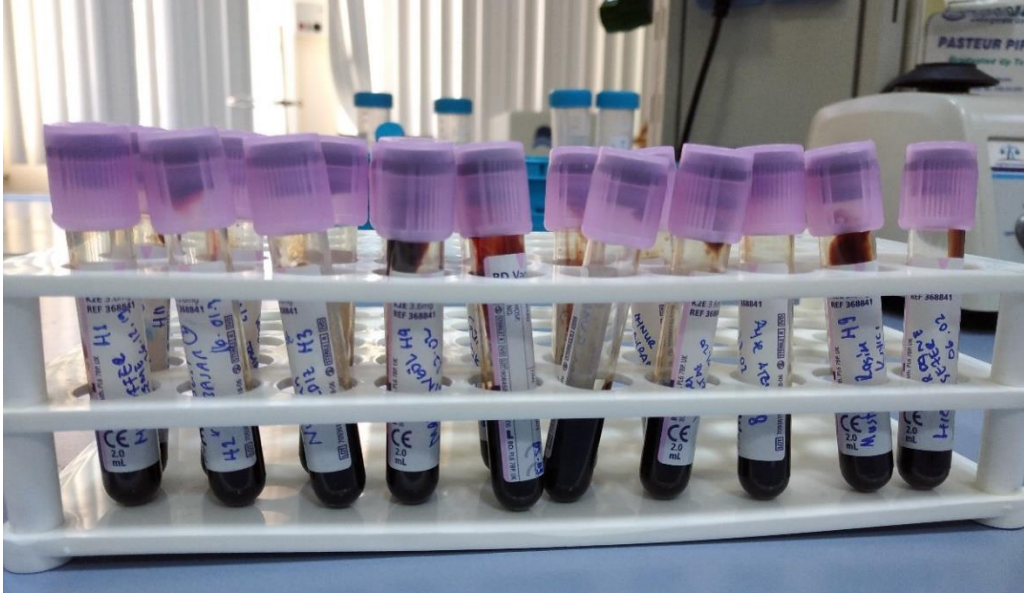
Hasta Plazma Örneklerin Analizi

Hastalardan toplanan 16 kan örnekleri buzdolabından çıkartıp oda sıcaklığına getirildi. H1-H16 olarak etiketlendi. Oda sıcaklığına geldiğinde santrifüj cihazına dizip 5000 rpm hızla 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra şeffaf sarısı renkli olan üstte kalan kısmını (plazma) 15 mL'lik falkon tüpe toplandı.

Her hasta plazmasından 15 mL'lik falkon tüplere 300 µL plazma konuldu. Ardından 500 µL asetronitril ve 500 µL dH₂O konuldu ve vortekslenildi. Sonra 5000 RPM hızla 3 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı kısmının tamamını başka bir tüpe aktarılır. 150 µL 1 M NaOH eklenerek pH 11'e getirildi (pH kağıdıyla kontrol edildi). Her birine 50 µL IS (25 ppb) 250 ppb ara stok solusyonundan eklendi.

Bir sonraki basamak Sıvı Faz Ekstraksiyondur. 2 mL dietil eter eklenip 3 dakika vortekslenip, daha sonra 3 dakika 5000 rpm hızla santrifüj edilerek üst fazı alındı. Bu ekstraksiyon basamağı 2 kere yapıldı. Daha sonra toplanan üst fazları azot uçurmaya bırakıldı. Numuneler tamamen uçurduktan sonra 500 µL mobil faz A+B (1:1) ile çözünüp 1 dakika vortekslenip viallere konuldu.

Numuneler geliştirilen yöntem programıyla LC-MS/MS'e verildi. Numuneler mobil faz ile çözüldükten sonra büyük partikülleri mevcut ise LC-MS/MS'e verilmeden önce şiringa yardımı ile filtreden geçirilip, insert viallere konuldu.



Şekil 17: Hasta kan örnekleri (n=16)

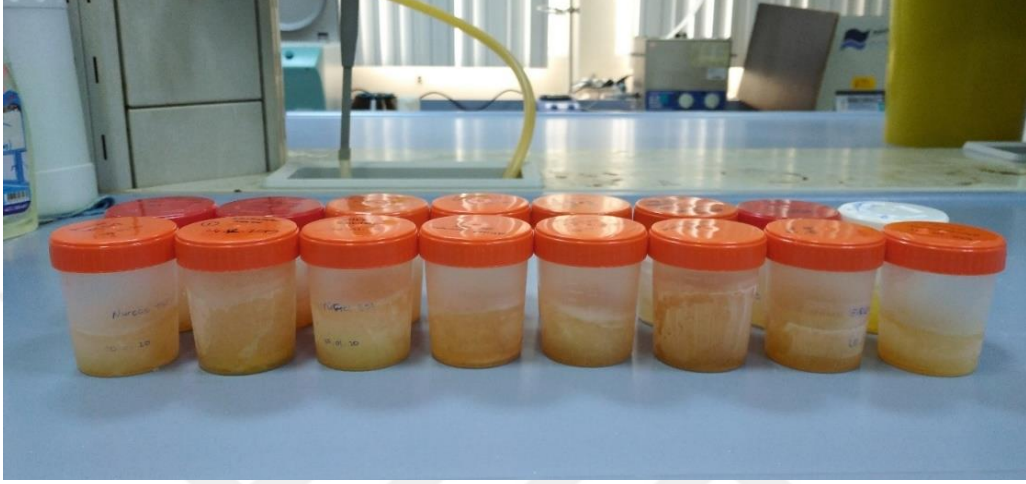
Hasta İdrar Örneklerin Analizi

Hastalardan toplanan 16 idrar örnekleri buzdolabından çıkartıp oda sıcaklığına getirildi. H1-H16 olarak etiketlendi. Oda sıcaklığına geldiğinde her hasta idrarından 15 mL'lik falkon tüplere 500 μ L idrar konuldu. Her birine 50 μ L IS (25 ppb) 250 ppb ara stok solusyonundan eklendi. 400 μ L 1 M NaOH eklenerek pH 11'e getirildi (pH kağıdıyla kontrol edildi). Ardından sıcak su banyosunda 40°C 15 dakika bekletildi (bazik hidrolizasyon). Sonrasında oda sıcaklığında bırakıldı.

Bir sonraki basamak Sıvı Faz Ekstraksiyondur. 2 mL dietil eter eklenip 3 dakika vortekslenip, daha sonra 3 dakika 5000 rpm hızla santrifüj edilerek üst fazı alındı. Bu ekstraksiyon basamağı 2 kere yapıldı. Daha sonra toplanan üst fazları azot uçurmaya bırakıldı. Numuneler tamamen uçurduktan sonra 500 μ L mobil faz A+B (1:1) ile çözünüp 1 dakika vortekslenip viallere konuldu.

Numuneler geliştirilen yöntem programıyla LC-MS/MS'e verildi. Numuneler mobil faz ile çözündükten sonra büyük partikülleri mevcut ise LC-MS/MS'e verilmeden önce

şiringa yardımı ile filtreden geçirilip, insert viallere konuldu. Hasta idrar örneklerindeki VRC miktarı çok yüksek çıktığı için (ppm üzerinde) ve metodumuzun analiz edilebilecek maksimum sınırı 100 ppb'e kadar olduğundan dolayı her hasta idrarlarından 15 µL alınıp 450 µL su eklenerek 300 kere seyrelttik.



Şekil 18: Hasta idrar örnekleri (n=16)

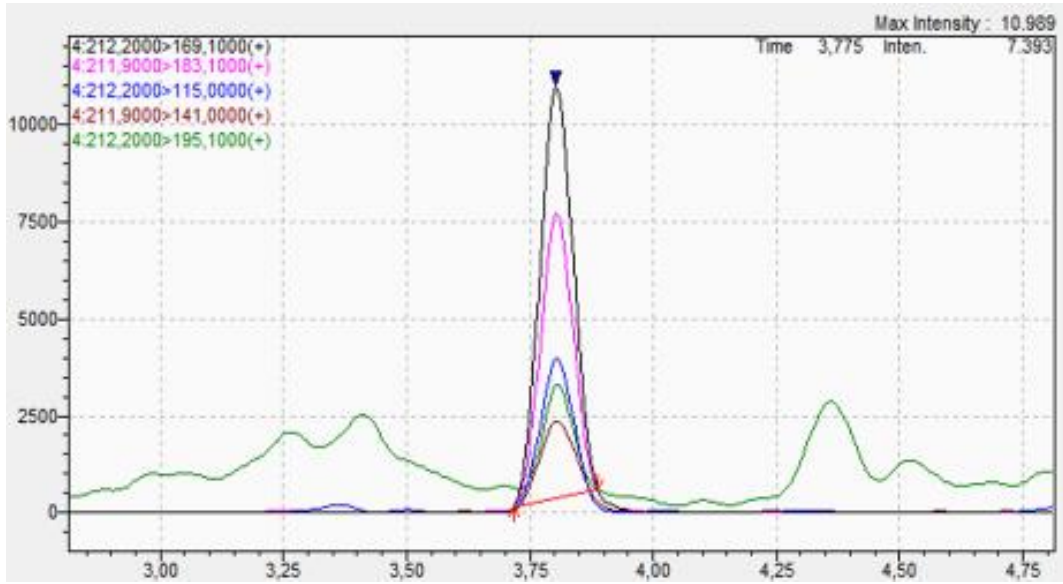
4. BULGULAR

Bu tez çalışması kapsamında VRC için geliştirilen bu yönteme ait parametrelere göre 1 ppb standart çözelti ile yapılan çalışmada (n=6) VRC ve Diazepam-d5 (IS) için belirlenen alıkonma zamanları (rt) ile başlıca m/z oranları ve parçalanma iyonları Tablo XII'deki gibidir. VRC için ortalama alıkonma zamanı $3,243 \pm 0,005$ dk. iken, Diazepam-d5 için $8,439 \pm 0,005$ dk. bulundu.

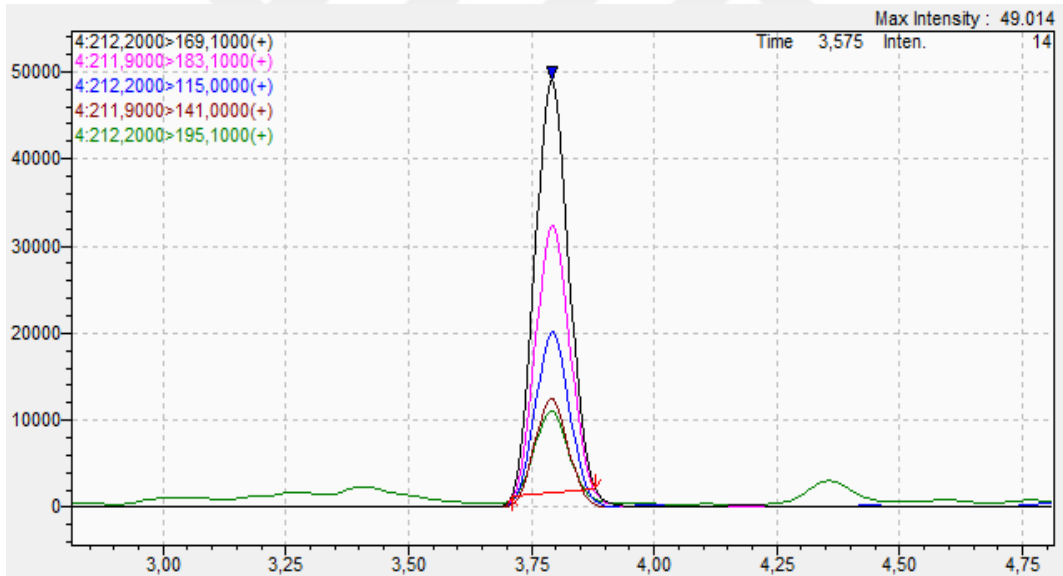
Tablo XII. Maddelerin alıkonma zamanları (dk.) ve MS spektrumundaki başlıca iyonları (m/z) (1 ppb)

Analiz Sayısı	VRC (dk.)	Diazepam-d5 (dk.)
1. tekrar	3.804	8,443
2. tekrar	3.808	8,445
3. tekrar	3,798	8,434
4. tekrar	3,799	8,437
5. tekrar	3,808	8,442
6. tekrar	3,800	8,434
Ortalama rt	3,803	8,439
Standart Sapma	0,0045	0,0048
%RSD	0,0012	0,0006
İyonları (m/z)		
Ana iyonları	212	290.1
Parçalanma iyonları	195, 183, 169	154.5, 227.1, 198.1

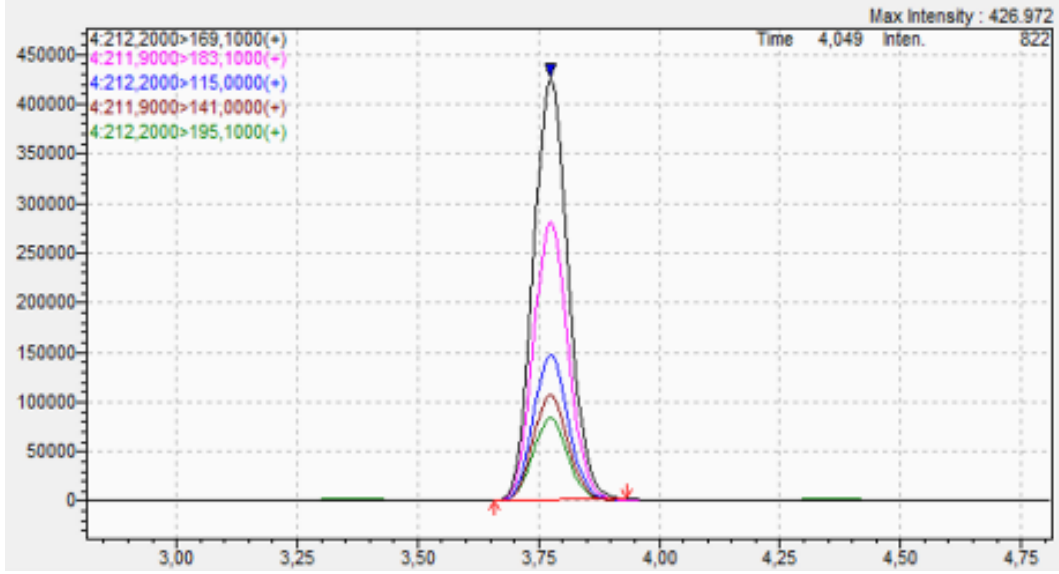
1, 5 ve 50 ppb konsantrasyondaki çözeltilerin analizinden elde edilen kromatogramlar ve kütle spektrumları Şekil 17-19'de gösterilmektedir.



Şekil 19: MeOH içinde 1 ppb VRC çözeltisine ait LC kromatogramı



Şekil 20: MeOH içinde 5 ppb VRC çözeltisine ait LC kromatogramı

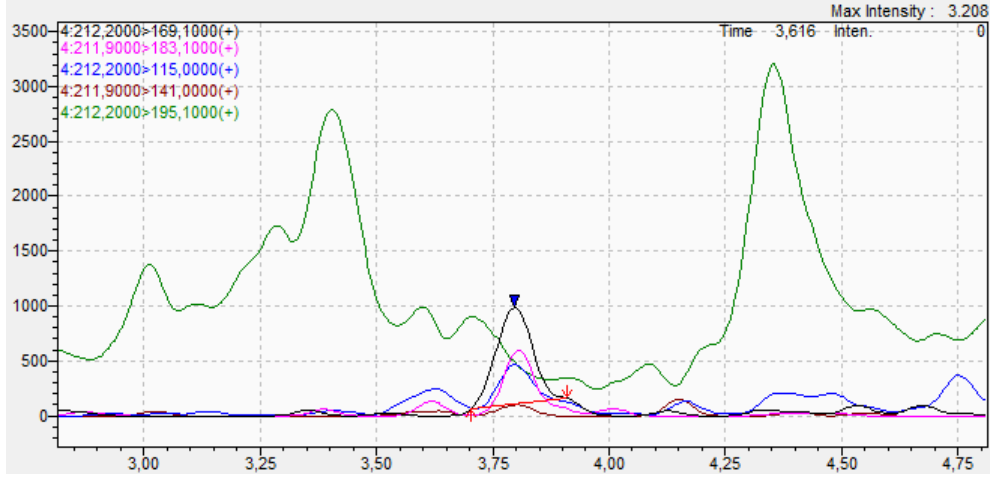


Şekil 21: MeOH içinde 50 ppb VRC çözeltisinin LC kromatogramı

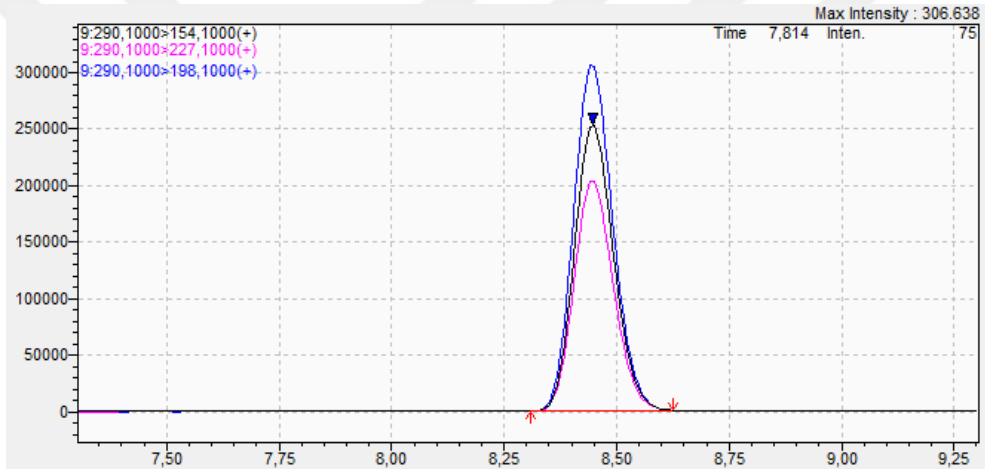
4.1. Validasyon İşlemleri

4.1.1. Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specificity)

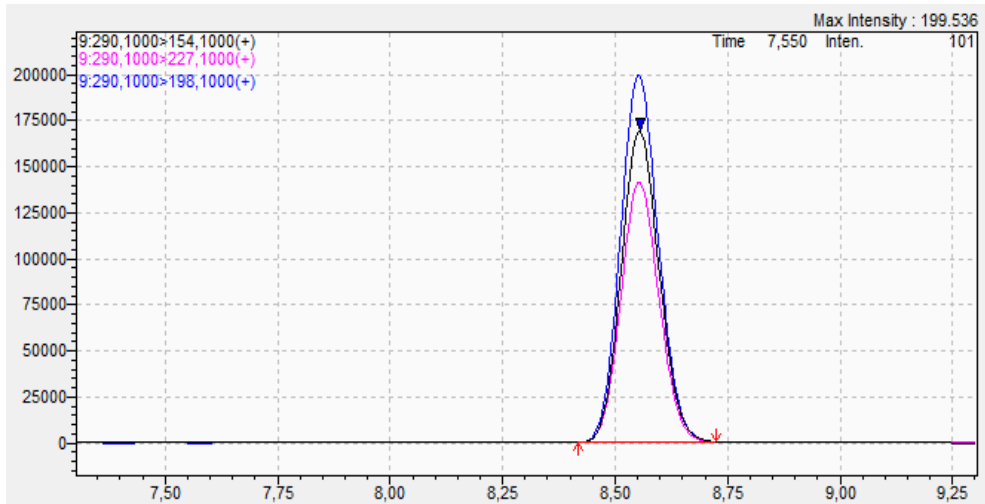
Yapılan seçicilik çalışmalarında VRC ve Diazepam-D5 (IS) için belirlenen alıkonma zamanlarında (rt) herhangi bir girişim gözlenmemiş olup, sadece MeOH içeren kromatogram Şekil 22’de sadece IS içeren MeOH kromatogramı Şekil 23’de; sadece spike edilen IS içeren blank idrara ve blank plazmaya ait kromatogramlar Şekil 24 ve Şekil 25’daki gibidir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, organik çözücü veya plazma ve idrar örneklerinin matriksine ilişkin herhangi bir girişim olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca tüm kantitatif basamaklar blanke ilişkin değer çıkarıldıktan sonra hesaplanmıştır.



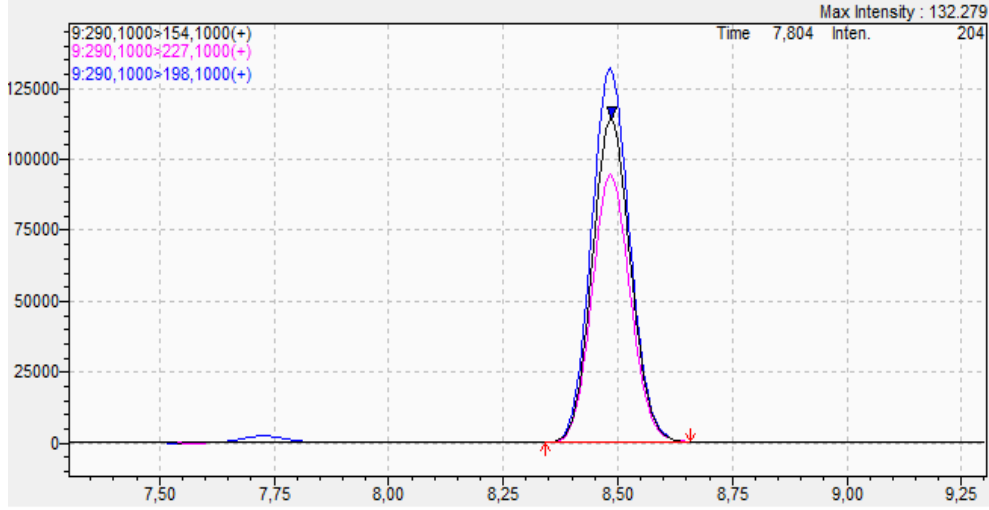
Şekil 22: Sadece MeOH çözeltisine ait LC kromatogramı



Şekil 23: MeOH içinde 25 ppb Diazepam-d5 (dk.) (IS) çözeltisine ait LC kromatogramı



Şekil 24: Blank plazma içinde 25 ppb Diazepam-d5 (dk.) (IS) çözeltisinin LC kromatogramı



Şekil 25: Blank idrar içinde 25 ppb Diazepam-d5 (dk.) (IS) çözeltisine LC kromatogramı

4.1.2. Tespit Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ) Hesaplamaları

LOD ve LOQ çalışması için hazırlanan 10 adet VRC-free plazma (Tablo XIII) ve 10 adet VRC-free idrar örnekleri (Tablo XIV) ile yapılan analizden elde edilen ortalama, standart sapma ve %RSD değerleri gösterildiği gibidir.

Tablo XIII. 10 adet VRC-free plazma örneğinin bulunan miktarı (ppb), standart sapma ve %RSD değerleri

VRC-free Plazma Analizi (n=10)	Bulunan Miktar (ppb)
1. tekrar	0,295
2. tekrar	0,311
3. tekrar	0,333
4. tekrar	0,305
5. tekrar	0,332
6. tekrar	0,326
7. tekrar	0,318
8. tekrar	0,338
9. tekrar	0,304
10. tekrar	0,311
Ortalama	0,317
Standart Sapma	0,0144
%RSD	4,54

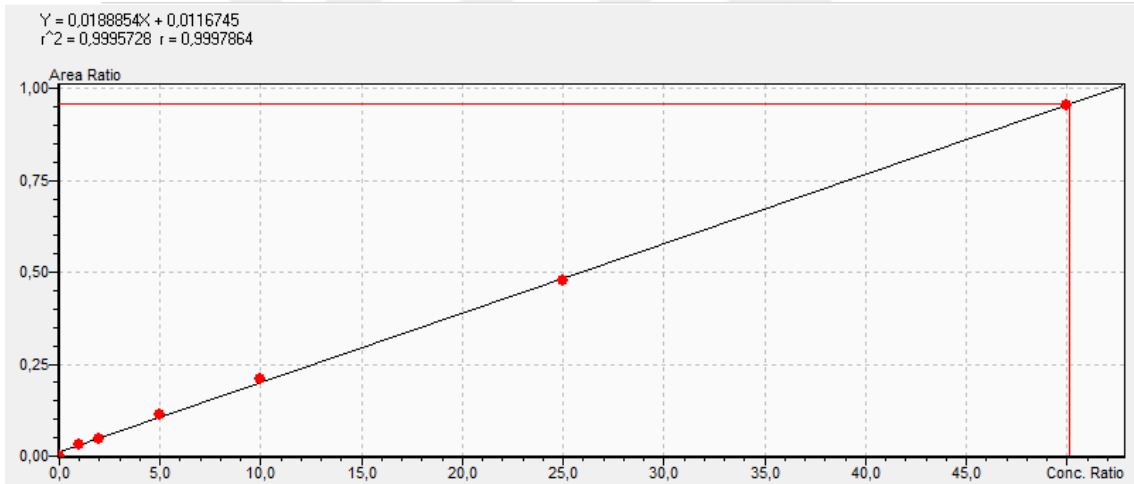
Tablo XIV. 10 adet VRC-free idrar örneğinin bulunan miktarı (ppb), standart sapma ve %RSD değerleri

VRC-free İdrar Analizi (n=10)	Bulunan Miktar (ppb)
1. tekrar	0,197
2. tekrar	0,19
3. tekrar	0,15
4. tekrar	0,249
5. tekrar	0,183
6. tekrar	0,193
7. tekrar	0,225
8. tekrar	0,154
9. tekrar	0,21
10. tekrar	0,166
Ortalama	0,192
Standart sapma	0,031
%RSD	16,15

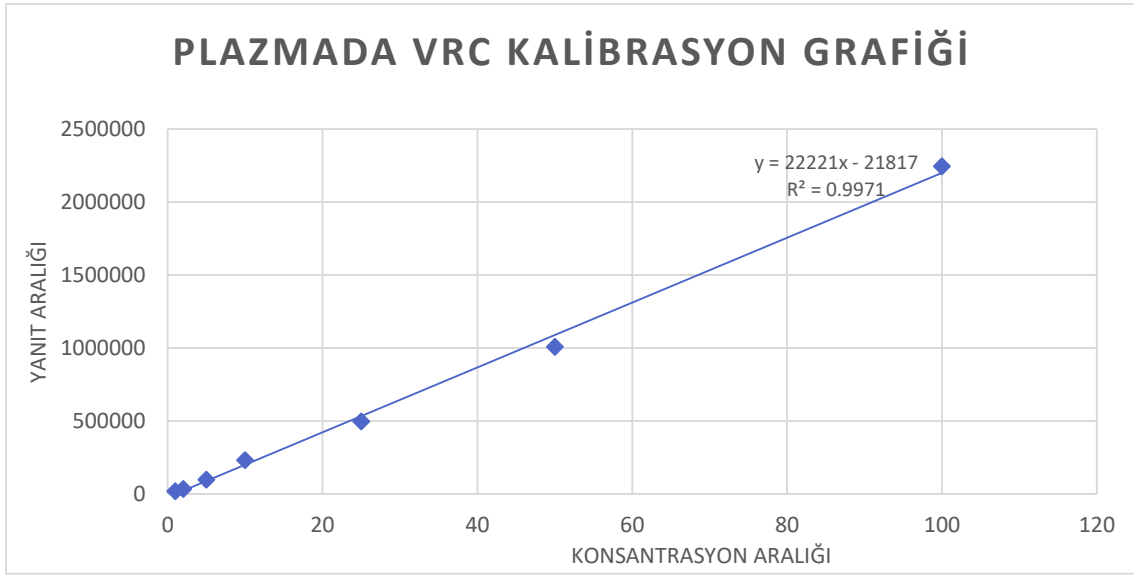
LOD ve LOQ hesaplamaları Gereç ve Yöntemler bölümünde 3.4.4.2’de belirtilen formüller ile yapıldı. VRC için plazmada LOD 0.36 ppb, LOQ 0.46 ppb ve idrarda LOD 0.29 ppb, LOQ 0.50 ppb bulundu.

4.1.3. Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma Aralığı (Range)

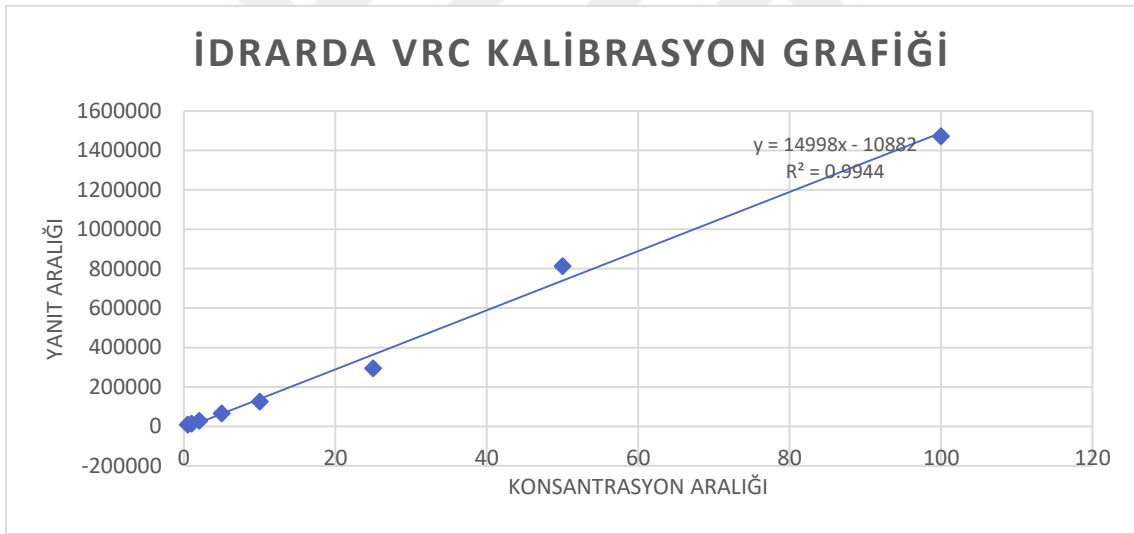
Varenicline için metanol içinde referans standart maddenin kalibrasyon aralığı 0,2-100 ppb, plazma örneği içinde bu değer 1-100 ppb ve idrar örneği içinde 0.5-100 ppb arasındadır. Bu aralıktaki plazma korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9971$ ve idrar korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9944$ olarak hesaplandı. Verilere ait şekiller kalibrasyon eğrisi için Şekil 26’da, plazma için Şekil 27’da, idrar için Şekil 28’de verilmektedir.



Şekil 26: 0,2-100 ppb aralığında VRC için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi (9 noktalı)



Şekil 27: 1-100 ppb aralığında VRC'nin plazma spike örneklerinden elde edilmiş kalibrasyon eğrisi (7 noktalı)



Şekil 28: 0,5-100 ppb aralığında VRC'nin idrar spike örneklerinden elde edilmiş kalibrasyon eğrisi (8 noktalı)

Bölüm 3.4.4.3'te belirtildiği gibi analitin konsantrasyonundaki değişikliklere karşı cihazın ölçüm sinyalinde meydana gelen değişiklikler belirlendi ve söz konusu kalibrasyon noktaları, kalibrasyon denklemi ve korelasyon katsayısı belirlenmiştir (Tablo XV).

Tablo XV. MeOH içinde 0,2-100 ppb aralığında çizilmiş olan kalibrasyon eğrisinin denklemi ve korelasyon katsayısı (≥ 0.9996). İdrar içinde 0,5-100 ppb ve plazma içinde 1-100 ppb aralığında çizilmiş olan kalibrasyon eğrisinin denklemi ve korelasyon katsayıları (R^2 idrar ve plazma sırasıyla 0,9944 ve 0.9971)

MeOH içinde VCR	
Doğrusal Aralık	0,2-100 ppb
Denklem	$y = 0,0188854x - 0,0116745$
Korelasyon Katsayısı (R^2)	0,9996
Plazma içinde VCR	
Doğrusal Aralık	1-100 ppb
Denklem	$y = 22221x - 21817$
Korelasyon Katsayısı (R^2)	0,9971
İdrar içinde VCR	
Doğrusal Aralık	0,5-100 ppb
Denklem	$y = 14998x - 10882$
Korelasyon Katsayısı (R^2)	0,9944

4.1.4. Doğruluk (Accuracy)

Plazma örneklerinde geri kazanım hesaplamaları yapmak için kalibrasyon çözeltilerinden düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı konsantrasyon noktası seçildi (2, 10, 50 ppb). Örneklere ait % Geri kazanım verileri Tablo XVI-XVIII’de gösterildiği gibidir. Plazma verilerine göre tekrarlanabilirlik çalışması 3 ayrı konsantrasyon için 6 tekrarlı olacak şekilde analizler gerçekleştirildi ve dolayısıyla ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri Tablo XIX’de belirtilmektedir.

Tablo XVI. 2 ppb VRC içeren plazma örneğinin geri kazanım tablosu

2 ppb'lik Numune (n=6)	Teorik Miktar (ppb)	Ölçülen Sonuç (ppb)	% GK
1. tekrar	2	2,208	110,4
2. tekrar	2	2,099	104,95
3. tekrar	2	2,453	122,65
4. tekrar	2	2,322	116,10
5. tekrar	2	2,129	106,45
6. tekrar	2	2,267	113,35
Ortalama %GK			112,31
Standart Sapma			6,55
%RSD			5,83

Tablo XVII. 10 ppb VRC içeren plazma örneğinin geri kazanım tablosu

10 ppb'lik Numune (n=6)	Teorik Miktar (ppb)	Ölçülen Sonuç (ppb)	% GK
1. tekrar	10	13,38	133,80
2. tekrar	10	12,38	123,80
3. tekrar	10	13,76	137,60
4. tekrar	10	12,27	122,70
5. tekrar	10	12,93	129,30
6. tekrar	10	13,09	130,90
Ortalama %GK			129,68
Standart Sapma			5,73
%RSD			4,42

Tablo XVIII. 50 ppb VRC içeren plazma örneğin geri kazanım tablosu

50 ppb'lik Numune (n=6)	Teorik Miktar (ppb)	Ölçülen Sonuç (ppb)	% GK
1. tekrar	50	54,44	108,88
2. tekrar	50	59,54	119,08
3. tekrar	50	49,81	99,62
4. tekrar	50	57,88	115,76
5. tekrar	50	58,35	116,70
6. tekrar	50	54,94	109,88
Ortalama %GK			111,65
Standart Sapma			7,12
%RSD			6,38

Tablo XIX. Plazma verilerine göre tekrarlanabilirlik çalışması sonuç tablosu

Numune (ppb)	Ortalama Sonuç	Standart Sapma	%RSD
2 ppb (n=6)	2,25	6,55	5,83
10 ppb (n=6)	12,97	5,73	4,42
50 ppb (n=6)	55,83	7,12	6,38

İdrar örneklerinde geri kazanım hesaplamaları yapmak için kalibrasyon çözeltilerinden de düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı konsantrasyon noktası seçildi (2, 10, 50 ppb). Örneklere ait % Geri kazanım verileri Tablo XX-XXII’de gösterildiği gibidir. İdrar verilerine göre tekrarlanabilirlik çalışması 3 ayrı konsantrasyon için 6 tekrarlı olacak şekilde analizler gerçekleştirildi ve dolayısıyla ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri Tablo XXIII’de belirtilmektedir.

Tablo XX. 2 ppb VRC içeren idrar örneğinin geri kazanım tablosu

2 ppb'lik Numune (n=6)	Teorik Miktar (ppb)	Ölçülen Sonuç (ppb)	% GK
1. tekrar	2	2,328	116,40
2. tekrar	2	2,076	103,80
3. tekrar	2	2,430	121,50
4. tekrar	2	2,346	117,30
5. tekrar	2	2,222	111,10
6. tekrar	2	2,473	123,65
Ortalama %GK			115,63
Standart Sapma			7,25
%RSD			6,27

Tablo XXI. 10 ppb VRC içeren idrar örneğinin geri kazanım tablosu

10 ppb'lik Numune (n=6)	Teorik Miktar (ppb)	Ölçülen Sonuç (ppb)	% GK
1. tekrar	10	11,394	113,94
2. tekrar	10	10,784	107,84
3. tekrar	10	10,821	108,21
4. tekrar	10	10,508	105,08
5. tekrar	10	10,558	105,58
6. tekrar	10	10,323	103,23
Ortalama %GK			107,31
Standart Sapma			3,73
%RSD			3,48

Tablo XXII. 50 ppb VRC içeren idrar örneğın geri kazanım tablosu

50 ppb'lik Numune (n=6)	Teorik Miktar (ppb)	Ölçülen Sonuç (ppb)	% GK
1. tekrar	50	58,672	117,34
2. tekrar	50	56,610	113,22
3. tekrar	50	57,158	114,32
4. tekrar	50	56,904	113,81
5. tekrar	50	55,112	110,22
6. tekrar	50	56,32	112,64
Ortalama %GK			113,59
Standart Sapma			2,33
%RSD			2,05

Tablo XXIII. İdrar verilerine göre tekrarlanabilirlik çalışması sonuç tablosu

Numune (ppb)	Ortalama Sonuç	Standart Sapma	%RSD
2 ppb (n=6)	2,31	7,25	6,27
10 ppb (n=6)	10,73	3,73	3,48
50 ppb (n=6)	56,80	2,32	2,05

4.2. Hasta Örneklerin Sonuçları

4.2.1. Hasta Plazma Örneklerin Sonuçları

Çalışmamızda plazma örneği için geliştirilen bu LC-MS/MS metodunun yukarıda belirtilen plazma ortalama geri kazanım oranı göz önüne alınarak 16 hasta plazma örneklerinde belirlenen Varenicline miktarı Tablo XXIV’de gösterilmiştir.

Tablo XXIV. Hasta plazma sonuçları

Hasta No	VRC Miktarı (ppb)
1	55.6±7.12
2	43.9±7.12
3	46.7±7.12
4	≤LOQ
5	60.1±7.12
6	≤LOQ
7	40.7±7.12
8	51.4±7.12
9	19.1±5.73
10	15.7±5.73
11	26.4±5.73
12	≤LOQ
13	15.5±5.73
14	29.7±5.73
15	28.5±5.73
16	44.8±7.12

4.2.2. Hasta İdrar Örneklerin Sonuçları

Çalışmamızda idrar örneği için geliştirilen bu LC-MS/MS metodunun yukarıda belirtilen idrar ortalama geri kazanım oranı göz önüne alınarak 16 hasta idrar örneklerinde belirlenen Varenicline miktarı Tablo XXV’de gösterilmektedir.

Tablo XXV. Hasta idrar sonuçları

Hasta No	VRC Miktarı (ppb)
1	2.80±7.25
2	0.70±7.25
3	1.40±7.25
4	≤LOQ
5	1.03±7.25
6	≤LOQ
7	1.21±7.25
8	1.55±7.25
9	1.98±7.25
10	1.63±7.25
11	1.35±7.25
12	≤LOQ
13	0.73 ±7.25
14	2.27±7.25
15	1.60±7.25
16	3.22±7.25

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tütün kullanımı, her sene 8 milyondan fazla insanın hayatını etkilediği bildirilmiş (68), ve Dünya'daki mortalitelerin önde gelen sebeplerinden biri olmuştur. Sigara içen kişiler arasında, yardım almadan sigara bırakma deneyimini sadece %4'lük bir kısım başaramıştır (69). Bu sebeple, başarı oranını arttırmada sigara bağımlılığı tedavisi için geliştirilen yardımcı tedaviler gündeme gelmiştir; bunlar arasında farmakoterapik yöntemler (NRT, Bupropion, VRC gibi) başlıcalarıdır (70).

Dünyada en yaygın kullanılan ve en etkili farmakoterapik ajanlardan biri de Varenicline'dir. Varenicline (Chantix®/Champix®), Cytisine bileşiğinden ilham alarak *Cytisus Laburnum L.* bitkisinden sigara bıraktırma tedavisi amacıyla türetilen bir ilaçtır (11,12). Bir $\alpha 4\beta 2$ reseptörlerin kısmi agonisti olarak beyindeki nAChR nikotinik reseptörlere bağlanarak dopamin salgılar ve yoksunluk semptomlarını hafifletmeye yardımcı olur (10,11). Diğer farmakoterapiler (Bupropion ve NRT)'den daha yüksek bir bırakma başarı oranına sahiptir (10,13,26,27). Fakat, piyasaya çıkış sonrasında yapılan gözetimler sonucu Varenicline kullanımının intihar riskini arttırdığı bildirilmektedir (4,5,32). Bu bulgular, adli bilimler açısından önemlidir.

Kintz ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, birkaç aydır Varenicline ile sigara bırakma programına dahil olan bir kişinin intihar etmesi üzerine adli toksikolojik incelemeler gerçekleştirilmiş ve kişide 10 ng/ml'lik bir kardiyak kan konsantrasyonunu doğrulanmıştır (23).

Diğer taraftan ABD'nin Advers Olaylar Raporlama Sistemi (AERS) 1998-2010 yıllarını kapsayan verilerinden alınan 3.249 intihar ve depresyon olguları incelenmiş; 2.925 (%90)'ı Varenicline, 229 (%7)'si Bupropion ve 95 (%3)'ü nikotin replasman tedavisinden kaynaklandığı raporlanmıştır (5).

Avustralya’da da TGA tarafından bildirilen bir raporda, 2010 yılına kadar Champix kullanımından kaynaklı 206 intihar girişimi olduğu kaydedilmiştir (7).

2006’da FDA ve EMEA tarafından onaylanan Chantix®/Champix® ilacına, 2009’dan sonra “Siyah Kutu Uyarısı” (ciddi yan etkileri oluşturabilecek en sert uyarı) verildiği görülmüştür (33). Pfizer ve GlaxoSmithKline (Chantix® ve Zyban® üreten firma) sponsorluğunda yapılan bir EAGLE araştırmasında Varenicline’in nöropsikiyatrik yan etki riskini arttırmadığı ve diğer farmakoteraplere göre daha etkili olduğunun belirlendiğini bildirerek (35), 2016’da FDA tarafından onaylanan “siyah kutu uyarısını” kaldırmıştır (36).

Siyah kutusu uyarısı kaldırılması ile birlikte hala psikiyatrik riskleri taşıdığı (38), hatta davranış değişiklikleri ve intihar eğilimi gibi yan etkileri olabileceği uyarıları ilacın kullanım kılavuzunda yer aldığı görülmektedir (39). Ayrıca, yapılan araştırmalar, Varenicline’in ruhsal bir hastalığı olan kişilerce kullanıldığında, psikiyatrik rahatsızlıkları şiddetlendirdiği ve intihara eğilimini arttırdığı bildirilmiştir (28–31). Dolayısıyla, tamamlanmış intihar veya intihar girişimi olgularında Varenicline kullanımının sorgulanması, bir ruhsal rahatsızlığın varlığı ile birlikte hastanın biyolojik örneğinde Varenicline analizinin önemini daha da arttırmaktadır.

Literatürde Varenicline için belirlenmiş sıvı kromatografi ile analizini konu alan pek çok çalışmanın olduğu görülse de bunların daha çok farmasötik çalışmalar olduğu, dozaj şeklindeki saflığını tespit etmeye yönelik gerçekleştirildiği görülmektedir.

Bizim çalışmamıza en yakın çalışma Obach ve ark. ve Faesel ve ark. gerçekleştirdiği olup (18–20), bu tür olguların biyolojik örneklerinden Varenicline analizine dayalı adli toksikolojik yaklaşımın getirilmesi için Sigara Bağımlılığı Tedavisi Merkezleri ile koordineli bir şekilde çalışmamızın ana hatları oluşturulmuştur.

Böylelikle çalışmamızda kan ve idrar gibi sıklıkla kullanılan biyolojik örneklerde Varenicline'in belirlenmesi için LC-MS/MS sistemi kullanılarak hızlı, özgün, kolay, düşük tayin limitli, tekrar edilebilirliği ve geri kazanımı yüksek bir yöntem geliştirilmiş ve yöntemin geçerli kılınma parametreleri çalışılmıştır.

Analitik yöntem geliştirilmesi için literatür taraması yapılmış; LC-MS/MS'te Varenicline tespit ve tayini için uygun sıvı kromatografi analitik kolonu, mobil fazı, mobil faz akış programı, uygun kolon sıcaklığı, parçalanma molekülleri ve enerjilerine dair elde edilen bilgiler laboratuvarında uygulanarak bir LC-MS/MS yöntemi optimize edilmiştir. Akış zamanı ve mobil faz oranları değiştirilerek analiz süresini kısa tutmaya, kesin ve net ayrımla Varenicline piki elde edilmeye çalışılmıştır. Varenicline için alıkonma zamanı tespit edilmiş ve yöntem akış programı ayarlandıktan sonra yöntemin geçerli kılınma parametrelerinin çalışılmasına geçilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda örnek enjeksiyonundan kaynaklı hataları bertaraf etmek, koşullarındaki değişiklikleri standardize etmek ve kesin tekrarlanabilirliği yüksek sonuçları elde etmek için IS olarak 25 ng/mL konsantrasyonunda Diazepam-d5 maddesi kullanılmıştır.

Seçicilik parametresi için, içerisinde VRC olmayan çözücü (metanol), sadece IS içeren metanol, blank idrar ve blank plazma çözeltileri analiz edilmiş; çözücünden kaynaklı herhangi bir girişim olmadığı gözlemlenmiştir. Belirli konsantrasyonlarda VRC standart çözeltisinin LC-MS/MS'te analizi yapılarak VRC'nin pik alanlarının da bu oranda doğrusal olarak arttığı görülmüştür. Oluşturulan bu yöntemin, VRC tespit ve tayininde özgül ve hassas olduğuna karar verilmiştir.

Kör (blank) örnekler üzerinden LOD ve LOQ tespit edilmesi yönteminden yola çıkarak VRC-free hazırlanan VRC standart çözeltisinin standart sapması plazma için 0,0144, idrar için 0,0310 bulunmuştur. Bölüm 3.4.4.2'de verilen formül üzerinden yürütülen

hesaplamalarla plazma için (LOD 0.36 ng/mL, LOQ 0.46 ng/mL), idrar için (LOD 0.29 ng/mL, LOQ 0.50 ng/mL) bulunmuştur.

Doğrusallık parametresi için elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı (R^2) plazma için 0.9971, idrar için 0.9944 bulunmuştur. Çalışmada doğrusal aralıkları ise plazma için 1-100 ng/mL, idrar için 0.5-100 ng/mL'dir.

Doğruluk çalışmaları; tekrarlanabilirlik ve geri kazanım ile yapılmıştır. Farklı bir laboratuvar kullanılmadığından tekrar üretirlik çalışmaları yapılamamıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmaları 2-10-50 ng/mL olmak üzere düşük, orta ve yüksek 3 farklı konsantrasyonda 6 tekrarlı ölçümle gerçekleştirilmiştir. Bu konsantrasyonlarda plazma için %RSD değerleri sırasıyla 5.83, 4.42, 6.38; idrar için ise %RSD değerleri sırasıyla 6.27, 3.48, 2.05 bulunmuş olup tüm değerler <20 olduğundan sonuçlar uygun kabul edilmiştir. Bu çalışmalar üzerinden yürütülen geri kazanım hesaplamalarında, geri kazanım değerleri plazma için %112-130, idrar için %107-116 arasında bulunmuştur.

Sigara bırakma tedavisi gören hastaların plazma ve idrarındaki VRC tayin ve tespiti için geliştirilen bu yöntemde, cihaz kirliliğini önlemek ve daha doğru sonuç almak için numunelerin ön işlemden geçmesi gerekmektedir. Uygun organik çözücü seçimi ile yapılan çekitleme işleminde, hasta örneklerin alternatifi olarak VRC-free (kör) plazma ve idrar kullanılmıştır. VRC standart çözeltisi ile zenginleştirilen biyolojik örneklerinin çekitleme sonrası ortalama geri kazanımı plazma için %117.88, idrar için %112.17 olarak bulunmuştur. Gerçek hasta örneklerinin VRC tayin ve tespiti bu geri kazanım oranını değerlendirilerek hesaplanmıştır.

Geliştirilen bu LC-MS/MS yöntemi ile 13 VRC tedavisi altında olan hastanın plazma örneklerinde, VRC miktarı 15.5-60.1 ng/mL arasında bulunmuştur. Hasta örneklerinde VRC miktarının yüksek bulunması nedeniyle 300 kat seyretilerek aynı yöntemle çalışılan 13 adet

idrar örneğinde VRC miktarı 0.7-3.22 ng/mL arasında bulunmuştur. 3 hastanın gerek plazmada gerekse idrar örneklerinde VRC tespit edilmemiştir. Bu durumun örneklerin uygun koşullarda toplanamadığı ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Varenicline farmakokinetiğinin detaylı şekilde aydınlatan bir çalışmaya göre maddenin $\geq 90\%$ 'ının metabolizmaya uğramadan, kendisi olarak idrar yoluyla atıldığı bildirilmektedir (8). Tek bir 3 mg'lık oral dozu takiben, 3-4 saat içinde maksimum Varenicline plazma konsantrasyonuna (C_{max}) ulaşıldığı ve 14.5 ng/mL tayin edildiği bildirilmektedir (19,71). Mevcut verilerden, Varenicline tedavisi alan hastalarda genellikle terapötik konsantrasyonların mililitre başına daha düşük (1-20 nanogram) doz aralığında olduğu çıkarılabilmektedir (8). Günde 3 mg'a kadar tekrarlayan günlük doz kullanımı ile ulaşılan Varenicline plazma konsantrasyonunun maksimum 28.3 ng/mL olduğu bildirmiştir (72). Farmakokinetik çalışmalar, günde iki kez 1 mg doz uygulamasının ardından, yaklaşık 7.7 ng/mL'lik bir ortalama kararlı durum plazma konsantrasyonuna ulaşıldığını da göstermiştir (72).

Biyolojik örneklerin çalışmasında en sık karşılanan problemlerden biri matriks etkisidir. Bu problem, iyi bir örnek hazırlama prosedürü tasarlamak ile ortadan kaldırılabilir (73). Bu çalışmada örnek hazırlama prosedürü olarak Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu (LLE) seçilmiştir. LLE'de uygun organik çözücü seçimi ve doğru bir pH ortamının sağlanması temiz bir numune hazırlamaya yardımcı olacağından, istenmeyen maddelerin kolon ve MS sistemine girmesini engellemiştir (74).

Ancak, kantitatif analizi için güçlü bir LLE yapmak matriks etkisinin ortadan kaldırmaya yetmeyebilir, dolayısıyla ortaya çıkabilecek matriks etkisinin en aza indirilmesi için MRM modu kullanmak da güçlü tercihlerden biridir (75). Bu yüzden çalışmamızda MRM modu da kullanmıştır.

Varenicline, doğalda bolca bulunan Leguminosae (Fabaceae) ailesinde dahil edilen yaklaşık 40 tür bitkilerde alkaloid olan Cytisine bileşiğinden ilham alarak üretilmiştir. Cytisine, 1865 yılında Hausemann ve Marme tarafından ilk izole edilmiştir. Erken dönemlerde Kolon Kromatografi ve İnce Tabaka Kromatografi (TLC) ile izole edilmiş olup endüstri amaçlı üretiminde daha çok İyon Değişim Kromatografi kullanılmıştır (76). İkinci Dünya Savaş'ı süresince nikotine benzer bir yapı olduğu için nikotin replasman olarak kullanılmış ve Tabex ticari adı altında 40 yıldır sigara bırakma tedavisi olarak kullanılmıştır (77). Daha sonra 1997 yılında Pfizer daha etkili bir sigara bırakma ilacı geliştirmek için Cytisine'in kimyasal yapısını biçimlendirerek Varenicline'i keşfedilmiştir.

İlaç endüstrisinde VRC dozaj formlarının analizi için UPLC (78,79), HPLC (80–84) ve LC-QTOF (85) kromatografik cihazlarda; ayrıca spektrofotometri (86) ve kapiller elektroforez (87–90) yöntemler ile de analiz edildiği görülmektedir.

Son dönem literatür verileri Varenicline'in klinik önemi dolayısıyla farmakokinetik ve farmakodinamik bulguları ön plana çıkarır yöndedir. Dolayısıyla plazma ve idrar gibi biyolojik örneklerde Varenicline tespit edebilen Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi ile gerçekleştirilmiş çalışmalar görülmektedir.

Diğer taraftan plazmada LC-MS/MS ile VRC miktar tayini yapmak için birkaç yöntemin de geliştirildiği görülmüştür. İlki, Obach ve ark. tarafından yapılmış olan (18) daha sonra Faesel ve ark. tarafından VRC'nin farmakokinetik çalışmalarında kullanılmak üzere aynen kullanıldığı görülmektedir (19,20). Diğer, Dobrinas ve ark. tarafından, sigara bırakma tedavisine ilişkin klinik çalışma verilerini ortaya koyan bir UPLC-MS/MS yöntemi olduğu görülmektedir (91). Diğer bir VRC'nin plazmada LC-MS/MS ile kantitatif tayin çalışmasının Kassem ve ark. tarafından olduğu görülmektedir (92). Hem Al Haj ve ark. tarafından hem de Dasari ve Darapaneedi tarafından plazmada 0.1 ng/ml'e kadar VRC'nin belirlenmesini sağlayan yöntemlerin olduğu bildirilmektedir (74,93).

Bildiğimiz kadarıyla idrarda VRC tayinine ilişkin iki yayın bulunmaktadır. Bunlardan ilki spektrofotometri ile fotokimyasal floresans özelliği artırılarak HPLC metodu kullanılmıştır (94). Diğer çalışmada ise idrardaki VRC ve metabolitlerini belirlemek için Kapiler İzotakoforez (ITP)-Kapiler Elektroforez (CZE)-QqQ (üçlü kuadropol MS/MS) yöntemi geliştirildiği görülmektedir (88).

Adli açıdan postmortem örneklerle ilişkin VRC'yi konu alan intihar sonrası olgu sunumu şeklinde yayınlanmış iki çalışmaya rastlanmıştır. Kintz ve ark. tarafından hemoliz olmuş tam kan örneğinde VRC için geliştirilen 1-50 ng/mL doğrusal aralığa sahip LC-MS/MS yöntemi uygulanarak 10 ng/mL konsantrasyonda VRC bulunduğu bildirilmiştir (23). Diğer çalışma bir VRC overdoz olgusu olup, hemoliz olmuş kan ve idrar örneklerinin GC-MS ile analiz yapıldığı ve olguda kan konsantrasyonunun 250 ng/mL olarak bulunmuştur (95).

Geliştirdiğimiz söz konusu LC-MS/MS yönteminin geçerli kılma parametreleri, yukarıda adı geçen çalışmalarla uyumludur.

Faesel ve ark. (20) tarafından LC-API-MS/MS yöntemiyle sigara içen kişilerin günde 2 defa 1 mg VRC vererek plazma ve idrarındaki VRC analizi ile ilgili yapmış oldukları çalışmayla karşılaştırıldığında, bu çalışma plazma için 0.1-50 ng/ml doğrusal aralıkta, %91-100 doğruluk oranı ve %5.1-6.2 kesinlik ile gerçekleştirilmiştir. Bu değerler bizim geliştirdiğimiz yöntemle karşılaştırıldığında, çalışmamızın daha geniş çalışma aralığında daha yüksek doğruluk ve kesinliğe sahip olduğunu söylemek mümkündür. Ayrıca idrar analizinde LOQ değeri 0.1 ng/ml ve %GK değerleri 95-103 olarak tespit edilmiştir. Bu değer kıyaslandığında geliştirdiğimiz LC-MS/MS yönteminin hassasiyetinin çok daha yüksek olduğu göstermektedir.

LC-ESI-MS/MS ile belirli konsantrasyonlarda VRC katılarak çok az plazma miktarı ile yapılan çalışmada doğrusal aralık 0.05-10 ng/ml, doğruluk oranı 91.7-110.6% aralığında

bulunmuştur (93). Bu değerler bizim geliştirdiğimiz yöntemle karşılaştırıldığında, çalışmamızın daha geniş çalışma aralığında daha yüksek doğruluğa sahip olduğunu söylemek mümkündür.

Bildiğimiz kadar ile LC-ESI-MS/MS ile başka idrarda VRC analizi yapılmamıştır. Diğer bir çalışmada ise Piestansky ve ark. (88) 36 yaşında bir adama 1 mg VRC vererek idrarındaki VRC analiz için geliştirdikleri ITP-CZE-ESI-QqQ yöntemde, %GK değerleri 84.89-95.74 aralığında bulunmuştur. Bu değer ile karşılaştırıldığımız zaman geliştirdiğimiz LC-ESI-MS/MS yöntemin daha yüksek geri kazanıma sahip olduğunu söylemek mümkündür.

Bu çalışmaya, Varenicline kullanımının adli bilimler boyutundaki önemi dikkate alınarak başlanmıştır. Ülkemizde sigara bırakma tedavisi gören hastaların plazma ve idrarındaki Varenicline tespit ve tayini yapabilmek için bir LC-MS/MS yönteminin geliştirilmesi ve geçerli kılma çalışmalarının kapsamlı bir şekilde ele alınması bir ilktir. Tayin limiti düşük, tekrarlanabilirliği yüksek, doğrusal aralığı geniş, geri kazanım ve çekitleme verimliliği yeterli seviyede, analiz süresi oldukça kısadır.

Geliştirdiğimiz bu yönteme, ileride Varenicline metabolitlerinin de dahil olması ile plazma ve idrarda üzerinden yürütülen çalışmaların daha verimli hale getirileceği düşünülmektedir. Varenicline tespit ve tayini için geliştirilen bu metodun hem farmakokinetik ve farmakodinamik klinik çalışmalar için hem de Varenicline'den kaynaklı adli vakaların ispatlanmasına imkan sağlayacağı düşünülmektedir. Özellikle, Varenicline kaynaklı olduğu düşünülen tamamlanmış intihar ve/veya intihar girişimi olgularının etraflıca değerlendirilmesini sağlarken, klinikte ise oluşan psikolojik etkilerin risklerini daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı ve önlem alma imkanı vereceği kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

1. Çelik I, Yüce D, Hayran M, Erman M, Kiliçkap S, Buzgan T, vd. Nationwide Smoking Cessation Treatment Support Program - Turkey project. Health Policy (New York) [Internet]. 2015;119(1):50–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healthpol.2014.11.017>
2. Sharon Cannistra, Jackie Britz, Sarah Pedersen, Natalie Rosseau, Kristine Chin, Simon Essig Aberg. Drugs to Quit Smoking Can Affect Mental and Physical Health: the Truth About Chantix and Zyban | National Center for Health Research. National Center for Health Research [Internet]. [kaynak 03 Mayıs 2021]; Available at: <https://www.center4research.org/drugs-quit-smoking-can-affect-mental-physical-health-truth-chantix-zyban/>
3. Xi ZX. Preclinical pharmacology, efficacy, and safety of varenicline in smoking cessation and clinical utility in high risk patients. Drug Healthc Patient Saf. 2010;2(1):39–48.
4. Moore TJ, Glenmullen J, Furberg CD. Prescription drugs associated with reports of violence towards others. PLoS One [Internet]. 2010 [kaynak 03 Mayıs 2021];5(12). Available at: www.plosone.org
5. Moore TJ, Furberg CD, Glenmullen J, Maltsberger JT, Singh S. Suicidal behavior and depression in smoking cessation treatments. PLoS One. 2011;6(11):1–7.
6. Singh S, Loke YK, Spangler JG, Furberg CD. Risk of serious adverse cardiovascular events associated with varenicline: A systematic review and meta-analysis. Cmaj [Internet]. 2011 [kaynak 03 Mayıs 2021];183(12):1359–66. Available at: www.cmaj.ca/lookup/doi/10.1503/cmaj.110804

7. Mcmillen A. “His death still hurts”: the Pfizer anti8 smoking drug ruled to have contributed to suicide. The Guardian [Internet]. 15 Eylül 2017 [kaynak 03 Mayıs 2021]; Available at: <https://www.theguardian.com/business/2017/sep/15/his-death-still-hurts-the-pfizer-anti-smoking-drug-ruled-to-have-contributed-to-suicide>
8. Faessel HM, Obach RS, Rollema H, Ravva P, Williams KE, Burstein AH. A review of the clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of Varenicline for smoking cessation [Internet]. C. 49, Clinical Pharmacokinetics. Springer; 2010 [kaynak 04 Nisan 2021]. s. 799–816. Available at: <https://link.springer.com/article/10.2165/11537850-000000000-00000>
9. Keating GM, Lyseng-Williamson KA. Varenicline: A pharmacoeconomic review of its use as an aid to smoking cessation. Pharmacoeconomics. 2010;28(3):231–54.
10. Tonstad S, Arons C, Rollema H, Berlin I, Hajek P, Fagerström K, vd. Varenicline: mode of action, efficacy, safety and accumulated experience salient for clinical populations. Curr Med Res Opin [Internet]. 2020;36(5):713–30. Available at: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=icmo20>
11. Cahill K, Lindson-Hawley N, Thomas KH, Fanshawe TR, Lancaster T. Nicotine receptor partial agonists for smoking cessation. Cochrane Database Syst Rev [Internet]. 2016;2016(5). Available at: www.cochranelibrary.com
12. Kassem MG, Al Hossaini AM. Varenicline. İçinde: Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. Academic Press Inc.; 2012. s. 389–411.
13. Rollema H, Coe JW, Chambers LK, Hurst RS, Stahl SM, Williams KE. Rationale, pharmacology and clinical efficacy of partial agonists of $\alpha 4\beta 2$ nACh receptors for smoking cessation. Trends Pharmacol Sci. 01 Temmuz 2007;28(7):316–25.

14. Rucktooa P, Haseler CA, Van Elk R, Smit AB, Gallagher T, Sixma TK. Structural characterization of binding mode of smoking cessation drugs to nicotinic acetylcholine receptors through study of ligand complexes with acetylcholine-binding protein. *J Biol Chem* [Internet]. 2012;287(28):23283–93. Available at: <http://www.rcsb.org/>

15. Ebbert J. Varenicline for smoking cessation: efficacy, safety, and treatment recommendations. *Patient Prefer Adherence*. 2010;355.

16. Kaur K, Kaushal S, Chopra SC. CURRENT THERAPEUTIC RESEARCH Varenicline for Smoking Cessation: A Review of the Literature. *Curr Ther Res* [Internet]. 2009;70(1):35–54. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3969980/pdf/main.pdf>

17. Foulds J. The neurobiological basis for partial agonist treatment of nicotine dependence: Varenicline. *Int J Clin Pract* [Internet]. 02 Mayıs 2006 [kaynak 03 Mayıs 2021];60(5):571–6. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1368-5031.2006.00955.x>

18. Scott Obach R, Reed-Hagen AE, Krueger SS, Obach BJ, O’Connell TN, Zandi KS, vd. Metabolism and disposition of varenicline, a selective $\alpha 4\beta 2$ acetylcholine receptor partial agonist, in vivo and in vitro. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(1):121–30.

19. Faessel HM, Smith BJ, Gibbs MA, Gobey JS, Clark DJ, Burstein AH. Single-dose pharmacokinetics of varenicline, a selective nicotinic receptor partial agonist, in healthy smokers and nonsmokers. *J Clin Pharmacol*. 2006;46(9):991–8.

20. Faessel HM, Gibbs MA, Clark DJ, Rohrbacher K, Stolar M, Burstein AH. Multiple-dose pharmacokinetics of the selective nicotinic receptor partial agonist, varenicline, in healthy smokers. *J Clin Pharmacol*. 2006;46(12):1439–48.

21. Kikkawa H, Maruyama N, Fujimoto Y, Hasunuma T. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of the selective nicotinic receptor partial agonist, varenicline, in healthy Japanese adult smokers. *J Clin Pharmacol*. 2011;51(4):527–37.
22. West R. Tobacco smoking: Health impact, prevalence, correlates and interventions. *Psychol Health* [Internet]. 2017;32(8):1018–36. Available at: <https://doi.org/10.1080/08870446.2017.1325890>
23. Kintz P, Evans J, Villain M, Cirimele V. Smoking cessation with varenicline: a suicidal fatality. *J Anal Toxicol*. 2009;33(2):118–20.
24. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2019 [Internet]. Geneva; 2019. Available at: <https://www.who.int/teams/health-promotion/tobacco-control/who-report-on-the-global-tobacco-epidemic-2019&publication=9789241516204>
25. Ravva P, Gastonguay MR, Faessel HM, Lee TC, Niaura R. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the effect of varenicline on nicotine craving in adult smokers. *Nicotine Tob Res*. 01 Ocak 2015;17(1):106–13.
26. Bolin K, Wilson K, Benhaddi H, De Nigris E, Marbaix S, Mork AC, vd. Cost-effectiveness of varenicline compared with nicotine patches for smoking cessation - Results from four European countries. *Eur J Public Health*. Aralık 2009;19(6):650–4.
27. Aubin HJ, Luquiens A, Berlin I. Pharmacotherapy for smoking cessation: Pharmacological principles and clinical practice. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;77(2):324–36.
28. McClure JB, Swan GE, Jack L, Catz SL, Zbikowski SM, McAfee TA, vd. Mood, Side-effects and Smoking Outcomes Among Persons With and Without Probable Lifetime

- Depression Taking Varenicline. *J Gen Intern Med*. 2009;5:563–72.
29. FREEDMAN R. Exacerbation of Schizophrenia by Varenicline. *Am J Psychiatry* [Internet]. Ağustos 2007;164(8):1269–1269. Available at: <http://psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/appi.ajp.2007.07020326>
 30. KOHEN I, KREMEN N. Varenicline-Induced Manic Episode in a Patient With Bipolar Disorder. *Am J Psychiatry* [Internet]. Ağustos 2007 [kaynak 06 Mayıs 2021];164(8):1269–70. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/6168620>
 31. McClure JB, Swan GE, Catz SL, Jack L, Javitz H, McAfee T, vd. Smoking outcome by psychiatric history after behavioral and varenicline treatment. *J Subst Abuse Treat* [Internet]. 01 Haziran 2010 [kaynak 06 Mayıs 2021];38(4):394–402. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740547210000681>
 32. Harrison-Woolrych M, Ashton J. Psychiatric adverse events associated with varenicline: An intensive postmarketing prospective cohort study in New Zealand. *Drug Saf* [Internet]. 2011 [kaynak 06 Mayıs 2021];34(9):763–72. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21830838/>
 33. Research C for DE and. Public Health Advisory: FDA Requires New Boxed Warnings for the Smoking Cessation Drugs Chantix and Zyban [Internet]. Postmarket Drug Safety Information for Patients and Providers. FDA; 2009 [kaynak 06 Mayıs 2021]. Available at: <http://wayback.archive-it.org/7993/20170112005513/http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm169988.htm>
 34. FDA Drug Safety Communication: Safety review update of Chantix (varenicline) and

- risk of neuropsychiatric adverse events | FDA [Internet]. [kaynak 06 Mayıs 2021]. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-safety-review-update-chantix-varenicline-and-risk-neuropsychiatric>
35. Anthenelli RM, Benowitz NL, West R, St Aubin L, McRae T, Lawrence D, vd. Neuropsychiatric safety and efficacy of varenicline, bupropion, and nicotine patch in smokers with and without psychiatric disorders (EAGLES): a double-blind, randomised, placebo-controlled clinical trial. Lancet [Internet]. 18 Haziran 2016 [kaynak 08 Nisan 2021];387(10037):2507–20. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/>
 36. U.S Food & Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA revises description of mental health side effects of the stop-smoking medicines Chantix (varenicline) and Zyban (bupropion) to reflect clinical trial findings | FDA [Internet]. Drug Safety Communication. 2018 [kaynak 08 Nisan 2021]. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-fda-revises-description-mental-health-side-effects-stop-smoking>
 37. Zyban [Package Insert] [Internet]. Brentford, United Kingdom: GLAXOSMITHKLINE; 2019 [kaynak 06 Mayıs 2021]. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/020711s048lbl.pdf
 38. Chantix [Package Insert] [Internet]. New London: Pfizer; 2019 [kaynak 06 Mayıs 2021]. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/021928s048lbl.pdf
 39. Medication Guide Chantix [Internet]. New York: Pfizer; 2019 [kaynak 06 Mayıs 2021]. Available at: <http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=557§ion=MedGuide>

40. Carvalho JL. Toxicological analyzes and its use in forensic science. *Foresic Res Criminol Int J*. 2018;6(5):376–81.
41. Mozayani A. *The Forensic Laboratory Handbook Procedures and Practice* [Internet]. 2nd editio. Mozayani A, Noziglia C, editörler. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-872-0>
42. ESER B. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *J Heal Serv Educ*. 2018;2(2):51–7.
43. Heftmann E. *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods-Part B: Applications*. Elsevier; 2004.
44. Houck MM, Siegel JA. *Fundamentals of Forensic Science* [Internet]. 3rd editio. Elsevier; 2015. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20130129856>
45. Jickell S, Negrusz A. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*. London: Pharmaceutical Press; 2008.
46. Gin J, Imwinkelried EJ. Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC/MS): In Scientific Evidence, Even “Gold Standard” Techniques Have Limitations. *SSRN Electron J* [Internet]. 17 Eylül 2018 [kaynak 11 Mayıs 2021]; Available at: <https://papers.ssrn.com/abstract=3245423>
47. Kyle PB. *Laboratory methods in toxicology*. İçinde: *Toxicology Cases for the Clinical and Forensic Laboratory* [Internet]. Elsevier; 2020. s. 19–26. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20170041083>
48. Maurer HH, Pfleger K, Weber AA. *Mass Spectral Library of Drugs, Poisons, Pesticides,*

Pollutants and their Metabolites. Germany: Wiley-VCH Weinheim; 2016.

49. Lewis SW, Lenehan CE. Liquid and Thin-Layer Chromatography. İçinde: Encyclopedia of Forensic Sciences [Internet]. Elsevier; 2013. s. 586–9. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123821652002464>
50. Jackson ARW, Jackson JM. Forensic Science (2nd Edition). Pearson; 2008.
51. Maurer HH. Perspectives of liquid chromatography coupled to low-and high-resolution mass spectrometry for screening, identification, and quantification of drugs in clinical and forensic toxicology. Ther Drug Monit. 2010;32(3):324–7.
52. Langford A, Dean J, Reed R, Holmes D, Weyers J, Jones A. Practical Skills in Forensic Science. Essex: Pearson Education Limited; 2005.
53. Schwaninger AE, Meyer MR, Maurer HH. Chiral drug analysis using mass spectrometric detection relevant to research and practice in clinical and forensic toxicology. J Chromatogr A [Internet]. 2012;1269:122–35. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.045>
54. Maurer HH. Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. Clin Chem Lab Med. 2004;42(11):1310–24.
55. Wu AHB, Gerona R, Armenian P, French D, Petrie M, Lynch KL. Role of liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (LC-HR/MS) in clinical toxicology. Clin Toxicol [Internet]. Eylül 2012 [kaynak 09 Mayıs 2021];50(8):733–42. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/15563650.2012.713108>
56. Maurer HH. Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and

- forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem.* 2007;388(7):1315–25.
57. Grapp M, Kaufmann C, Streit F, Binder L. Systematic forensic toxicological analysis by liquid-chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry in serum and comparison to gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2018;287:63–73. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.03.039>
58. Maublanc J, Dulaurent S, Morichon J, Lachâtre G, Gaulier J michel. Identification and quantification of 35 psychotropic drugs and metabolites in hair by LC-MS/MS: application in forensic toxicology. *Int J Legal Med.* 2015;129(2):259–68.
59. Maurer HH. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem.* 2005;38(4):310–8.
60. Kushnir MM, Rockwood AL, Bergquist J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry applications in endocrinology. *Mass Spectrom Rev.* Mayıs 2010;29(3):480–502.
61. Peters FT, Remane D. Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography-mass spectrometry to forensic and clinical toxicology - A review. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(8):2155–72.
62. Wells MJM. Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids. İçinde: *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2003 [kaynak 09 Mayıs 2021]. s. 37–138. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0471457817.ch2>

63. Barwick V, Bravo PPM, Ellison SLR, Engman J, Gjengedal ELF, Lund UO, vd. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics (2nd ed. 2014) [Internet]. 2014 [kaynak 09 Mayıs 2021]. Available at: www.eurachem.org.
64. Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü; 2018.
65. Yılmaz A. TURKLAB Rehber 01: Kimyasal analizlerde metot validasyonu ve verifikasyonu. İstanbul: Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği; 2013.
66. Metodun Geçerli Kılınması için Bilgilendirme Kılavuzu. Türk Akreditasyon Kurumu; 2019.
67. Pestisit Analizleri İçin Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması Açıklamalı Uygulama Rehberi. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı; 2013.
68. Tobacco [Internet]. WHO. 2020 [kaynak 10 Mayıs 2021]. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>
69. Cohen S, Lichtenstein E, Prochaska JO, Rossi JS, et al. Debunking myths about self-quitting: Evidence from 10 prospective studies of persons who attempt to quit smoking by themselves. Am Psychol [Internet]. 1989 [kaynak 10 Mayıs 2021];44(11):1355–65. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2589730/>
70. West R, Raw M, McNeill A, Stead L, Aveyard P, Bitton J, vd. Health-care interventions to promote and assist tobacco cessation: A review of efficacy, effectiveness and affordability for use in national guideline development [Internet]. C.

- 110, *Addiction*. Blackwell Publishing Ltd; 2015 [kaynak 10 Mayıs 2021]. s. 1388–403.
Available at: [/pmc/articles/PMC4737108/](https://pubs.acs.org/sharingguidelines)
71. Rollema H, Faessel HM, Williams KE. Varenicline overdose in a teenager a clinical pharmacology perspective. *Clin Toxicol*. 2009;47(6):605.
 72. Ravva P, Gastonguay MR, Tensfeldt TG, Faessel HM. Population pharmacokinetic analysis of varenicline in adult smokers. *Br J Clin Pharmacol*. Kasım 2009;68(5):669–81.
 73. Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *J Chromatogr A*. 26 Kasım 2004;1058(1–2):61–6.
 74. Al-Haj A, Alawi M, Arafat T, Hourani MK. Method development, validation and bioequivalence of varenicline in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 05 Temmuz 2013;931:134–9.
 75. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J Chromatogr B*. 2007;852:22–34.
 76. Gazaliev AM, Zhurinov MZ, Tuleuov BI. Isolation, analysis, biosynthesis, and modification of the alkaloid cytisine. *Chem Nat Compd*. Mayıs 1991;27(3):259–69.
 77. Rouden J, Lasne M-C, Jérôme Blanchet J, Jérôme Baudoux J. (–)-Cytisine and Derivatives: Synthesis, Reactivity, and Applications. 2013; Available at: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

78. Satheesh B, Kumarpulluru S, Raghavan V, Saravanan D. UPLC separation and quantification of related substances of varenicline tartrate tablet. *Acta Chromatogr.* 01 Haziran 2010;22(2):207–18.
79. Satheesh B, Sree Ganesh KK, Saravanan D. Identification, isolation and characterization of an unknown impurity of varenicline. *Sci Pharm.* 2012;80(2).
80. Kadi AA, Mohamed MS, Kassem MG, Darwish IA. A validated stability-indicating HPLC method for determination of varenicline in its bulk and tablets. *Chem Cent J* [Internet]. 14 Aralık 2011;5(1):30. Available at: <http://journal.chemistrycentral.com/content/5/1/30>
81. Channabasavaraj KP, Modiya JS, Sharath HM. Development and validation of RP-HPLC method for estimation of Varenicline tartrate in bulk drug and tablet dosage form. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011;3(2).
82. Katakam P, Kalakuntla RR, Sama JR. A Novel Stability Indicating RP-HPLC Assay Method for the Determination of Varenicline in Pharmaceutical Formulations. *Pharmacologia.* 2012;3(6).
83. El-Bagary RI, Abo-Talib NF, El-Wahab Mohamed MA. Novel liquid chromatographic methods for the determination of varenicline tartrate. *Talanta.* 2016;146.
84. Balaji M, Appa Rao KMC, Ramakrishna K, Srinivasarao V. Development and validation of related substances method for Varenicline and its impurities. *Der Pharm Lett.* 2016;8(1).
85. Lu Y, Sun X, Song F, Wang L, Song M, Hang T. Impurity profiling of varenicline tartrate by LC-QTOF mass spectrometric techniques during drug development. *J Pharm*

- Biomed Anal. 2018;155.
86. Modiya JS. Development and Validation of New Analytical Methods for Estimation of Varenicline Tartrate in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. Rajiv Gandhi University of Health Sciences, Karnataka, Bangalore; 2011.
 87. Alhazmi HA, Makeen HA, El Deeb S. Determination of varenicline by capillary zone electrophoresis. Dig J Nanomater Biostructures. 2013;8:295–301.
 88. Piešťanský J, Maráková K, Veizerová L, Galba J, Mikuš P. On-line column coupled isotachophoresis-capillary zone electrophoresis hyphenated with tandem mass spectrometry in drug analysis: Varenicline and its metabolite in human urine. Anal Chim Acta. 2014;826(1):84–93.
 89. Çelebier M, Koçak E, Altinöz S. Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determination of varenicline tartrate in quality-control laboratories. Maced J Chem Chem Eng. 2015;34(2):267–75.
 90. Piešťanský J, Maráková K, Galba J, Kováč A, Mikuš P. Comparison of hydrodynamically closed two-dimensional capillary electrophoresis coupled with ultraviolet detection and hydrodynamically open capillary electrophoresis hyphenated with mass spectrometry in the bioanalysis of varenicline. J Sep Sci. 01 Mayıs 2017;40(10):2292–303.
 91. Dobrinas M, Choong E, Noetzli M, Cornuz J, Ansermot N, Eap CB. Quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine and varenicline in human plasma by a sensitive and specific UPLC-tandem mass-spectrometry procedure for a clinical study on smoking cessation. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 15 Kasım 2011;879(30):3574–82.

92. Kassem G. An isocratic liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric determination of varenicline in human plasma and dosage form. *African J Pharm Pharmacol*. 2013;7(20):1343–50.
93. Dasari PK, Darapaneedi SR. PICOGRAM LEVEL QUANTIFICATION OF VARENICLINE IN HUMAN PLASMA SAMPLES BY LC – ESI-MS/MS. *Int J Pharm Sci Res*. 2016;7(6):2510–7.
94. da Cunha ALMC, Osorio ACP, Toloza CAT, Almeida JMS, Khan S, Aucélio RQ. Determination of varenicline after photochemical fluorescence enhancement using spectrofluorimetry and high-performance liquid chromatography. *Microchem J* [Internet]. 2019;144(September 2018):172–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.09.006>
95. Stove CP, De Letter EA, Piette MH, Lambert WE. Fatality following a suicidal overdose with varenicline. *Int J Legal Med*. 2013;127(1):85–91.

EKLER

Etik Kurul Kararı

İÜC Tarih ve Sayı: 06/11/2019-170549



 * B E L M E Y Z 7 6 *



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
 Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı



Sayı :59491012-604.01.02-
 Konu :Yüksek Lisans Öğrencisi Siti
 RAHMAWATI'nin etik kurul
 kararı A-30

ADLI TIP VE ADLI BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi :09.16.2019 tarih, 86669574-302.14.06-158970 sayılı yazı

Enstitünüz Fen Bilimler Anabilim Dalı öğretim üyesi **Dr.Öğr.Üyesi Zeynep TÜRKMEN'in** danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi Siti RAHMAWATI'nin** yürütücülüğünde **Doç.Dr.Şermin BÖREKÇİ'nin** yardımcılığında "**Sigara Bırakma Tedavisi Gören Hastaların Plazma ve İdrarında Vareniklinin Kromatografik Tayini** " başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **05 Kasım 2019** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla; etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

e-İmzalı
 Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
 Başkan

e-İmzalı
 Prof. Dr. Muhlis Cem AR
 Dekan a.
 Dekan Yardımcısı

NOT:Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
 1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için:<http://dogrulama.istanbul.edu.tr/enVision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BELMEYZ76>

Ayrıntılı bilgi için imzabat: Güler SOYDANER Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
 Tel : 0 (212) 414 30 00 Faks : 0 (212) 632 00 33
 e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Siti Rahmawati

Doğum Yeri ve Tarihi :

E-posta :

Eğitim Bilgileri

2018 – Devam ediyor İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı (Tezli Yüksek Lisans Programı)

2013 – 2017 Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Lisans Programı)