

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Adli Tıp Enstitüsü
Fen Bilimleri Anabilim Dalı
Danışman: Doç.Dr. Münevver AÇIKKOL

**FLUOKSETİN VE METABOLİTİ NORFLUOKSETİNİN
GAZ KROMOTOGRAFİSİ-KÜTLE
SPEKTROSKOPİSİ(GC-MS) YÖNTEMİ İLE
BİYOLOJİK MATERYALDEN(İDRAR) TAYİNİ**

Dilek SALKIM

İstanbul-2008

Bu tez çalışması, İ.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir.

Proje No: T-853/02062006

Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından Fluoksetin ve metaboliti Norfluoksetinin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi Yöntemi ile Biyolojik Materyalden(idrar) Tayini başlıklı projeden dolayı başarılı araştırıcı ödülü verildi(2007).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü Laboratuvarı'nda yapmama olanak tanıyan İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü Müdürü *Prof. Dr. İmdat ELMAS'a* ve İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı *Prof. Dr. Salih CENGİZ'e*,

Bana kendisi ile böyle bir çalışma olanağı sağlayan ve bu çalışmanın gerçekleşmesinde büyük yardım ve rehberliğini esirgemeyen ve derin bilgilerinden her zaman faydalandığım çok değerli danışman hocam, *Doç.Dr. Münevver AÇIKKOL'a*

Her zaman benim yanımda olup, beni desteklediği için, görüş ve tecrübeleriyle bana ışık tutan ve örnek aldığım sevgili babam *Uzm. Fiz. Mümin SALKIM'a*

Çalışmamda psikiyatri dalındaki bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak, bana bu yolda ışık tutan sayın hocam *Prof. Dr. Ruhi YAVUZ'a*,

Tez çalışmalarımda büyük emeği geçen ve arkadaşlığını her zaman hissettiğim *Arş. Gör. Elif BAYKARA'ya*,

Tez süresince her türlü desteklerini esirgemeyen İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü Sekreteri *Şaban AYKUT'a* ve tüm enstitü mensuplarına,

Manevi desteklerinden dolayı arkadaşlarım;Selda Mercan,Sibel BOLLE,Şükriye KARADAYI ve Zeynep TÜRKMEN'e,

Laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan *laborant Murat YAYLALI'ya*

Her zaman benim yanımda olup, beni destekledikleri için ve bana yürekten inandıkları için *aileme, Hasan ve Nazmiye ÖZTAŞKIRAN'a*,

Teze olan katkılarından dolayı *Abdi İbrahim ilaç San. Ve Tic. A.Ş'*ne sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Kimyager Dilek SALKIM

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ VE AMAÇ -----	1
2. GENEL BİLGİLER -----	3
2.1. Depresyon -----	3
2.1.1. Depresyonun Toplumdaki sıklık ve yaygınlığı -----	4
2.1.2. Depresyonun Sınıflandırılması -----	4
2.1.3. Depresyon Tedavisinde Kullanılan Yöntemler -----	5
2.2. Antidepresanlar -----	5
2.2.1. Antidepresan İlaçlarla Zehirlenmeler -----	7
2.3. Serotonin -----	8
2.3.1. Serotonin Geri Alım İnhibitörleri -----	9
2.4. Fluoksetin -----	10
2.4.1. Fluoksetinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri -----	11
2.4.2. Norfluoksetin -----	12
2.4.3. Fluoksetin ve Norfluoksetin ile ilgili Analiz Çalışmaları -----	13
2.5. Örnek Hazırlama -----	14
2.5.1. Ekstraksiyon -----	14
2.5.1.1. Sıvı-sıvı Ekstraksiyon -----	14
2.5.1.2. Katı-Faz Ekstraksiyonu -----	15
2.6. Kromatografik Yöntemleri -----	17
2.6.1. Kromatografinin Sınıflandırılması -----	19
2.6.1.2. Ayırmayı Sağlayan Kuvvete Göre -----	19
2.6.1.3. Kullanılan Düzeneğe Göre -----	21
2.6.2. Gaz Kromatografisi -----	23
2.7. Kütle Seçici Dedektör -----	26

2.8. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi-----	28
---	----

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler-----	30
3.2. Gereçler ve Sarf Malzemeler -----	31
3.3. Örnekleme-----	31
3.4. Çözeltiler-----	31
3.5. Örnek Hazırlama -----	33
3.5.1. Ekstraksiyon-----	33
3.5.1.1. Sıvı-Sıvıekstraksiyonu-----	33
3.5.1.2. Katı-Faz Ekstraksiyonu-----	33
3.5.2. Türevlendirme-----	34
3.6. GC-MS Analizi-----	34
3.7. Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi-----	35
3.8. Geri Kazanım Deneyleri-----	36
3.9. Hasta ve Kontrol Örnekleri Analizi-----	36

4. BULGULAR-----	37
-------------------------	-----------

5. TARTIŞMA VE SONUÇ-----	47
----------------------------------	-----------

6. ÖZET-----	53
---------------------	-----------

7. SUMMARY-----	55
------------------------	-----------

8. KAYNAKLAR	57
9. EKLER	61
10. ÖZGEÇMİŞ	62

GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda en sık görülen hastalıklardan biri de depresyondur. Bu hastalığın tedavisinde, antidepresanlar kullanılmaktadır. Son yıllarda antidepresan kullanımı yaygınlaşmıştır [1]. Çağımızda antidepresan kullanımının artmasıyla birlikte, bu preparatlara ait etken maddelerin analizleri önem kazanmaktadır. Antidepresanların, özellikle de kan, idrar ve diğer biyolojik materyallerden tespitinde kullanılan analiz yöntemleriyle ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

Ülkemizde Gülhane Askeri Tıp Akademisinin(GATA), acil servisine yapılan intihar girişimi vakaları, acil başvurularının önemli bir bölümünü oluşturduğu ve yüksek doz ilaçla yapılan intihar girişimlerinde en sık antidepresan ilaçlar kullanıldığı belirtilmiştir [2].

Antidepresan ilaçların intihar olaylarındaki kullanım sıklığının artması nedeniyle, ölümlü sonuçlanan olguların aydınlatılması, ölümlü sonuçlanmayan olgularda ise derhal detoksifikasyon ve antidot tedavisine geçilebilmesi açısından, olayda kullanılan maddelerin tayin yöntemi önem kazanmaktadır. Bunun yanında madde kullanımının trafik kazalarına etkisinin araştırılması gereği, dünyada ve ülkemizde üzerinde durulması gereken diğer önemli konulardan biridir [3,4]. Bu nedenle bu tür olaylarda kullanılan maddelerin tespitinde kullanılacak yöntemin hızlı, seçici, güvenilir, hassas olması, doğru sonuca çabuk ulaşmak açısından önemlidir.

Toplumlarda Obsesif Kompulsif Kordinasyon Bozukluğu(OKKB)'nin görülme oranı oldukça yüksektir. Bundan dolayı, bu hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar sıkça karşımıza çıkmaktadır. Güncel antidepresanlardan biri "Fluoksetin" dir. "Fluoksetin" obsesif kompulsif bozukluk tedavisinde kullanılmaktadır [5].

İngiltere’de kullanılan antidepresan sayısının çok yüksek seviyelere ulaştığı, ülkenin Çevre Ajansı tarafından bildirilmekte ve fluoksetin etken maddesinin, nehir sistemlerinde ve içme suyu rezervi olarak kullanılan yer altı sularında görülmeye başladığı aynı ajanslarca ifade edilmektedir. Ancak, bu kimyasallara düşük dozda uzun süreli maruz kalmanın etkileri henüz bilinmemektedir [1].

Diğer bazı antidepresanlar gibi “Fluoksetin” in istismarında ve/veya diğer ilaçlarla beraber alındığında istenmeyen bazı etkiler ortaya çıkmaktadır. Son zamanlarda meydana gelen ilaç ile zehirlenme olgularında “Fluoksetin” oldukça sık karşımıza çıkmaktadır [6].

Bu çalışmada, “Fluoksetin” ile ilgili adli olgularda destek olmak üzere “Fluoksetin” ve metaboliti “Norfluoksetin”in, idrardan, Gaz Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi (GC/MS) sistemi kullanılarak nicel ve nitel tayini için yöntem geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Depresyon

Depresyon sözcüğünün Latince kökü “depressus” tur. Aşağı doğru bastırılan, gamlı, kederli anlamına gelir. Depresyon; bir duygu durum bozukluğudur. Başlı başına bir hastalık olarak görülebildiği gibi alkol, uyuşturucu, uyarıcı madde kullanımı sırasında, bazı ilaçların tedavi amacıyla kullanımında, bazı metabolik hastalıklarda ve kanser gibi sorunlara ikincil olarak da gelişebilir. Depresyondaki bir kişinin hayata bakış açısı değişir. Artık kişi ümidini kaybetmiştir, kendisini ve içinde bulunduğu çevreyi bomboş, anlamsız, zevksiz, değersiz hissetmektedir[7,8].

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, her 4 kişiden birinde hayatın herhangi bir döneminde bir ya da birden fazla ruhsal veya davranışsal bozukluk gelişmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, depresyonu, “mutsuzluk, aktivitelere olan ilgi kaybı ve enerji azalması ile karakterize olan, sık görülen ruhsal bir bozukluk” olarak tanımlamıştır.

Genel olarak depresyondaki semptomları 4 alanda toplayabiliriz:

1. Duygudurum alanı: çökkün, kederli, üzgün ve acı verici duygular hastanın kendisi tarafından söze dökülebilir.
2. Psikomotor etkinlik: daha sıklıkla psikomotor hareketlerde yavaşlama, yorgunluk, bitkinlik, konuşmada yavaşlama ve psikomotor ajitasyonda olabilir.
3. Bilişsel Alan: Düşünce içeriğinde kayıp düşünceleri, umutsuzluk, yetersizlik, değersizlik, suçluluk ve ölüm düşünceleri olur.
4. Vegetatif alan: Uyku ve iştah bozuklukları gözlenir[9].

2.1.1. Depresyonun toplumdaki sıklık ve yaygınlığı

Depresyon bütün hastalıklar arasında en sık görülenlerden biridir. Bebeklik dönemi de içinde olmak üzere hemen her yaşta başlayabilir. Depresyonun toplumdaki yaygınlık oranı %9-20 arasında bildirilmektedir. Bir kişinin yaşamı boyunca depresyon belirtilerini yaşama olasılığı % 15' tir. Bu olgularının yarısı 20 ile 50 yaşları arasında ortaya çıkmaktadır.

Genel gözlem bu hastalığın ülke ya da kültürel farklılıklardan bağımsız olarak kadınlarda erkeklere göre iki kat daha fazla görüldüğü şeklindedir. Yaşam boyu hastalanma riski ise; erkeklerde %8-12, kadınlar için %20-26'dır. Bu durumun hormonal farklılıklara, doğum yapmaya, çeşitli psikososyal faktörlere maruz kalmaya bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir [10,11].

2.1.2. Depresyonun Sınıflandırılması

Duygu durum bozuklukları kategorik olarak normalden ayrılma düzeyine, doğal öykülerine, ailesel sıklık, seyir, sonlanım ve tedaviye yanıtlarına göre çeşitli alt gruplara ayrılmaktadır. Bu sınıflandırma sistemi aşağıda verilmiştir:

1. Depresif Bozukluklar
2. Bipolar bozukluklar
3. Genel tıbbi duruma ve madde kullanımına bağlı duygudurum bozuklukları
4. Başka türlü adlandırılmayan duygu durum bozukluğu[12].

2.1.3. Depresyon Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

Tedavi yöntemlerini 3 ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar:

- Antidepresan ilaçlarla tedavi
- Psikoterapi
- Elektrokonvulsif Terapi (EKT)

Antidepresan ilaçlar, depresyon tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Depresyona girmiş her 100 hastadan 70-80'i başka hiçbir müdahaleye gerek kalmadan, sadece ilaç tedavisiyle düzelir. Kalan %20-30'luk grupta ise psikoterapi veya elektroşok türünden ekstra girişimlere ihtiyaç duyulur.

Depresyonda beyinde serotonin, noradrenalin, dopamin maddeleri azalmıştır. Bunlar duygu ve düşünce hayatını düzenleyen maddelerdir. Antidepresanlar bu maddelerin miktarını arttırarak etkilerini gösterirler. Antidepresan ilaçların 6 ay ile 1 yıl arası kullanılması gerekmektedir[12].

2.2. Antidepresanlar

Depresif bozuklukların tedavisinde kullanılan ilaçlar antidepresanlar olarak adlandırılmaktadır. Bu ilaçların diğer ruhsal ve bedensel bozukluklardaki etkinliğinin gösterilmesi sonucunda kullanımları büyük bir hızla artmaktadır. Aynı ilaçlar anksiyete bozuklukları, uyku bozuklukları, yeme bozuklukları, cinsel işlev bozuklukları, dürtü denetim bozuklukları, enürezis noktürna, ağrı proflaksisi, fibromiyalji, periferik nöropatiler, premenstrüel disforik bozukluk gibi pek çok tanı grubunda kullanılmaya başlanmıştır[12,13].

Antidepresanları şu şekilde gruplandırabiliriz:

- Monoamin oksidaz inhibitörleri

a)Seçici olmayan ve geri dönüşsüz monoamin oksidaz inhibitörleri:

İproniazid, izokarboksazid, tranilsipromin

b) Seçici ve geri dönüşsüz monoamin oksidaz inhibitörleri: Klorgilin

c) Seçici ve geri dönüşlü monoamin oksidaz inhibitörleri: Moklobemid, brofaromin, taloksaton, befloksaton, cimoksaton

- Trisiklik Antidepresanlar: İmipramin, amitriptilin, desipramin, klomipramin, nortriptilin, dothepin ve lofepramin

- Seçici serotonin geri alım inhibitörleri(SSRI): Sitalopram, fluoksetin, paroksetin, sertralin ve zimeldin

- Serotonin ve noradrenalin geri alım inhibitörleri (SNRI): Duloksetin, venlafaksin, milnasipran

- Serotonin geri alım inhibitörü ve 5-HT₂ blokörleri (SARI): Nefazodon ve trazodon

- Noradrenalin seçici geri alım inhibitörleri(NARI): Reboksetin

- Noradrenalin ve dopamin geri alım inhibitörleri (NDRI): Bupropion ve minaprin

- Noradrenerjik ve spesifik serotonerjik antidepresanlar(NaSSA): Mianserin, mirtazapin ve idozoksan

- Kısmi 5-HT_{1a} agonistleri: İpsapiron, gepiron, buspiron

- GABA mimetikler: Fengabin, progabid

- Benzodiazepinler:Alprazolam, adinazolam ve zometapin
- Diğerleri; Tianeptin[12]

2.2.1. Antidepresan İlaçlarla Zehirlenmeler

Antidepresan ilaçlarla zehirlenmeler büyük oranda intihar amacıyla yüksek doz ilaç alımı veya yanlış kullanım sonucunda oluşmaktadır. İntihar girişimi, toplumlarda ve sosyodemografik gruplarda farklı oranlarda görülen önemli bir mortalite nedenidir. Sağlık sorunlarının çözümünde önemli adımlar atan batı toplumları, bireyin sorunlarını çözmede aynı oranda başarılı olamamışlardır. Bunun sonucunda intihar, ölüm nedenleri arasında daha yüksek bir sıraya yükselmiştir. İntihar girişiminde bulunanların % 95'inde tanı konabilen bir ruhsal bozukluk bulunduğu bildirilmektedir. Bu grubun % 80'ini ise depresif bozukluklar oluşturmaktadır. Başka bir deyişle depresif bozukluklar intiharın en önemli nedenini oluşturmaktadır. Geçmişte depresif bozuklukların büyük ölçüde tanınmadığı, bu nedenle de önemli bir kısmının tedavi edilmediği bilinmektedir [2,7,8,9].

İntihar eğilimi olanlar açısından en kolay intihar yollarından biri, elinde mevcut olan ilaçları yüksek dozda almaktır. Bazı hastaların bir süre ilaç kullanıp kısmen iyileştikten sonra intihar edecek gücü bulabilmesi, depresif bozuklukları tedavi eden tüm hekimlerin dikkat etmesi gereken bir konudur. Aşırı doz alımında öldürücü olabilen antidepresanlar için reçete verilirken en fazla on günlük doz yazılması aşırı dozdan ölümleri önleyebilir.

Türkiye'de antidepresan ilaçların reçetesiz satılması ve kolayca temin edilebilmesi de bu ilaçların öldürücü etkilerini bilen kişilerin elinde önemli bir intihar aracına dönüşmesini kolaylaştırmaktadır [10].

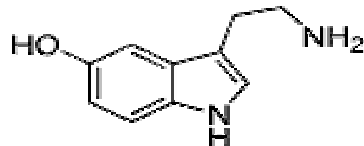
2.3. Serotonin

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) bağırsak mukozasında L-triptofandan sentezlenir. Kan triptofan seviyesi beyindeki serotonin sentezini etkileyen faktörlerden biridir. Triptofan miktarı ne kadar çok olursa beyinde serotonerjik nöronlar tarafından sentezlenen serotonin miktarı artar. Bu nedenle triptofan aminoasidinin fazlaca bulunduğu yiyecekler ile beslenme sonucu hemen serotoninin hemen orta derecedeki sedasyon etkisi ortaya çıkabilmektedir.

“Serotonin birçok fonksiyonu olmasına rağmen bunların çok küçük bir bölümünü bilmekteyiz. Bir nörotransmitterin bu denli geniş bir fonksiyonel yelpazeye sahip olması, insan zekasının gizemleri hakkında bize bilgi vermektedir.”

Bu cümleler serotoninini ilk kez izole eden ve fonksiyonlarına dair ilk spekülasyonları üreten I.H.Page tarafından 20 yıldan fazla bir süre önce yazılmıştır.

Serotonin, beyindeki mutluluk, acı, endişe, panik, uyku gibi aktiviteleri düzenleyen bir sinir-ileticidir (*neurotransmitter*) ve depresyon nedeni ile intihar eden kişilerde serotonin miktarının düşük olduğu gözlenmiştir [14].



Şekil 2.1: Serotonin molekülünün yapısı

Triptofanın hidroksilasyonu sonucu ortaya çıkan 5-Hidroksitriptofan, serotonine dönüşür. Postsinaptik reseptörler ile etkileşen serotonin dışında kalan sinaptik aralıktaki serotonin, serotonerjik nöron terminaline geri alınır. Bu geri alınım trisiklik antidepresanlar veya fluoksetin gibi atiptik antidepresanlar ile potent bir şekilde inhibe edilir. Serotonerjik nöron terminaline alınan serotonin Monoamin Oksidaz – A (MAO-A) enzimi ile katabolize edilir [12].

2.3.1. Serotonin Geri Alım İnhibitörleri:

Nöronlar tarafından serotonin geri alınımı (re-uptake) inhibe eden ilaçlar, antidepresör etki oluştururlar, fakat etki mekanizmaları tam olarak anlaşılmış değildir. Çünkü geri alınım inhibasyonu oluşturma etkileri hemen ortaya çıkmasına karşın antidepresör etkileri ancak 2-3 hafta sonra şekillenmektedir. Bu durum antidepresan etkilerinin ortaya çıkmasında karmaşık başka mekanizmaların da devreye girdiğini göstermektedir [14].

Serotonin geri alınım inhibitörleri depresyon dışında obsesif- kompulsif bozuklukların ve panik atakların tedavisinde de kullanılırlar. Bazılarının anoreksijen etkileride vardır. 5HT geri alınımının spesifik inhibitörleri, fluoksetin, fluvoksamin, paroksetin, sitalopram, sertralin ve trazodon'dur. Bu geri alınım inhibitörleri anglo-sakson literatüründe SSRI (selective serotonin re-uptake inhibitors) diye adlandırılırlar [12].

2.4 Fluoksetin

Fluoksetin 1987'de ABD'de ilk piyasaya çıkan Seçici Geri Alım İnhibitörü (SGAI)'dir. SGAİ ile ilgili çalışmaların çoğu fluoksetinle yapılmıştır. Majör depresyon, obsesif kompulsif bozukluk, bulimiya nevroza, adet öncesi sendromunda kullanımı için FDA onayı vardır. Distimide, panik bozuklukta, sosyal kaygı bozukluğunda, bipolar depresyonun tedavisinde, mevsimsel affektif bozuklukta, trikotillomanide, poststroke depresyonda, postmenapozal sıcak basmalarında, alkol ve sigara kesilmesinde ek tedavi olarak etkindir.

Fluoksetin, nöroleptikler ve trisiklik antidepresanlar gibi CYP2D6 enzimi tarafından metabolize edilir. Sözü edilen bu ilaçlar CYP2D6 enzimini inhibe eden ilaçlardır. Fluoksetin bu ilaçlarla birlikte kullanıldığında, CYP2D6 enzimi daha çok inhibe edileceğinden, uygulamada dikkatli olunmalıdır [15].

Fluoksetin, oral yolla büyük oranda emilir. Bir bölümü ilk geçiş metabolizmasına uğrar. Biyoyararlanımı %90 kadardır ve doza bağlı olarak artar. Emilimi, kapsül ve solüsyon formülasyonları yönünden önemli bir farklılık göstermez. Metaboliti norfluoksetin de güçlü bir geri alım inhibitörüdür. Dağılım hacmi, lipofilik diğer ilaçlar gibi çok geniştir.(14-100L/kg) Yüksek oranda karaciğerde metabolize olduğundan, karaciğer işlev bozukluğunda metabolizma etkilenir. Atılım iki kata dek yavaşlar. Bu nedenle karaciğer hastalarında dikkatle kullanılmalıdır. Ağır böbrek yetmezliğinde birikme olabileceği kabul edilmektedir. Bu nedenle doz azaltılmalıdır.

Fluoksetinin tek dozda yarı ömrü 48 saat iken, yineleyen uygulamalarda 4 güne dek uzar. Metabolitinin yarı ömrü, ana molekülünkinden uzundur. Bu süreler, fluoksetinin major metaboliti olan Norfluoksetinde 7-15 gün kadardır. Uzun süreli

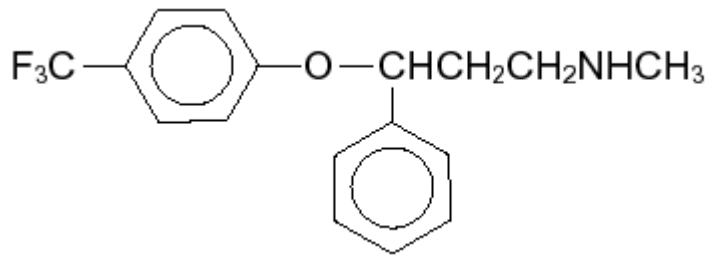
fluoksetin kullanımlarında, madde vücutta birikimlere neden olur ve haftalarca vücutta kalır. Bu, ilaca ara verme ya da başka ilaçlarla olan etkileşim gibi konularda göz önünde bulundurulması gereken bir durumdur. İlacın kesilmesi ile aktif ilacın vücuttan tamamen atılması 1-2 ay zaman alabilir. Bu nedenle yoksunluk belirtileri görülmez [17].Yüksek oranda idrarla, düşük oranda da dışkı atılır. %10 kadarı ise doğrudan glukronik asitle konjuge olarak atılır. 20-80 mg/gün dozlarında ve sabah tok karına alınması önerilmektedir [16].

Fluoksetin etken maddesini içeren ilaçlarla tedavi sırasında, güvenli yan etki profiline rağmen, seyrek, fakat şiddetli olabilen kanama vakaları bildirilmektedir. Fluoksetin kullanımı ile ekimoz, kanama ve diğer hematolojik sorunlar ortaya çıkabildiği gibi, burun kanamaları hatta bazı durumlarda kafa içi kanamaları da olabilmektedir [15]. Sinirlilik, uykusuzluk, gastrointestinal bozukluklar (bulantı, daire) ve baş ağrısı gibi kendine özgü bazı yan etkileri vardır. [16,17].

Diğer antidepresan ilaçlar gibi MAO inhibitörleri ile ve aşırı duyarlılığı olanlarda kullanılmamalıdır. Yarı ömrü uzun olduğundan fluoksetinden MAO inhibitörlerine geçerken 5-6 hafta beklenmesi önerilmektedir [15].

2.4.1 Fluoksetin' in Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Fluoksetin' in kimyasal formülü $C_{17}H_{18}F_3NO$ dur. Molekül ağırlığı 302,3 dur.Kimyasal adı: N metil 3 Fenil 3-($\alpha,\alpha,\alpha,$ - tri floro-p-tolioksi)propilamin



ŞEKİL 2.2: Fluoksetin'in kimyasal yapısı

Fiziksel Özellikleri:

Beyaz renkli,kristal yapılıdır.

Erime Sıcaklığı:

157.5-158.7° C sıcaklık aralığındadır.

Çözünürlük:

25° C de suda 50mg/ml, metanolde 250mg/ml, Kloroformda 125 mg/ml dir.

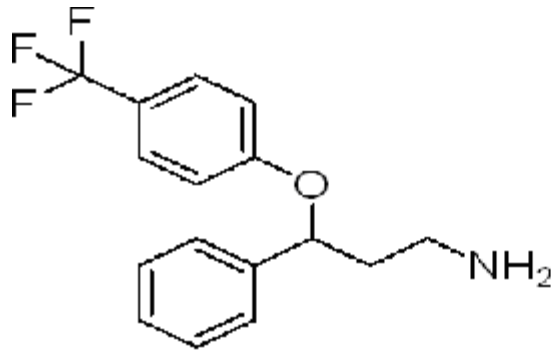
Heksan, etilasetat ve benzende çözünmez[16].

2.4.2 Norfluoksetin

Fluoksetinin en aktif metabolitidir.

Molekül Formülü: C₁₆H₁₆F₃NO

Molekül Ağırlığı: 295,26 [16].



Şekil 2.3: Norfluoksetin Molekül Yapısı

2.4.3 Fluoksetin ve Norfluoksetin İle İlgili Analiz Çalışmaları:

Fluoksetin etken maddesini içeren ilaçların kullanım sıklığı oldukça yüksektir. Bu nedenle de fluoksetinin biyolojik materyalden tayini ve uygulanacak analiz yöntemi, gerek klinik değerlerinin tespitinde, gerekse toksikolojik analizlerde önemlidir. Buna bağlı olarak, son yıllarda bu maddenin analiziyle ilgili çalışmaların sayısı hızla artmıştır. Yaptığımız literatür araştırmalarına göre, gerek formülasyonlarından, gerekse çeşitli biyolojik materyalden fluoksetin tayini için, yöntemler geliştirilmiştir. Nevado B., ve ark., farmasötik preparatlarından fluoksetin tayini için kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir [19]. Ertürk S., ve ark. insan plazmasında, floresans dedektör kullanarak HPLC yöntemi ile fluoksetin ve norfluoksetin tayini yapmışlardır [20]. Maurer H., ve ark., sistematik toksikolojik analiz amacıyla, içinde fluoksetininde yer aldığı SGAI grubu antidepresanların ve metabolitlerinin idrardan tayini için GC/MS yöntemi geliştirmişlerdir [21]. Fraser A.D., ve ark., cezalarını, Kanada'da, rehabilitasyon merkezinde, cezalarını tamamlamakta olan suçluların idrarlarında, EIA (Enzim İmmuno Assay) ve ELISA (Enzyme Linked İmmun Sorbent Assay) immünolojik yöntemleriyle yaptıkları tarama testlerinde, pozitif çıkan çeşitli psikotrop maddelerin yanısıra, fluoksetin ve benzeri antidepresanların bulgularını, GC-MS yöntemi kullanarak da doğrulamışlardır [22]. Öztunç A., ve ark., yeni bir türevlendirme reaktifi kullanarak, HPLC ve İTK yöntemleriyle, fluoksetin ve bazı antidepresanları plazmadan tayin etmişlerdir [23]. Nevado J.J.B., ve ark., SGAI grubundan sitalopram, fluoksetin ve metabolitlerinin GC-MS yöntemi ile tayinlerini yapmışlardır [24]. Daha önceki yıllarda Nash F.J., ve ark., fluoksetin ve norfluoksetinin plazmadan tayinini GC-ECD ile gerçekleştirilmişlerdir [25]. Wille S.M.R. ve ark., yeni jenerasyon antidepresanlar yanında fluoksetinin de plazmadan HPLC-DAD ve GC-MS yöntemi

ile tayinini yapmışlardır [26]. Güncel problemlerden biri olan, çevre kirliliği ile ilgili olarak, Roberts P.,ve ark. tarafından Oslo ve Paris Çevre Komisyonlarının listesinde yer alan ve yüzey sularına ve kanalizasyonlara karışan ilaç maddeleri ile ilgili olarak, HPLC/MS yöntemini uyguladıkları çalışmada, 7-34 ng/ml aralığında fluoksetine rastlanıldığını bildirmişlerdir [27].

2.5. Örnek Hazırlama

Örnek hazırlama, özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografi ve gaz kromatografi gibi teknikler ile gerçekleştirilecek analizler öncesinde tamamlanması gereken önemli bir basamaktır. Analitlerin deriştirilmesi ve kirli matrikslerde, örneğin saflaştırılması amacı ile yapılan bu işlem, ekstraksiyon ve gereğinde türevlendirme gibi aşamalardan oluşur [28].

2.5.1. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon, bir karışımdan bir bileşiği uygun bir çözücü ile ayırma işlemidir. Adli bilimlerde en sık kullanılan ekstraksiyon yöntemleri arasında sıvı-sıvı ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyon ve katı faz mikro-ekstraksiyon sayılabilir. Çalışmada kullanılan sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon yöntemleri aşağıda kısaca açıklanmıştır: [28,39].

2.5.1.1. Sıvı-Sıvı ekstraksiyonu:

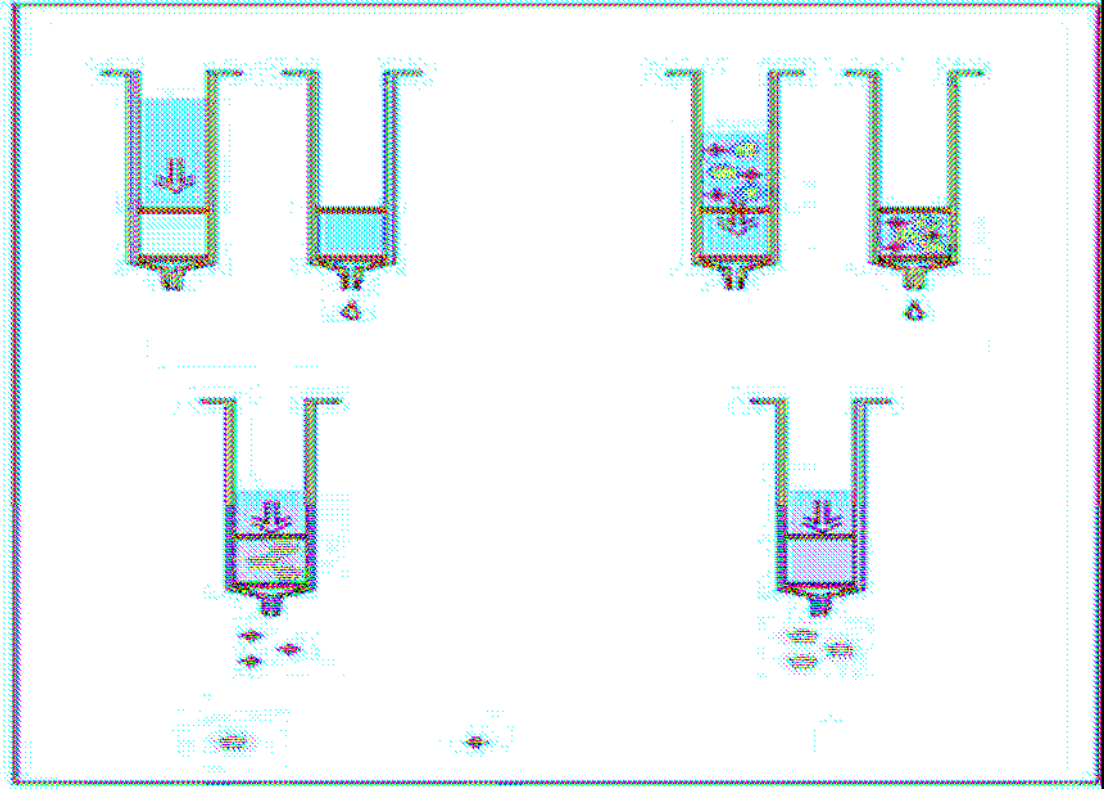
Günümüzde de, en temel ekstraksiyon yöntemi olan sıvı-sıvı ekstraksiyon “benzer benzeri çözer” ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde madde, organik ve sulu özellikteki sıvı çözücü fazlar arasındaki dağılımı kullanılarak, içinde bulunduğu ortamdan ayrılır. Bu yöntemin en büyük avantajı, değişik çözücü kombinasyonları ile neredeyse her tür ayırma işleminin gerçekleştirilebilmesidir. Ancak fazla miktarda çözücü harcanması ve işlemin genellikle çok zaman alması gibi maliyet ve verimi

etkileyen dezavantajları da vardır. Bu yöntem, otomasyona uygun olmayışı ve standardize edilmesindeki güçlükler nedeni ile özellikle adli bilimler alanında yerini katı faz ekstraksiyon ve katı faz mikro-ekstraksiyon gibi alternatiflerine terk etmektedir [28,29].

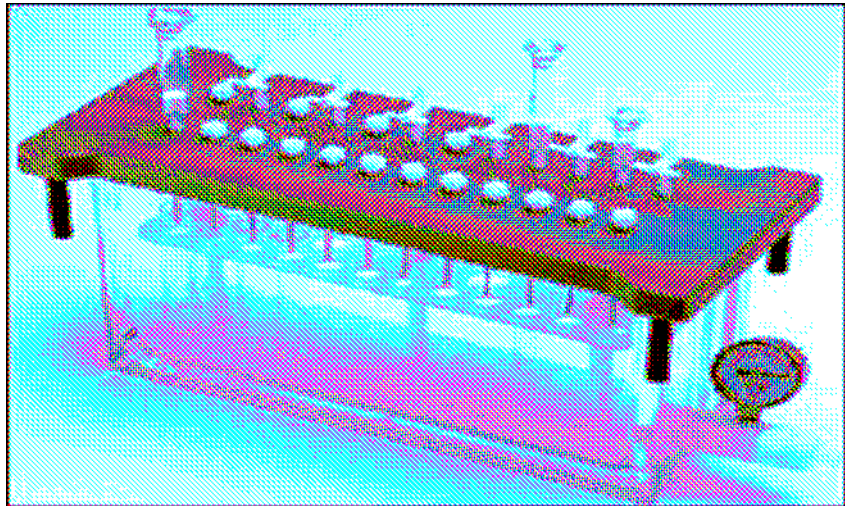
2.5.1.2. Katı-Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Katı faz ekstraksiyon (SPE: Solid Phase Extraction) yönteminde örnek, küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kolonlarından geçirilir. Kolonda bulunan özel dolgu maddesi, analiz edilecek bileşenlerin matriksten ayrılmasını sağlar. Bugün piyasada çok değişik özellikte dolgu maddeleri ile hazırlanmış SPE kolonları mevcuttur. Özellikle C₁₈, C₈ ve NH₂ adlı kolonlar adli analizlerde sıklıkla kullanılmaktadır.

Katı faz ekstraksiyon metodunda, kolondan geçirilme sırasında örnek molekülleri ile tutucu madde arasında kimyasal bir etkileşim meydana gelir. Temelde, analiz edilecek bileşik, dolgu maddesine bağlanarak, kolon içinde tutulurken, istenmeyen matriks bileşenleri, uygun yıkama çözeltileri ile uzaklaştırılırlar. Sonrasında, analiz edilecek bileşik kolondan uygun bir çözücü yardımıyla elüe edilerek alınır. Katı faz ekstraksiyon işlemine ait başlıca aşamalar Şekil 2.4'de ki şemada gösterilmiştir. Örnek ve çözücülerin kolondan geçişi, üstten basınç uygulama ile, santrifuj ile veya en yaygın olarak bir vakum manifolduna bağlı katı faz ekstraksiyon düzeneği yardımı ile(Şekil 2.5) gerçekleştirilir.



ŞEKİL2.4: SPE yöntemi ile maddelerin ayrılma şekilleri [29].



ŞEKİL 2.5: Vakum Manifoldu[29].

SPE metodu özellikle kolay bir şekilde standardize edilebilmesi ve az çözücü kullanılması açısından adli bilimlerde tercih edilen, pratik ve hızlı bir yöntemdir. Yüksek kolon maliyeti bu yöntemin başlıca dezavantajıdır.

2.6. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, karışımların ayrılmasında kullanılan en önemli tekniklerden olup, kalitatif ve kantitatif analize imkan sağlamaktadır. Çok geniş ve verimli bir alan olan kromatografinin temeli, Rus bilim adamı botanikçi Michael Tswett tarafından atılmıştır. Tswett yeşil yapraklardan elde ettiği çözeltiyi toz haldeki kalsiyum karbonat doldurulmuş cam bir kolondan geçirerek, çözeltilerde bulunan klorofil, ksantofil gibi renkli maddeleri kolonda ayırmayı başarmıştır. Sonuçta elde ettiği renkli tabakalardan esinlenerek yaptığı ayırmaya kromatografi adını vermiştir[31].

Genel olarak, ayırma işlemiyle bir madde, bulunduğu ortamdan kantitatif olarak başka bir ortama alınır. Maddenin kantitatif olarak alınmasının yanı sıra maddenin saf olarak da alınması önemlidir. Bu koşulları sağlayan ayırmalara **seçici ve spesifik ayırma** denir. Kromatografik metodlar seçici ve spesifik ayırmayı sağlar [30].

Kromatografi işlemi, bir karışımdaki maddelerin biri sabit diğeri hareketli faz arasında dağılması esasına dayanır. Devamlı olarak temasta olan bu iki faz birbirleri ile karışmaz. Sabit faz, ya poröz bir katı madde ya da katı bir destek maddesine emdirilmiş bir sıvı, hareketli faz ise sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan olabilir. Kromatografi sisteminde maddelerin hareketini sağlayan, bunları sürükleyen hareketli fazdır. Hareketli faz bir kolon içinde, ya normal yerçekimi kuvvetiyle veya

basınçla kolondaki sabit faz içinden geçirilir. Bu esnada hareketli fazda çözülmüş halde bulunan maddelerle, sabit faz arasında fiziksel ve kimyasal çekim kuvvetleri devreye girer. Bu çekim kuvvetleri her madde için ayrıdır. Sabit faz tarafından daha fazla adsorbe edilen veya daha fazla çözülen maddeler sistem içerisinde daha yavaş ilerlerken, sabit fazda daha az çözünen maddeler daha hızlı hareket ederler.

Kromatografi işlemi sırasında, madde moleküllerinin, fazlardan biri ile kovalent bağlanma durumu söz konusu değildir. Karışımdaki bileşenler, fazlardan birinde daha uzun süre kalacak şekilde iki faz arasında birçok kez geçiş yaparlar [30,31,32].

Kromatografide hareketli sıvı faz olarak, su dahil bütün organik çözücüler ve bu çözücülerin çeşitli oranlardaki karışımları kullanılabilir. Aynı zamanda gaz ve süperkritik çözücülerde hareketli faz olarak kullanılabilir.

Çeşitli kromatografik tekniklerde en çok kullanılan sabit fazlar; silika, alümina, kömür, florisil(magnezia-silika karışımı), kalsiyum karbonat ve kalsiyum oksit, magnezyum karbonat ve magnezyum oksit, kizelgurlar, diatome toprakları, poliamitler, nişasta, toz şeker ve talkdır [30].

Kromatografi işleminden çeşitli amaçlar için yararlanılmaktadır. Kimya, biyokimya ve biyoloji alanındaki çalışmalarda, organik ve anorganik karışımların ayrılması, maddelerin kalitatif analizi ile saf olup olmadığının kontrolü veya saflaştırılması, ilaç endüstrisinde hammadde ve imalat safhaları ürünleri ile ilaçların stabilite kontrolü işlemlerinde kromatografi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [30,31].

2.6.1 Kromatografi Sınıflandırması

2.6.1.1 Ayırmayı Sağlayan Kuvvete Göre [30]

Kromatografik ayırma işlemleri ayırmayı sağlayan kuvvete göre dört grupta toplanabilir:

- **Adsorpsiyon Kromatografisi:**

Hareketli faz, poröz bir katı veya çok ince bir toz olan sabit fazın üzerinden geçer. Ayrılacak maddelerin yürüme hızı, sabit faza karşı ilgilerine yani adsorbe edilme derecelerine bağlıdır. Madde sabit faz tarafından ne kadar kuvvetli adsorbe ediliyorsa o kadar yavaş ilerler.

Adsorpsiyon kromatografisi, kolay olması yanında etkili bir ayırma metodudur. Bu metot sayesinde izomerler, hidrokarbonlar, rasemler, hormonlar ve antibiyotikler kolaylıkla ayrılabilir.

Bu metodun dezavantajları da vardır. Bunlar: Sabit fazın, ayrılması beklenen maddeleri parçalaması ve aranan maddeler yerine başka maddelerin bulunması, sabit fazın ayrılan maddelerle kimyasal reaksiyon vermesi ve uygun sabit faz ve çözücü bulunabilmesi için bazen çok zaman harcanmasıdır.

- **Partisyon Kromatografisi:**

Sabit faz inert ve katı bir destek maddesi üzerine kaplanmış bir sıvıdır. Sıvı veya gaz olabilen hareketli faz, sabit faz ile kaplı destek maddesinin üzerinden geçer. Maddelerin, bu sistemdeki yürüme hızları, iki sıvı faz arasındaki bağlı çözünürlüklerine yani dağılma katsayılarına bağlıdır.

Sabit fazda daha çok çözünenler daha yavaş ilerlerken, hareketli fazda daha çok çözünenler daha hızlı ilerler.

- **İyon Değişirme Kromatografisi:**

Bu metotta, katı bir maddenin, yapısında bulunan iyonları, temasta bulunduğu çözelti içindeki başka iyonlarla bir dengeye göre değiştirmesi özelliğine dayanır. Bu amaçla kullanılan katı maddeler, çözelti ortamında hiç çözünmeyen büyük moleküllü doğal ve yapma maddelerdir. Bunlar inorganik ve organik diye ikiye ayrılır. İnorganik olanlar yaklaşık bir asırdır kullanılan killer ve zeolitlerdir. Organik olanlar ancak 1937'den beri kullanılmaktadır. Hem inorganik hem de organik iyon değiştiricilerde temasta buldukları çözültideki iyonlarla değiştirilebilecek pek çok sayıda iyon bulunur[30].

Sulu çözültide, yüklü iyonlar ile iyon değiştirici reçine temas ettiklerinde, iyon değiştiricinin fonksiyonel gruplarının yükleri ile iyonların yükleri arasında bir etkileşme oluşur. İyon değiştirici reçine kendisinin fonksiyonel grubu ile aynı yükü taşıyan iyonları iterken, zıt yüklü iyonları kendine bağlar. Bu yöntemde reçine tanecikleri sabit fazı, geçirilen çözücü ise hareketli fazı oluşturmaktadır[31].

- **Jel Geçirgenlik Kromatografisi:**

Bu yöntemde, maddeler molekül büyüklüklerindeki farklılığa göre ayrılırlar. Ağsı yapılı polimer materyalde, maddeler molekül büyüklüklerine bağlı olarak, ağsı yapıya girme derecelerine göre birbirinden ayrılırlar. Küçük moleküller tanecikler arasındaki boşluklara girebildiklerinden ilerlemeleri gecikirken, büyük moleküller bu boşluklara giremez ve kolayca ilerlerler [30]

2.6.1.2.Kullanılan Düzeneğe Göre [32]

Kromatografik ayırma işlemleri ayırmada kullanılan düzeneğe göre de sınıflandırılabilirler.

- 1- İnce tabaka kromatografisi
- 2- Kağıt kromatografisi
- 3-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi(HPLC)
- 4-Gaz kromatografisi

▪ İnce Tabaka Kromatografisi:

Bu yöntemde, kromatografi işlemi cam, alüminyum veya plastik bir yüzey üzerine kaplanmış bir adsorban tabakasında gerçekleşir. Yürütme tankındaki hareketli faz, adsorban tabakası üzerinde aşağıdan yukarıya doğru ilerler [31].

Adsorblayıcı tabaka seçiminde ayrılması beklenen maddelerin asidik veya bazik karakterli olması dikkate alınır. Genellikle asidik karakterli maddeler için asidik adsorblayıcılar(silikajel), bazik karakterli maddeler için de, bazik adsorblayıcılar (alüminyum oksit, talk gibi) tercih edilir.

İyi bir adsorblayıcıda aranan başlıca özellikler şöyle sıralanabilir[30]:

- Oldukça çok miktarda madde adsorblayabilmeli
- Üzerinde adsorbe olmuş madde başka çözücüler kullanılarak kolaylıkla geriye alınabilmeli
- Ayrılacak maddelerle ve çözücülerle kimyasal reaksiyona girmemeli
- Renklendirme ayıraçlarıyla reaksiyona girmemeli
- Yapısı çözücünün rahatlıkla geçmesine elverişli olmalı[30].

- **Kağıt Kromatografisi:**

Bu metotta sabit faz olarak özel üretilmiş kağıt kullanılır. Kağıt üzerine uygulanan karışım, bir yürütme tankı içerisinde, hareketli faz, kağıdın örnek uygulanan kenarından karşı kenarına ulaşana kadar beklenerek ayrılır. Çözücü, kağıt üzerinde kapiler etki ile ilerlerken karışımdaki maddeler özelliklerine göre ayrılma gösterir. Bu metotta hareketli faz seçimi yapılırken dikkate edilecek en önemli noktalardan biri, suyla çok az karışan bir çözücü olması gerektiğidir[31].

- **Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi:**

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, sıcaklığa hassas olan maddelere de uygulanabilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir.

Ayrılacak karışım, sisteme bir enjektör yardımıyla verilir ve sıvı hareketli faz ile, kolondan basınç altında geçirilir. Numune bileşenleri sabit veya hareketli faza olan ilgilerine ayrı ayrı bandlara ayrılır. Bu bandlar kolon boyunca ilerler ve dedektörden geçer. Dedektör bir kaydediciye bağlıdır ve kolondan çıkan her bileşen, pikler halinde çizilir. Piklerin çıkış zamanı alıkonma zamanı olarak tanımlanır[32].

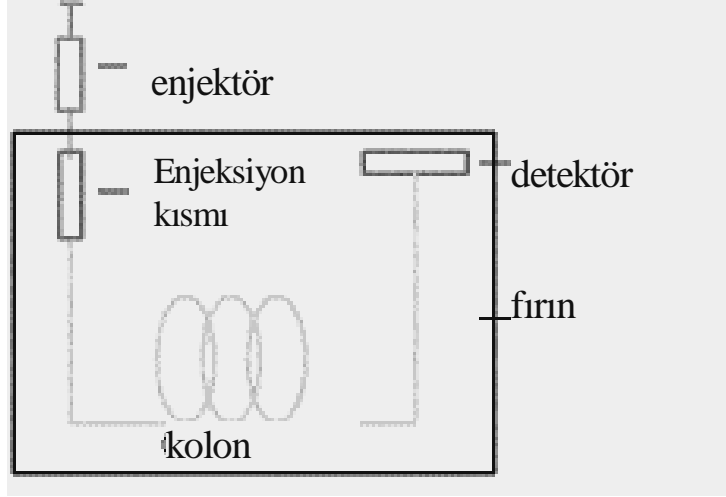
Metodun uygulanabildiği başlıca bileşikler ise nükleik asitler, terpenoitler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, proteinler, amino asitler, ilaçlar, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, metal organik bileşikler vb. dir [30].

2.6.2. Gaz Kromatografisi:

Gaz kromatografisi uçucu veya uçucu hale getirilebilen organik maddelerin analizinde kullanılan bir tekniktir. Bugün üretilebilen sabit fazların, dayanabileceği maksimum sıcaklık yaklaşık 500°C olduğundan, kaynama dereceleri bu sıcaklığa kadar olan bileşikler analiz edilebilir. Öteki kromatografik yöntemlerin aksine gaz kromatografisinde analiz edilen maddeler ile hareketli faz arasında hiçbir etkileşme olmaz [30,31,32].

Gaz kromatografisinde ayrılacak karışım, kolon girişinde bulunan enjeksiyon kısmında, bir enjektör yardımıyla kolona verilir. Burası ısıtılmış durumdadır, karışım burada hemen buharlaşır ve taşıyıcı gaz yardımıyla kolona girer. Kolonda her bileşik, sabit fazdan taşıyıcı faza ve taşıyıcı fazdan sabit faza farklı hızlarda göç ederek, devamlı taşınırlar ve böylece birbirlerinden ayrılarak, farklı zamanlarda kolondan çıkarlar. Kolonun sonuna konan uygun bir dedektörle tespit edilerek miktarlarıyla orantılı olarak kaydedilirler.

Gaz Kromatografisi cihazı temel olarak numune enjeksiyon bölgesi, kolon fırını, ayırma kolonu, dedektör ve veri toplama bölümlerinden oluşur (Şekil 2.6) [30].



Şekil 2.6: Bir gaz kromatografisi cihazının temel bölümleri[33].

▪ Örneğin Gaz Kromatografisi İçin Hazırlanması[32]

Ayrılacak karışımın, sabit fazla etkileşmesinden dolayı, piklerde kuyruklanma görülebileceği gibi, alıkonma zamanlarının uzamasına, örneğin, kolonda, ısıyla parçalanmasına neden olabilir. En büyük güçlükler, karboksi, hidroksi, amino ve imino grupları içeren bileşiklerin analizinde yaşanmaktadır. İstenmeyen bu gibi durumlar, örneğin, daha uçucu ve daha az polar türevlerine dönüştürülmesiyle giderilir. Bu türevler piklerin tanınmasında da yararlıdır. En yaygın kullanılan türevlendirme şekilleri, sililleme, esterleştirme ve asetillemedir.

Sililleme[34]: Alkoller, fenoller, steroidler, karbonhidratlar, aminoalkoller, aminoasitlerin trimetilsilil türevleri yapılır ve böylece uçucu hale getirilerek GC ile ayrılırlar. Bunun için trimetilklorasilan(TMCS), heksametildisilazan(HMDS), N-trimetilsilil dietilamin(TMDA), N,O-bis (trimetilsilil) asetamid(BSA) ve N,O

bis(trimetilsilil) trifluoroasetamid(BSTFA) kullanılır. Piridin, reaksiyonu katalizlediği için çözücü olarak kullanılır.

Esterleştirme[34]: Asidik bileşiklerin gaz kromatografisi analizinde uçuculuğunu arttırmak ve asidik grubu diğer reaksiyonlardan korumak için esterleştirme uygulanır. Esterleştirme yöntemleri olarak; BF₃-Metanol yöntemi, Diazometan yöntemi, HCl veya H₂SO₄-Metanol yöntemi ve tetrametil amonyum tuzu yöntemi kullanılır.

Asetil türevleri oluşturma[34]: Asetilleme, alkol ve fenol hidroksil grubu içeren maddelere veya primer veya sekonder amin grubu içeren maddelere tatbik edilebilir. Bu yöntemde genel olarak, asetik anhidrid veya asetil klorür, türevlendirme reaktifi olarak kullanılır.

Kromatografik Sistem

Gaz kromatografi sistemi Şekil 2.6'de görülen temel bölümlerden oluşur:

Taşıyıcı Gaz: Gaz Kromatografisinde, mobil faz olarak taşıyıcı gaz kullanılır. Taşıyıcı gazın görevi, maddeleri sürüklemektir. Uygun bir taşıyıcı gazda şu şartlar aranır:

- Ayrılacak bileşikle ve sabit fazla reaksiyona girmemeli
- Gaz difüzyonunu en düşük düzeyde tutabilmeli
- Saf, kolay bulunabilir ve ucuz olmalı
- Kullanılan dedektöre uygun olmalı

Mobil faz olarak helyum, azot ve argon gibi inert gazlar kullanılır. Kolon verimliliği, taşıyıcı gazın hızına bağlıdır. Kapiler gaz kromatografisinde, en çok

tercih edilen taşıyıcı gaz olan helyumun başlıca avantajları yanıcı olmaması ve çok sayıda dedektörle çalışılabilmesidir [30,31].

Enjeksiyon Bölümü: Yüksek sıcaklıkta tutulan bu bölümde çözelti, sıvı ya da gaz halindeki örnek, bir enjektör kullanılarak, manüel olarak veya oto örnekleyici ile sisteme verilir. Örnek buradan taşıyıcı gaz akışı ile kolona geçer [31].

Kolon: Cam veya metal boru gibi sabit katı bir desteğin iç çeperine kaplanmış özel bir polimerden oluşan yapıya kolon adı verilir. Ayırma işleminin gerçekleştiği kolon, kromatografik sistemlerin en önemli kısmıdır. Bir ayırmanın başarılı olması büyük ölçüde uygun kolon seçimine bağlıdır. Gaz kromatografisinde dolgu ve kapiler kolon olmak üzere iki tip kolon kullanılmaktadır.

Dedektör[30]:Gaz kromatografisinde farklı dedektörler kullanılabilir. Başlıca dedektörler şunlardır:

- Termal iletkenlik dedektörü(Thermal conductivity detector,TCD)
- Elektron yakalama dedektörü(Electron capture dedector, ECD)
- Alev iyonlaşma dedektörü(Flame ionization detector,FID)
- Kütle seçici detektör(Mass selective detector,MSD).

2.7. Kütle Seçici Dedektör(MSD):

Kütle spektrometresi gibi özel olarak üretilen sistemler, gaz kromatografla (ve HPLC sistemleri ile) birlikte dedektör olarak kullanılmaktadır.

Kütle dedektörü, gaz kromatograftan gelen örnekleri gaz halinde yüklü ve hareketli iyonlarına dönüştürerek, bunları **kütle/yük** oranlarına göre ayırır ve elde edilen spektrum maddenin teşhis ve tayinini sağlar. Burada yüklü bir parçacığın kütlesi **m**, yükü de **z**'dir. Bir maddeden m/z oranları birbirinden farklı birçok

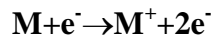
parçacık meydana gelebilir. Cihaz, m/z değerleri aynı olan tanecik demetleri için birer pik çizer[30].

Oluşan iyonlar parçalanarak “parçalanma ürünlerini” oluştururlar. Parçalanma ürünleri kütle seçici analizörden geçerken m/z oranlarına göre ayrılır, çoğaltılırlar ve sayılırlar ve böylece ilgili maddeye ait kütle spektrumu oluşturulur.

Kütle Spektrumları, bağıl bolluk ve m/z değerleri arasında çizilen grafiklerdir. Kısmen basit bileşiklerin spektrumlarında bile, farklı yükseklikte çok sayıda pik görülür. Piklerin sayısı; bileşiğin yapısına, iyonlaşma potansiyeline ve kullanılan cihazın yapısına bağlıdır[30].

İyonlaştırma, kütle spektrometrisinin önemli aşamalarından biridir. Değişik iyonlaştırma şekilleri kullanılır. Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi sistemlerinde en sık kullanılan iki yöntem elektron impakt iyonizasyonu ve kimyasal iyonizasyondur[30].

Çalışmamızda uyguladığımız iyonlaştırma tekniği elektron impakt iyonizasyonudur. Bu teknikte, moleküller, bir tungsten flamanın oluşturduğu yüksek enerjili(70eV) elektronlar tarafından bombardıman edilir. Çarpışma sonucunda molekülden bir elektron kopar. Bu şekilde oluşan iyon moleküler iyon (M^+) adı verilir:



Moleküler iyon, devam eden elektron bombardımanı altında daha da parçalanarak, parçalanma iyonları adı verilen, daha düşük m/z oranına sahip iyonlara bölünür. EI modunda oluşan iyonların çok büyük bir kısmı pozitif yüklüdür. Bu parçalanma ürünlerinden elde edilen kütle spektrumu, belli şartlar altında analiz edilen, her madde için tipiktir, molekülün parmak izi olarak değerlendirilir. Negatif

yüklü parçalanma ürünleri az sayıda ve küçük olduğundan molekül hakkında fazla bilgi sağlayamazlar. Elde edilen kütle spektrumu, ticari olarak hazırlanmış dijital kütle spektrumu kütüphaneleri ile karşılaştırılarak, parçalanma mekanizmalarının değerlendirilmesi yolu ile molekülün yapısı belirlenebilir. Elektron impakt iyonizasyon, uçucu ve ısıya dayanıklı, düşük molekül ağırlıklı maddelerin kütle analizlerinde en sık kullanılan yöntemdir.

Kütle spektrometrisi, kalitatif ve kantitatif analizler dışında yapı aydınlatılması, molekül ağırlığı tayini, izotop ve izotop oranları tayini vb. amacıyla kullanılmaktadır. Adli bilimler, sağlık bilimleri, çevre bilimleri bu yöntemin başlıca uygulama alanlarındandır [31].

2.8. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi(GC-MS) Sistemi:

Yukarıda sözü edilen gaz kromatografi ve kütle seçici dedektör sistemlerinin bir araya getirilmesi ile oluşturulan GC-MS, bir adli laboratuarda nicel ve nitel analizler için başvurulan en temel cihazdır (Şekil 2.7). Kan, idrar, doku, kıl vb. biyolojik matrislerde düşük miktarda bulunan maddelerin tespitinde oldukça sık kullanılır. Analiz edilecek maddenin uçucu olması veya uçucu bir türevine dönüştürülmesi gerekir [32].



Şekil 2.7: GC-MS sistemi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler

- Fluoksetin HCl(Sigma, Abdi İbrahim İlaç San.Tic.A.Ş)
- Norfluoksetin HCl(Sigma)
- Maprotilin HCl (İç standard,Novartis İlaç San.Tic. A.Ş.)
- Metanol(Merck)
- Hekzan(Merck)
- Etil Asetat(Merck)
- Piridin(Merck)
- İsoopropanol(Merck)
- Amonyak(Merck)
- Diklormetan(Merck)
- Asetik Anhidrid(Merck)
- Helyum
- Azot

3.2.Gereçler ve Sarf Malzemeler

- Gaz Kromatografisi(Agilent 6890 N GC system)
- HP 5 MS %5 Fenil Metil Silikon(30 m x250 µm x 0.25µm) Kolon
- Kütle Spektroskopisi(Agilent 5975 B Inert XL EI/CI MSD)
- Vorteks(IKA Yellow Line)

- Santrifüj (Universal 320 R)
- Etüv(Termal Laboratuar Aletleri)
- Elektronik Hassas Terazî(Precisa)
- SPE Düzenegî(J.T. Baker SPE 12 G)
- SPE Kartuşları
- Mikro Pipet(5-50µl,50-200µl,100-1000µl)
- İdrar Kabı
- Kapaklı Eppendorf Tüp(0.5-1.5ml)
- Beher(25-50-100ml)
- Balon Joje(5-10-20-50-100ml)
- Cam tüp(5ml)
- Kapaklı FalkonTüp(100ml)
- Cam Pipet(20ml, 10ml, 5ml, 2ml, 1ml)
- Kapaklı Santrifüj Tüpü(15ml)

3.3 Örnekleme

Fluoksetin etken maddesini kullanan 15 gönüllüden idrar örnekleri toplandı. Fluoksetin etken maddesini kullanmadığını beyan eden gönüllü kişilerden kontrol ve çalışma örnekleri elde edildi. Tüm idrar örnekleri kapaklı, sızdırmaz ve steril idrar kaplarına alınarak analiz edilene kadar +4°C’de saklandı.

3.4. Kullanılan Çözeltiler

Stok ve Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

Firmadan temin edilen standard maddelerin, sertifikalarında bildirilen saflıkları, temel alınarak stok çözeltilerdeki madde konsantrasyonları hesaplandı. Ana stok çözeltilerden Fluoksetin çözeltisi 1 g/100ml, norfluoksetin HCl çözeltisi 2mg/10ml de ve iç standard olan maprotilin çözeltisi 5mg/5ml de olacak şekilde metanolde hazırlandı. Fluoksetin ve norfluoksetine ait çalışma çözeltileri 0-500ng/ml aralığında her hafta başında taze olarak hazırlandı. Maprotilin çalışma çözeltisi stok çözeltiden alınıp metanolde seyreltilerek 100ng/µl konsantrasyonda hazırlandı. Tüm çözeltiler +4°Cde ışık almayacak şekilde saklandı ve kullanmadan önce oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

Ekstraksiyon ve Türevlendirme için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

0.1 M NaH₂PO₄ Çözeltisinin Hazırlanması: 12g NaH₂PO₄ litrelik balonjoje de bidistile suda çözülerek, 1000ml'ye tamamlandı.

0.1 M Na₂HPO₄ Çözeltisinin Hazırlanması: 22,8 gr Na₂HPO₄ litrelik balonjojede bidistile suda çözülerek, 1000ml'ye tamamlandı.

0.1 M Fosfat Tamponu(pH=6) çözeltisinin Hazırlanması:21ml Na₂HPO₄ ve 79 ml NaH₂PO₄ 100ml'lik balon joje de hazırlandı.

Sıvı-sıvı Ekstraksiyon Çözeltisinin Hazırlanması: 1ml diklormetan, 1ml isopropanol ve 3 ml etilasetat karışımı, kullanımdan önce taze hazırlandı.

SPE Yöntemi İçin Koşullama Çözeltisi Hazırlanması: 10ml'lik balon jojede 3ml metanol ve 7 ml bidestile su karışımı hacmine seyreltildi.

0.1 M Asetik Asit Çözeltisinin Hazırlanması: 6ml asetik asit 1000ml'ye bidestile su ile hacmine tamamlandı.

Elüsyon Çözeltisinin Hazırlanması: 2ml isopropanol, 0.2 ml amonyak ve 7.8 ml diklormetan karışımı günlük olarak hazırlandı.

Türevlendirme Çözeltisinin Hazırlanması: Tek bir örneğin türevlendirilmesi için gereken 15µl asetik anhidrid ve 10 µl piridin ependorfta hazırlandı.

3.5 Örnek Hazırlama

3.5.1 Ekstraksiyon

Çalışmamızda iki farklı ekstraksiyon yöntemi denenmiştir. Bunlar sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve katı-faz ekstraksiyonudur. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çalışma çözeltileri, fluoksetin kullanmayan gönüllülerden alınan idrar örneklerine ana stok çözeltilerinden katım yapılarak çalışıldı.

3.5.1.1.Sıvı-Sıvı ekstraksiyonu

Maurer ve ark., nin yöntemi değiştirilerek uygulandı. Toplam 5 ml idrar örneği santrifuj tüpüne alındı. 50µl IS çözeltisi eklendi. 1dk boyunca vortekslendi. Toplam 5ml ekstraksiyon çözeltisi ile ekstrakte edildi. Organik faz eppendorf tüpe alındı Organik faz azot akımı altında uçuruldu.

3.5.1.2.Katı-Faz Ekstraksiyonu

Nevado ve arkadaşlarının yöntemi değiştirilerek uygulandı. 5 ml idrar örneği santrifuj tüpüne alındı. 50µl IS eklendi. 1dk boyunca vortekslendi. SPE kartuşu düzeneğe yerleştirildi. Kartuş 3ml koşullandırma çözeltisi ile şartlandırıldı. 1ml 0.1 M Fosfat tamponu kartuştan geçirildi. Hazırlanan IS' li idrar örneği kartuştan geçirildi. Yıkama çözeltileri olarak sırasıyla, 3ml hekzan, 1ml 0.1 M asetik asit ve 3ml etil asetat kartuştan geçirildi. Kartuş 3000min⁻¹ de 10 dk süre ile 25°C de santrifuj edilerek tekrar SPE takıldı. Elüsyon çözeltisi

(Diklormetan,amonyak,isopropanol) geçirilerek çözelti temiz bir cam tüpe alındı. Çözelti azot akımı altında uçuruldu.

3.5.2.Türevlendirme

Ekstrakte edilen ve azot altında uçurulan örneklerin üzerine türevlendirme çözeltisi 25µl (asetik anhidrid/piridin;15/10,v/v) eklendi. Etüvde 80°C'de 60 dk inkübe edildi. Azot akımı altında uçurulduktan sonra 100µl metanol eklendi. 4000min⁻¹'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi. GC-MS ile analiz edildi.

3.6 GC-MS Analizi

GC sistem parametreleri

- **Kolon:** HP 5MS %5 Fenil metil silikon(30m x 0.25mm x 0.25µm)
- **Taşıyıcı gaz:** Yüksek saflıkta helyum gazı
- **Gaz akış hızı:** 1ml/dk
- **Enjeksiyon hacmi:** 1µl
- **Enjeksiyon port sıcaklığı:** 280
- **Fırın sıcaklık programı:**

100°C -3dk

279°C (50°C/dk) – 0,5dk

280°C (0,5°C/dk) - 5dk

310°C(50°C/dk) - 7dk

MS sistem parametreleri

- Full scan mod(kütle aralığı 40-550amu)
- İyonizasyon enerjisi: 70eV
- İyon kaynağı sıcaklığı:150°C

3.7.Kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi:

Sıvı-sıvı ekstraksiyon ve SPE yöntemi için hazırlanan çalışma çözeltilerinin her konsantrasyonu 3 kez hazırlandı, 3 kez enjeksiyonu yapıldı ve bulunan değerlerin ortalaması alındı.

Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Yöntemi için Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi:

Fluoksetin ve norfluoksetinin, konsantrasyonları 0-100-150-200-250-300-350-400-450-500ng/ml olacak şekilde, stok çözeltilerinden metanol ile seyreltilerek hazırlanan çalışma çözeltileri, fluoksetin etken maddesini kullanmayan kişilerden alınan idrar örneklerine katıldı. Her birine bölüm 3.5.1.1. de bahsedildiği şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi uygulandı. Bölüm 3.5.2'de anlatıldığı şekilde türevlendirildi ve örnekler, GC-MS sistemine enjekte edildi. Bu çalışma sonuçları değerlendirildi ve konsantrasyon aralıkları daraltılarak çalışmalar sürdürüldü.

SPE Yöntemi için Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi:

Fluoksetin ve norfluoksetinin, konsantrasyonları 0-100-150-200-250-300-350-400-450-500ng/ml olacak şekilde, stok çözeltilerinden metanol ile seyreltilerek hazırlanan çalışma çözeltileri, fluoksetin etken maddesini kullanmayan kişilerden alınan idrar örneklerine katıldı. Her birine bölüm 3.5.1.2. de bahsedildiği şekilde SPE tekniği uygulandı. Bölüm 3.5.2'de bahsedildiği şekilde türevlendirildi ve örnekler,

GC-MS sistemine enjekte edildi. Bu çalışma sonuçları değerlendirildi ve konsantrasyon aralıkları daraltılarak çalışmalar sürdürüldü.

3.8. Geri Kazanım Deneyleri

Sıvı-sıvı Ekstraksiyonu

Geri kazanım deneyleri için, 5ml idrara Fluoksetin ve norfluoksetinin 50 ng konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri eşit miktarda katıldı. İlk uygulamada fluoksetin, norfluoksetin ve IS çözeltileri idrara, ekstraksiyondan önce, ikinci uygulamada ise ekstraksiyondan sonra katıldı. Örnekler bölüm 3.5.1.1'de açıklanan şekilde ekstrakte ve bölüm 3.5.2'de açıklanan şekilde türevlendirildi. Geri kazanım deneyleri için hazırlanan çalışma çözeltilerinin her konsantrasyonu 3 kez hazırlandı, 3 kez enjeksiyon yapıldı. Bulunan değerlerin ortalaması alındı.

SPE Yöntemi

Geri kazanım deneyleri için, 5ml idrara Fluoksetin ve norfluoksetinin 50 ve 25 ng konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri eşit miktarda katıldı. İlk uygulamada fluoksetin, norfluoksetin ve IS çözeltileri idrara, ekstraksiyondan önce, ikinci uygulamada ise ekstraksiyondan sonra katıldı. Örnekler bölüm 3.5.1.2'de açıklanan şekilde ekstrakte ve bölüm 3.5.2'de açıklanan şekilde türevlendirildi. Geri kazanım deneyleri için hazırlanan çalışma çözeltilerinin her konsantrasyonu 3 kez hazırlandı, 3 kez enjeksiyon yapıldı. Bulunan değerlerin ortalaması alındı.

3.9. Hasta ve Kontrol Örneklerinin Analizi

Hasta ve kontrol grubu örnekleri bölüm 3.5 de açıklanan yöntemler ile hazırlandı ve bölüm 3.6'daki GC-MS koşullarında analiz edildi.

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, SPE yönteminin, sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemine göre, daha üstün olduğu gözlemlendi ve hasta örnekleri, SPE yöntemi ile analiz edildi.

4.BULGULAR

Kullanılan sistem parametrelerinde, fluoksetin, norfluoksetin ve iç standardın (maprotilin) alıkonma süreleri ve başlıca m/z değerleri Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.1: Fluoksetin, Norfluoksetin ve iç standardın alıkonma süreleri.

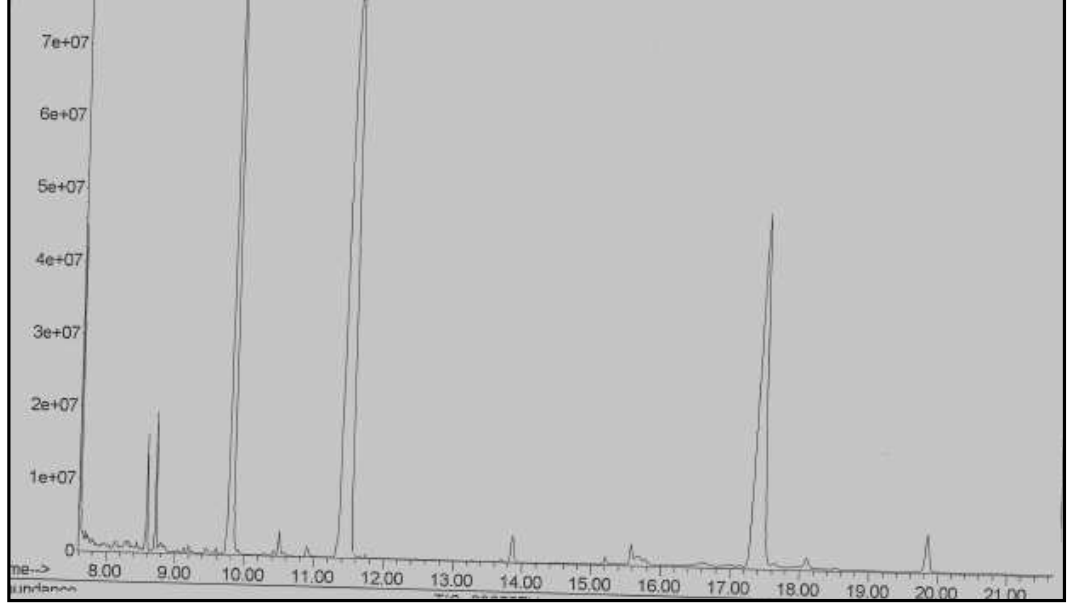
GC-MS de Alıkonma Süreleri(dk)	
Norfluoksetin	7.9
Fluoksetin	8.1
İç Standard	11.7

Tablo 4.2: Fluoksetin, norfluoksetin ve iç standardın MS iyonları

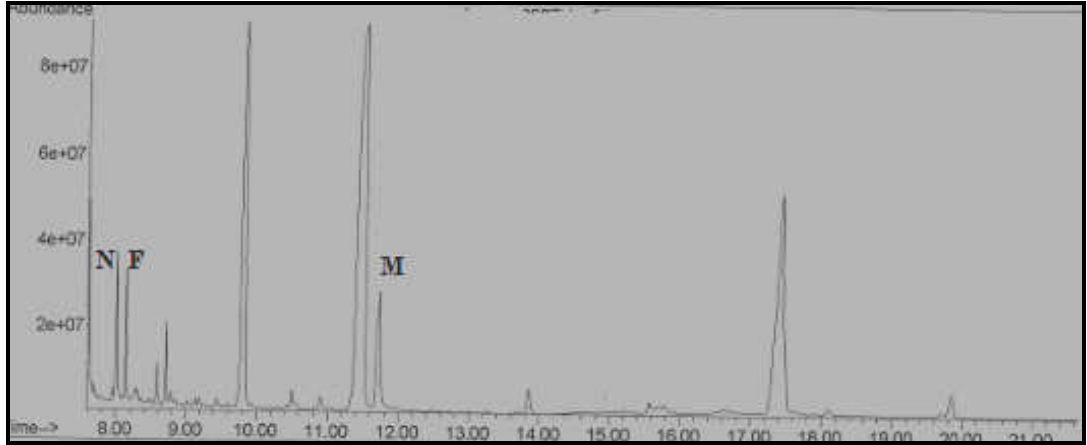
MS Spektrumundaki İyonları(m/z)
Fluoksetin AC 86⁺, 44⁺, 190⁺, 117⁺
Norfluoksetin AC 176⁺,117⁺,72⁺,43⁺
Maprotilin AC 291.1⁺, 218⁺, 191⁺, 203⁺, 100⁺

Kontrol idrarına ait kromatogram Şekil 4.1’de, katım yapılmış olan idrar örneğine ait kromatogram Şekil 4.2’de ve bu kromatogramdaki fluoksetin,

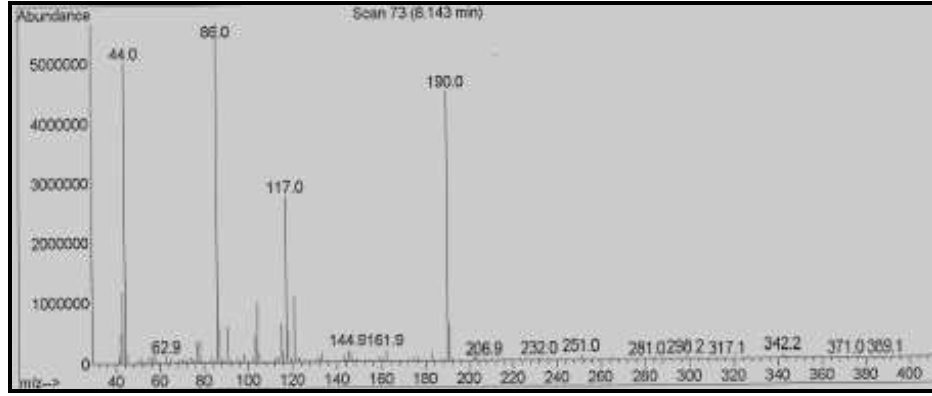
norfluoksetin ve iç standard maprotiline ait kütle spektrumları Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’de verilmiştir.



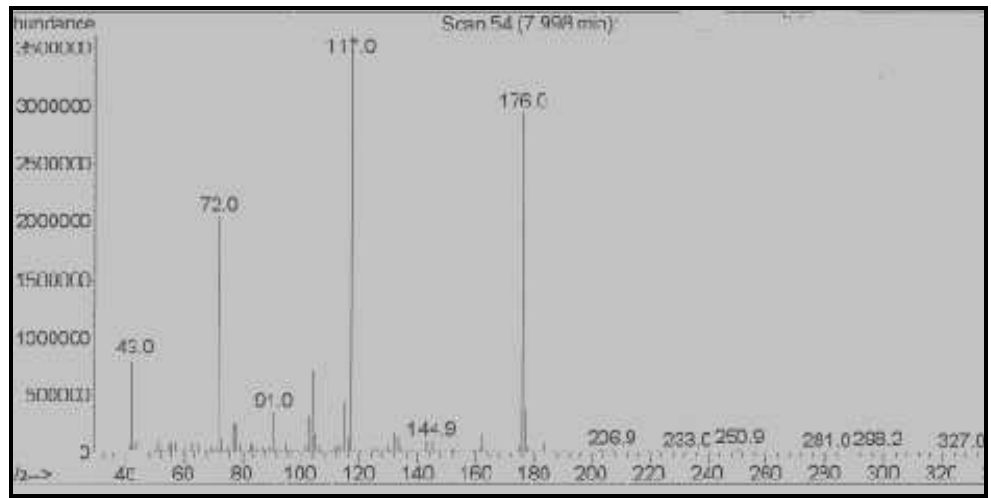
Şekil 4.1: Kontrol grubuna ait blank idrar kromatogramı



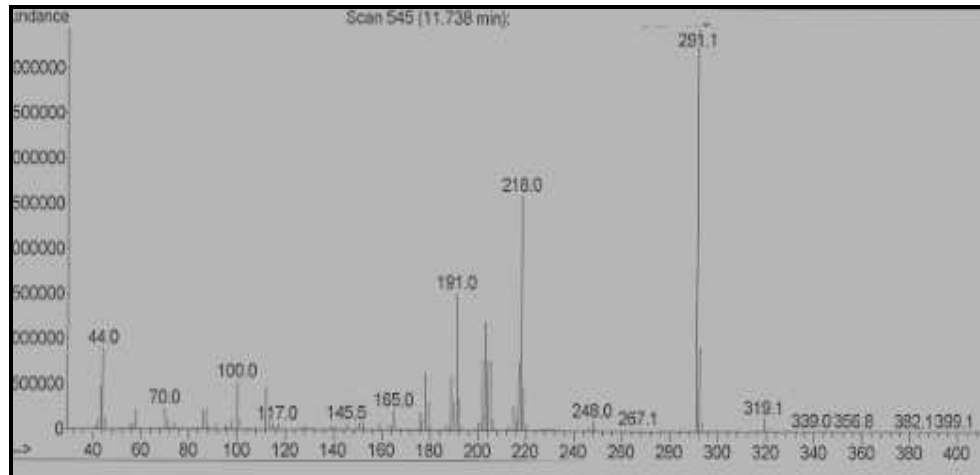
Şekil4.2:Katım yapılmış olan kontrol grubuna ait idrar kromatogramı



Şekil4.3: Fluoksetine ait kütle spektrumu

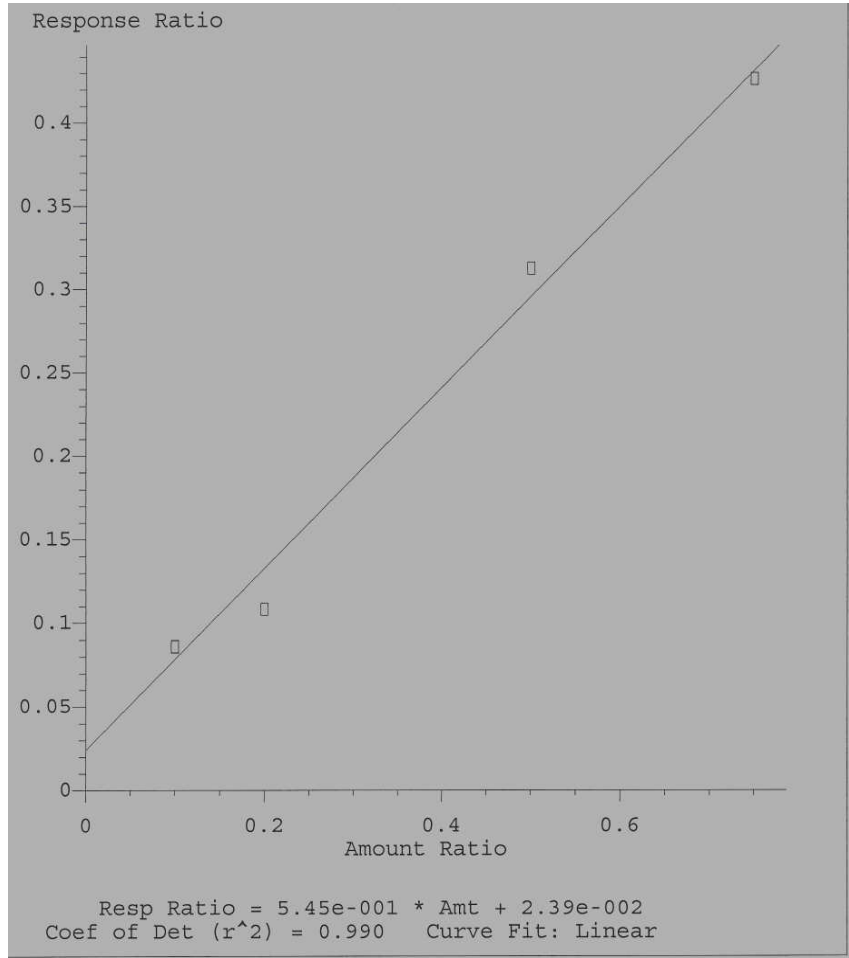


Şekil4.4: Norfluoksetine ait kütle spektrumu



Şekil4.5: Maprotiline ait kütle spektrumu

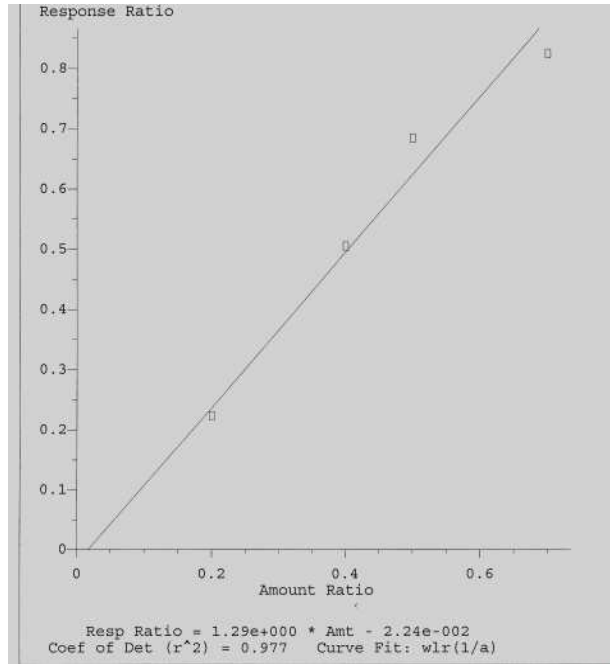
Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde **Fluoksetin** için tayin sınırı 10ng/ml olarak saptandı. GC-MS analizinde, sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde fluoksetin için 10-80 ng/ml idrar konsantrasyon aralığının doğrusal olduğu görülmüştür. Bu aralıkta, fluoksetin için korelasyon katsayısı $R^2 = 0.990$, kalibrasyon eğrisinin denklemi $y = 0.54x - 0.023$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Fluoksetinin sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi

Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde **norfluoksetin** için de, tayin sınırı 10ng/ml olarak saptandı. GC-MS analizinde, sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde, fluoksetinde olduğu gibi, norfluoksetin için de, 10-80 ng/ml idrar konsantrasyon

aralığının doğrusal olduğu görülmüştür. Bu aralıkta, norfluoksetin için korelasyon katsayısı $R^2 = 0.977$, kalibrasyon eğrisinin denklemi $y = 1.29x - 0.024$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7).



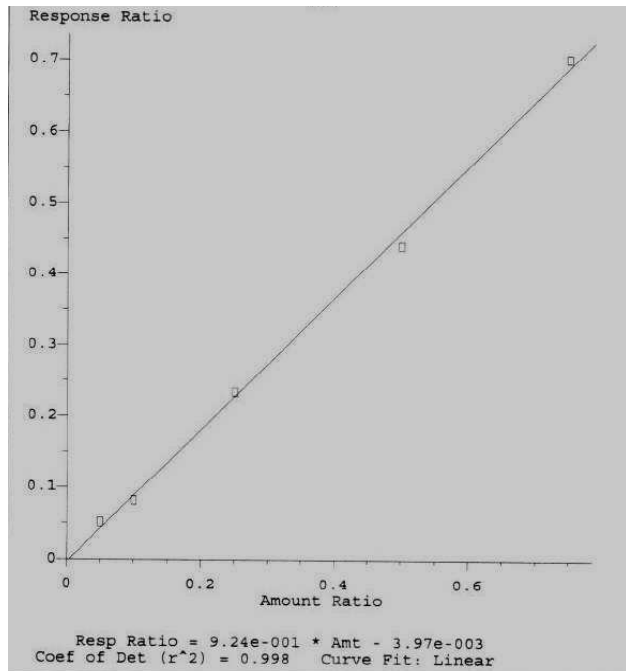
Şekil4.7: Norfluoksetinin sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi

Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin Fluoksetin ve Norfluoksetin için ortalama geri kazanım yüzde oranları Tablo4.3'te verilmiştir.

Tablo4.3: Fluoksetin ve Norfluoksetin için sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin geri kazanım oranları

Konsantrasyon(50ng/ml)	Geri Kazanım	RSD
Fluoksetin	%92	±%8.69
Norfluoksetin	%87	± %16.2

SPE yöntemi için Fluoksetinin tayin sınırı 1ng/ml olarak saptandı. GC-MS analizinde, SPE yönteminin, Fluoksetin için 5-75 ng/ml idrar konsantrasyon aralığının doğrusal olduğu görülmüştür. Bu aralıkta, fluoksetin için korelasyon katsayısı $R^2 = 0.998$, kalibrasyon eğrisinin denklemi $y = 0.92x - 0.0039$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8).



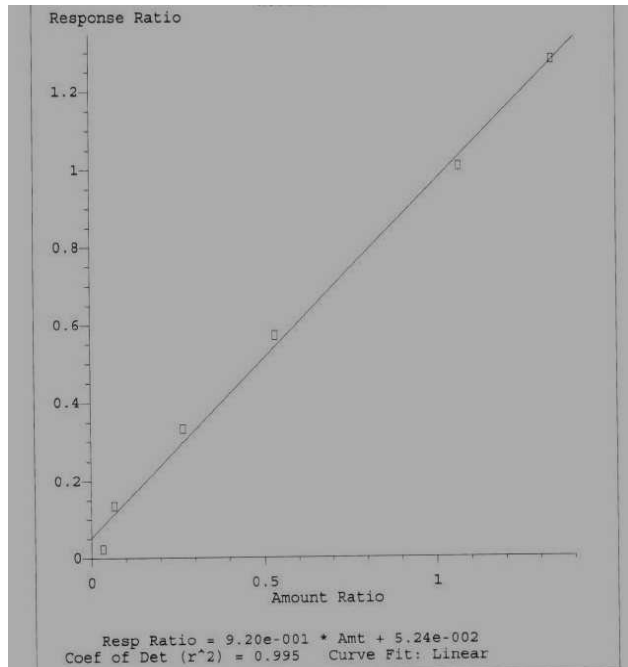
Şekil 4.8 Fluoksetinin SPE yöntemi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi

SPE yönteminin ortalama **geri kazanım** yüzde oranı **Fluoksetin** için Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4: SPE yönteminin Fluoksetin için geri kazanım oranları

Konsantrasyon	Geri Kazanım
25(ng/ml idrar)	% 102.8
50(ng/ml idrar)	% 96.6
Ortalama: %99.4	
RSD: ± %2.3	

SPE yönteminde, norfluoksetin için tayin sınırı 3ng/ml olarak saptandı. GC-MS analizinde, SPE yönteminde, norfluoksetin için 6-125 ng/ml idrar konsantrasyon aralığının doğrusal olduğu görülmüştür. Bu aralıkta, norfluoksetin için korelasyon katsayısı $R^2 = 0.995$, kalibrasyon eğrisinin denklemi $y = 0.92x + 0.0524$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Norfluoksetinin SPE yöntemi ile Hazırlanan Kalibrasyon Eğrisi

SPE yönteminin ortalama **geri kazanım** yüzde oranı **norfluoksetin** için

Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5: SPE yönteminin Norfluoksetin için geri kazanım oranları

Konsantrasyon	Geri Kazanım
25(ng/ml idrar)	%76
50(ng/ml idrar)	%109
<i>Ortalama:%92.5</i>	
<i>RSD: ±% 14.8</i>	

Tablo 4.6’da 50ng/ml idrardaki fluoksetin ve norfluoksetin için sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve SPE tekniklerinin kıyaslanması verilmiştir.

Tablo 4.6:Fluoksetin ve norfluoksetin için sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve SPE tekniklerinin kıyaslanması

	Sıvı-sıvı ekst. Dedeksiyon limiti(ng/ml)	SPE Dedeksiyon limiti (ng/ml)	Sıvı-sıvı ekst. Geri kazanım oranı(%) (50ng/ml için)	SPE Geri kazanım oranı(%) (50ng/ml için)	Sıvı-sıvı ekst. RSD ±% (50ng/ml için)	SPE RSD ±% (50ng/ml için)
Fluoksetin	10	1	92	96.6	8.69	2.94
Norfluoksetin	10	3	87	109	16.2	7.47

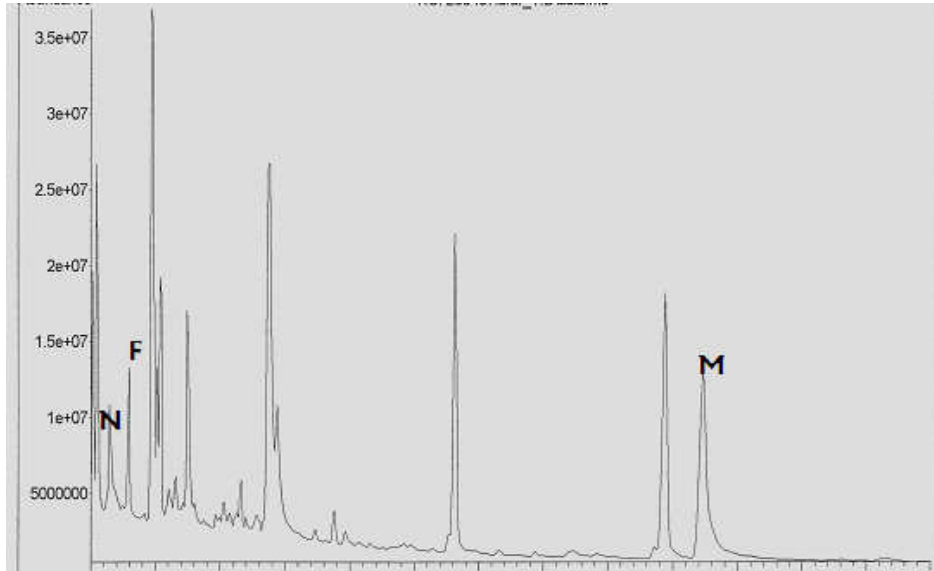
Hasta Örneklerinin Analizi

Fluoksetin etken maddesini içeren ilaçları kullanan kişilerden alınan ve SPE tekniği uygulanan, idrar örneklerine ait analiz bulguları **Tablo 4.7**'de verilmektedir.

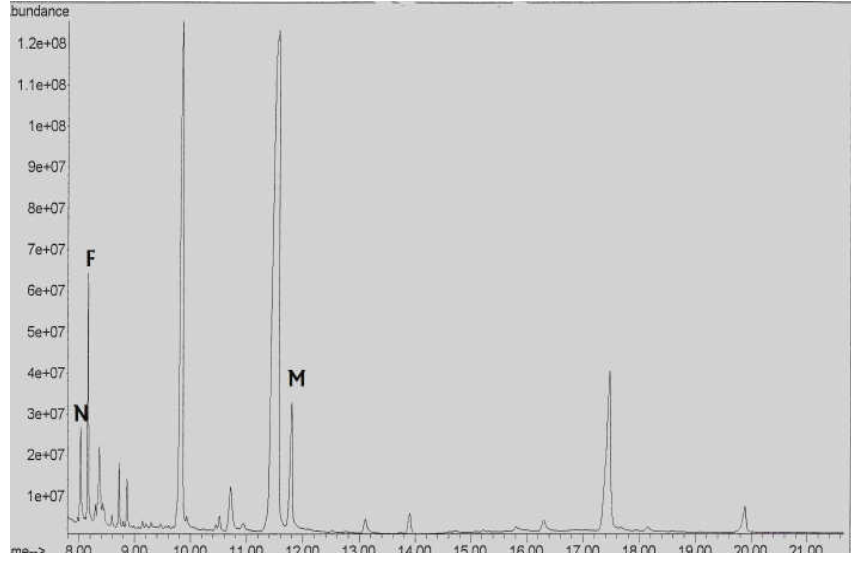
Tablo 4.7: Rastgele Seçilen Hasta Örneklerine Ait Analiz Bulguları

Örnek No.	Fluoksetin pik alanı/ IS pik alanı	Norfluoksetin pik alanı/IS pik alanı
1	0.47	0.34
4	0.55	0.45
8	0.57	0.25
13	0.44	0.63

Sıvı-sıvı ekstraksiyon ve SPE tekniğinin paralel olarak çalışıldığı, rastgele seçilen, fluoksetin kullanan hastanın idrar örneğine ait, GC kromatogramları Şekil 4.10 ve Şekil 4.11.'da görülmektedir.



Şekil 4.10:Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi uygulanan 8 numaralı hasta idrar örneğine ait GC-MS kromatogramı



Şekil 4.11: SPE tekniği uygulanan 8 numaralı hasta idrar örneğine ait GC-MS Kromatogramı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda sıklıkla karşımıza çıkan hastalıklardan biri, tedavisinde antidepresan ilaçların kullanıldığı depresyondur. Bunun sonucu olarak kullanımı artan antidepresan ilaçların, etken maddelerinin biyolojik materyalden tayinleri de önem kazanmaktadır.

Ülkemizde, Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nin (GATA) acil servisine yapılan başvurular içinde, intihar girişimlerinin önemli yer tuttuğu ve ilaçla intihar girişimlerinde en çok antidepresan ilaçların kullanıldığı belirtilmektedir[2].

Antidepresanlarla zehirlenmeler incelendiğinde, yüksek dozda fluoksetin alan 633 hastadan 34 ünün öldüğü, 378 inin tamamen iyileştiği, 15 kişide ise sekel kaldığının bildirildiği görülmüştür[18].

Georinger K.E., ve ark., SGAİ den olan fluoksetin, fluvoksamin, sertralin ve paroksetin ile yaptıkları çalışmaya göre, 60 adet ölümle sonuçlanmış olguda, fluoksetin saptandığı, bunlardan 20 ölümün normal ölüm, 13 ölümün intihar sonucu, 21 ölümün fluoksetin yanında alkol, eroin ve çoklu ilaç kullanımı sonucu olduğu ve 6 ölümün ise, nedeninin belirlenemediğini bildirmektedirler. Aynı çalışmaya göre, intihar sonucu ölüm olgularının çoğunda, fluoksetin yanında, benzodiazepin ve/veya barbitürat türevi maddelerde saptandığı ifade edilmektedir[6].

Buna göre, gerek ölümle sonuçlanan olguların aydınlatılması, gerekse ölümle sonuçlanmamış olgularda, derhal detoksifikasyon ve antidot tedavisine geçilebilmesi açısından, söz konusu olaylarda, kullanılan maddelerin tayin yöntemi önem kazanmaktadır.

Ayrıca, antidepresan maddelerinin kullanımının sürücü ve/veya yayanın neden olduğu trafik kazalarına etkisinin araştırılması, dünyada ve ülkemizde, üzerinde durulması gereken konulardan biridir.

Bu nedenle, bu tür olaylarda, kullanılan maddelerin saptanmasında kullanılacak yöntemin, hızlı, hassas, seçici ve güvenilir olması, doğru sonuca hızla ulaşmak açısından önemlidir. Güncel antidepresanlardan biri “Fluoksetin” dir. Fluoksetin, 1987 yılında, ABD de piyasaya çıkarılan ilk SGAI’ dir. SGAI konusunda yapılan çalışmaların çoğu fluoksetin ile yapılmıştır. Fluoksetin, major depresyon, obsesif kompulsif bozukluk, bulimiya nevroza, adet öncesi sendromu tedavisinde FDA onayı vardır [18]. Ayrıca, distimi, panik bozukluk, sosyal kaygı bozukluğu, bipolar depresyon, postmenopazol sıcak basmaları, alkol ve sigara bırakma tedavisi vb. durumlarda ek tedavi amacıyla da kullanılmaktadır [16].

Fluoksetinin, ana metaboliti norfluoksetin’dir. Bu madde de güçlü bir SGAI’ dir ve yarı ömrü, ana maddeden daha uzundur [16,17].

Fluoksetin yüksek oranda idrarla, düşük oranda dışkı ile atılır.%10 kadarı doğrudan, glukuronik asitle konjuge olarak atılır. Uzun süreli kullanımlarda vücutta birikimlere neden olur ve haftalarca vücutta kalır. İlacın vücuttan tamamen atılması 1-2 ay zaman alabilmektedir[15].

Güncel özelliğini koruyan antidepresanlardan olan fluoksetin’in analiz yöntemi ilgili birçok çalışmalar yapılmaktadır.

Yaptığımız literatür araştırmalarına göre, fluoksetin formülasyonlarının tayini yanında biyolojik materyalden tayini içinde çeşitli yöntemler geliştirilmektedir.

Nevado J.J.B. ve ark., farmasötik preparatlarından fluoksetin tayini için kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir [19].

Ertürk S., ve ark., floresans dedektör kullanarak HPLC yöntemi ile insan plazmasından, fluoksetin ve norfluoksetin tayini yapmışlardır [20].

Maurer H. ve ark., sistematik toksikolojik analiz amacıyla, fluoksetininde yer aldığı SGAI grubu antidepresanların ve metabolitlerinin idrardan tayini için GC/MS yöntemi geliştirmişlerdir [21].

Fraser A.D., ve ark., Kanada'da rehabilitasyon merkezinde, cezalarını çekmekte olan suçluların idrarlarında, EIA (Enzim İmmuno Assay) ve ELISA (Enzyme Linked İmmun Sorbent Assay) immünolojik yöntemleriyle yaptıkları tarama testlerinde, pozitif çıkan çeşitli psikotrop maddeler yanında, fluoksetin ve benzeri antidepresanların bulgularını, GC-MS yöntemi kullanarak da doğrulamışlardır [22].

Öztunç A., ve ark., yeni bir türevlendirme reaktifi kullanarak, HPLC ve İTK yöntemleriyle, fluoksetin ve bazı antidepresanları plazmadan tayin etmişlerdir [23].

Nevado J.J.B., ve ark., SGAI grubundan sitalopram, fluoksetin ve metabolitlerinin GC-MS yöntemi ile tayinlerini yapmışlardır [24].

Nash F.J., ve ark., önceki yıllarda, fluoksetin ve norfluoksetinin plazmadan tayinini GC-ECD ile gerçekleştirmişlerdir [25].

Roberts P.H., ve ark., Oslo ve Paris Çevre Komisyonlarının listesinde yer alan ve yüzey sularına ve kanalizasyonlara karışan ilaç maddeleri ile ilgili, HPLC/MS yöntemi yardımıyla yapılan çalışmada 7-34 ng/ml aralığında fluoksetine de rastlandığını bildirmişlerdir [27].

Ayrıca 1991-2001 yılları arasında İngiltere'de yapılan araştırmalarda, antidepresan kullanımının çok arttığı ve ülkenin içme suyu kaynaklarına sızdığı; fluoksetinin, yer altı sularında görülmeye başlandığı ifade edilmektedir [1].

Biyolojik materyalden yapılan çalışmalara diğer bir örnek, Wille S.M.R. ve ark., yaptığı, yeni jenerasyon antidepresanlar yanında fluoksetinin plazmadan HPLC-DAD ve GC-MS yöntemi ile tayinidir [26].

Bu çalışmada, yaptığımız literatür incelemelerine göre, ülkemizde, güncel antidepresanlardan fluoksetinin biyolojik materyalden tayini ile ilgili çok sayıda çalışmaya rastlamadığımızdan, fluoksetin ve metaboliti norfluoksetinin idrardan GC-MS sistemi ile tayini için bir yöntem geliştirmeyi amaçladık.

Maurer H.H., ve ark., ile Nevado J.J.B., ve ark., nın sistematik toksikolojik analiz amacıyla, uygulamış oldukları yöntemler değiştirilerek uygulandı.

Çalışmada, herhangi bir ilaç ve madde kullanmayan gönüllülerden alınan idrar örneklerine, belli konsantrasyonlarda fluoksetin, norfluoksetin ve IS olarak kullanılan maprotilin çözeltileri katılarak 3.5.1 bölümünde anlatıldığı şekilde ekstrakte edildi ve 3.5.2 de anlatıldığı gibi türevlendirildi.

Ekstreler, türevlendirildikten sonra azot altında uçurulup, metanol ilave edilip, 3.6 bölümünde bildirilen koşullarda GC-MS sisteminde analiz edildi.

Uygulanan parametrelere göre, fluoksetin, norfluoksetin ve iç standard maprotiline ait alıkonna zamanları sırasıyla 8.1 dk, 7.9 dk ve 11.7 dk olarak bulundu.

Bu maddelere ait kütle spektrumundan elde edilen iyonların m/z değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

3.5.1.1 bölümünde anlatılan sıvı-sıvı ekstraksiyonu yönteminde tayin sınırı hem fluoksetin hem de norfluoksetin için eşit bulunmuş olup 10ng/ml'dir.

Sıvı-sıvı ekstraksiyonuna ait ekstrelerin GC/MS analizlerinde, fluoksetin için 10-80 ng/ml idrar konsantrasyon aralığında doğrusal ölçü grafiği edildi. Fluoksetin

için bu aralıkta doğru denklemi $y= 0.54x-0.023$ ve korelasyon katsayısı ise $R^2=0.990$ olarak bulundu. Sıvı-sıvı ekstraksiyonuna ait ekstrelerin GC/MS analizlerinde, fluoksetin olduğu gibi, norfluoksetin için de, 10-80 ng/ml idrar konsantrasyon aralığında doğrusal ölçü grafiği edildi. Norfluoksetin için bu aralıkta doğru denklemi $y= 1.29x-0.024$ ve korelasyon katsayısı ise $R^2=0.977$ olarak bulundu.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde, 50 ng/ml idrar konsantrasyonunda, geri kazanım oranları fluoksetin için %92; norfluoksetin için %87 ve bu değerlere göre, relative standard sapmaları fluoksetin ve norfluoksetin için sırasıyla $\pm\%8.69$ ve $\pm\%16.2$ olarak bulundu.

SPE yöntemine ait ekstrelerin GC/MS analizlerinde tayin sınırı fluoksetin için 1ng/ml, norfluoksetin için 3ng/ml olarak saptandı. Bu teknik için fluoksetine ait ölçü eğrisi, 5-75ng/ml konsantrasyon aralığında doğrusal elde edildi. Bu aralıkta korelasyon katsayısı $R^2=0.998$, ölçü eğrisi denklemi $y=0.92x-0.0039$ olarak bulundu.

Norfluoksetin için ise, 6-125ng/ml aralığında doğrusal ölçü eğrisi elde edildi. Bu aralıklar için eğri denklemi $y=0.92x+0.0524$, korelasyon katsayısı $R^2=0.995$ olarak hesaplandı.

SPE tekniğinde Fluoksetinin geri kazanım oranı 25 ng konsantrasyonda %102.8, 50 ng konsantrasyon için ise %96.6 bulundu.

SPE tekniğinin Norfluoksetin için 25 ng ve 50 ng konsantrasyondaki geri kazanım oranları, sırasıyla %76 ve %109 bulundu. Bu verilere göre, bu teknikle 25 ng Fluoksetin için iyi bir geri kazanım söz konusu iken, norfluoksetin için oldukça düşük bir verim alındı.

SPE tekniğine ait geri kazanım oranları ile RSD'nin ortalama değerleri, fluoksetin için sırasıyla %99,4, RSD \pm %2.3; norfluoksetin için sırasıyla %92.5, RSD \pm %14.8 olarak saptandı.

Fluoksetin ve norfluoksetinin 50 ng madde içeren çözeltileri ile yapılan, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve SPE tekniklerinin geri kazanım oranları incelendiğinde(bkz. Tablo4.6), SPE tekniğinde verimin, sıvı-sıvı ekstraksiyondan çok daha başarılı olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, bu avantajlar nedeniyle hasta örneklerine SPE yöntemi uygulandı.

Bu çalışmada, yaklaşık 6 ay ile 1 yıllık sürede, günlük, tek doz 20 mg, fluoksetin etken maddesi içeren ilaç kullanan, onamları alınmış 15 gönüllü kişiden alınan idrar örnekleri incelendi. Bu idrarlardan rastgele seçilenlere ait analiz bulguları Tablo 4.5 te verilmektedir. Çalışılan idrar örnekleri içinde, en yüksek fluoksetin miktarı 78ng/ml ve metabolit miktarı 42ng/ml; en düşük fluoksetin miktarı 25ng/ml ve metabolit miktarı 52 ng olarak bulundu. Bu idrar örneklerinde, en yüksek metabolit miktarı 115 ng/ml ve buna ait fluoksetin miktarı 73 ng/ml; en düşük metabolit miktarı 24ng/ml ve buna ait fluoksetin miktarı 42ng/ml olarak saptandı.

Görüldüğü üzere, bulunan değerler gerek fluoksetin, gerekse norfluoksetin için doğrusal konsantrasyon aralığında yer almıştır.

Sonuç olarak, geliştirdiğimiz bu yöntem duyarlı, hızlı, seçici ve güvenilir bir yöntemdir. Bu nedenle, tedavi amacıyla fluoksetin kullanan hastalarda takip için; tek başına veya alkol gibi başka maddelerle kullanımda, madde etkisi altında gerçekleşen trafik kazaları v.b. olaylardan veya zehirlenme olgularından alınacak idrar örneklerine uygulanarak, olayların aydınlatılması ve/veya bireylerin tedavisine kısa zamanda başlanması açısından katkı sağlayacağı kanısındayız.

6. ÖZET

Depresyon tedavisinde, trisiklik antidepresanlar, monoamin oksidaz inhibitörleri ve seçici geri alım inhibitörleri(SSRI) kullanılmaktadır. Fluoksetin seçici geri alım inhibitörlerindedir. Fluoksetin etken maddesini içeren ilaçların kullanım sıklığı oldukça yüksektir. Bu nedenle de Fluoksetinin biyolojik materyalden tayini ve analiz yöntemi gerek klinik değerlerinin tespitinde gerekse toksikolojik analizlerde önemlidir. Bu nedenle son yıllarda bu maddenin analiziyle ilgili çalışmaların sayısı hızla artmaktadır. Fluoksetin ve metaboliti norfluoksetin, kan ve idrar gibi vücut sıvılarını yanı sıra dokulardan da tayin edilebilmektedir.

Bu çalışmada, idrarda GC-MS yöntemi ile fluoksetin ve norfluoksetin analizi yapıldı.

Uygulanan sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile Fluoksetin için geri kazanım oranı 92 ± 8.69 , norfluoksetin için ise geri kazanım oranı 87 ± 16.2 olarak tespit edildi. Yöntemin tayin sınırı, fluoksetin ve norfluoksetinin her ikisi için de, 10ng/ml olarak saptandı. Fluoksetin için GC-MS'de 10-80ng/ml konsantrasyon aralığının doğrusallığı görüldü($y=0.54x-0.023; R^2=0.99$). Norfluoksetin için de, 10-80ng/ml aralığının doğrusallığı görüldü($y=1.29x-0.0024; R^2=0.97$).

Uygulanan SPE yöntemi ile Fluoksetin için geri kazanım oranı 99.47 ± 2.3 , norfluoksetin için geri kazanım oranı ise 92 ± 14.8 olarak bulundu. SPE yönteminin fluoksetin için tayin sınırı 1ng/ml olarak, norfluoksetin için ise 3ng/ml olarak saptandı. Fluoksetin için GC-MS'de 5-75ng/ml konsantrasyon aralığında doğrusallığı gösterildi($y=0.92x-0.0039; R^2=0.998$). Norfluoksetin için ise 6-125ng/ml aralığında doğrusallığı gösterildi($y=0.92x+0.0524; R^2=0.995$). Fluoksetin etken maddesini kullanan 15 gönüllü kişiden alınan idrar örneklerinde, yukarıdaki yöntemle

Fluoksetin ve metaboliti norfluoksetin tayin edildi; örneklerin tümünde, tespit edilen madde miktarları, tayin sınırları içerisinde bulundu.

Bu çalışmada, “Fluoksetin” ile ilgili olarak gerek klinik analizlere gerek de intoksikasyon ve madde etkisi altında meydana gelen trafik kazaları gibi adli olgulara destek olmak üzere “Fluoksetin”ve metaboliti “Norfluoksetin”in, idrardan, GC/MS sistemi kullanılarak nicel ve nitel tayini için hızlı, hassas ve güvenilir bir yöntem geliştirildi.

7. SUMMARY

For pharmacotherapy of depression, tricyclic antidepressants, monoamine oxidase inhibitors and/or the newer selective serotonin re-uptake inhibitors have been used. Fluoxetine is a serotonin re-uptake inhibitor widely used in the pharmacotherapy of endogenous depression.

Fluoxetine and norfluoxetine can be detected both in body fluids like blood and urine, and body tissues.

In this study, a gas chromatographic-mass spectrometric (GC-MS) screening procedure was developed for detection of fluoxetine and norfluoxetine in urine. Aliquots of urine were subjected to solvent extraction, and solid-phase extraction, and acetylated, and GC separated.

The mean recovery ratio of the liquid-liquid extraction method was found to be $92 \pm 8.69\%$ of fluoxetine and $87 \pm 16.2\%$ of norfluoxetine. The LOD of the liquid-liquid method was 10 ng/ml for both fluoxetine and norfluoxetine. The method was found to be linear in the 10-80 ng/ml urine concentration range of fluoxetine ($y = 0.54x - 0.023$) with corresponding correlation coefficient $R^2 = 0.990$. The method was found to be linear in the 10-80 ng/ml urine concentration range of norfluoxetine ($y = 1.29x + 0.024$) with corresponding correlation coefficient $R^2 = 0.97$.

The mean recovery ratio of the SPE method was found to be $99.47 \pm 2.3\%$ of fluoxetine and $92.5 \pm 14.8\%$ of norfluoxetine. The LOD of the SPE method was 1 ng/ml of fluoxetine and 3 ng/ml of norfluoxetine. The method was found to be linear in the 5-75 ng/ml urine concentration range of fluoxetine ($y = 0.92x - 0.0039$) with corresponding correlation coefficient $R^2 = 0.998$. The method was found to be linear in

the 6-125 ng/ml urine concentration range of norfluoxetine($=0.92x+0.0524$) with corresponding correlation coefficient $R^2=0.995$.

Urine from 15 depression patients, known to be use to fluoxetine in the last six months or one year, was analysed for fluoxetine and norfluoxetine. All of these samples found to be positive both fluoxetine and norfluoxetine.

This method allowed the qualitative and quantitative identification of fluoxetine and norfluoxetine in urine after ingestion of therapeutic doses. Therefore, this method can be used for diagnosis or diagnostic exclusion of fluoxetine.

We believe that this study will be beneficial for the investigation of a pharmacokinetic screening in clinical urine samples and forensic cases such as; intoxication or Drug Driving Under Influenced of Drugs (DUID).

8.KAYNAKLAR

- [1] [http://www.energyturkey.org/content/view/62/2/-31k\(13/06/2007\)](http://www.energyturkey.org/content/view/62/2/-31k(13/06/2007))
- [2] İnal V., Yamancı L.H., Kartal Ö., (2004)GATA Acil Servisine 2002 Yılı İçinde Başvuran İntihar Girişimi Olguları, *Adli Psikiyatri Dergisi Cilt/Sayı 1(2)*
- [3] Mura P., Kintz P, Ludes P., (2003) Comparison of the prevalence of alcohol, cannabis and other drugs between 900 injured drivers and 900 control subjects: results of a French collaborative study, *Forensic Science International 133 79-85*
- [4] Weber E.J., Maio F. Ronald, Blow F.C., Hill E.M., Alcohol and/or other drug use among adult non-occupant motor vehicle crash victims, *Alcohol and alcoholism Vol.37, No 5, pp 468-471*
- [5] [www.populermedikal.com/obsesif.asp\(13/06/2007\)](http://www.populermedikal.com/obsesif.asp(13/06/2007))
- [6] Goeringer E., Raymon S.,(2000), Postmortem forensic toxicology of selective serotonin reuptake inhibitors: A review of pharmacology and report of 168 cases, *Forensic Sci. 45(3): 633-648*
- [7] [http://www.psikiyatrlist.com.htm\(13/06/2007\)](http://www.psikiyatrlist.com.htm(13/06/2007))
- [8] [http://www.psikiyatrlist.net.htm\(13/06/2007\)](http://www.psikiyatrlist.net.htm(13/06/2007))
- [9] [http://www.medikalsozluk.com/psikiyatri/depresyon.asp\(13/06/2007\)](http://www.medikalsozluk.com/psikiyatri/depresyon.asp(13/06/2007))
- [10] [http://www.bursapsikiyatri.com\(13/06/2007\)](http://www.bursapsikiyatri.com(13/06/2007))
- [11] [http://www.populermedikal.com/deprested.asp\(13/06/2007\)](http://www.populermedikal.com/deprested.asp(13/06/2007))
- [12] Yüksel N.,(2003), Psikofarmakoloji, 2. baskı, s169-260, Çizgi Tıp Yayınevi,Ankara,
- [13] Dökmeci İ, (2001), Toksikoloji, 3.baskı, s. 414, Nobel Tıp Basımevi, İstanbul
- [14]Lüllmann H.,Mohr K., Ziegler A.,(2001) Renkli Farmakoloji Atlası,2.baskı, s 116-118, Palme Yayıncılık,Ankara
- [15] <http://www.mentalhealth.com/drug/p30-p05.html13/06/2007>
- [16] <http://www.rxlist.com/cgi/generic/fluoxetine.htm13/06/2007>
- [17] <http://www.intox.org/databank/documents/pharm/fluoxtin/pim651.htm>
- [18] http://www.bursapsikiyatri.com/?pg=mak_okunan&id=6713/06/2007

- [19] Nevado B., Salcedo M., Llerena V., Nuevo A.,(2000), Method development and validation for the simultaneous determination of fluoxetine and flvoxamine in pharmaceutical preparations by capillary electrophoresis, *Analytica Chimica Acta* 417: 169-176
- [20] Erturk S.,Çetin SM.,Atmaca S., Ersoy L.,Baktir G., (2005)Sensitive HPLC method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma with fluorescence detection.,*Therapeutic Drug Monitoring* 27(1): 38-43
- [21] Maurer H., Friedrich B.,(2000) Screening procedure for detection of antidepressants of the selective serotonin reuptake inhibitor type and their metabolites in urine as part of a modified systematic toxicological analysis procedure using GC-MS, *Journal Analytical Toxicology* 24: 340-347
- [22] Fraser A.D., Zamecnik J., Keravel J., (2001) Experience with urine drug testing by the correctional service of Canada *Forensic Science International Volume* 121, Issues 1-2:16-22
- [23] Öztunc A., Onal A., Erturk S., (2002),7,7,8,8-Tetracyanoquinodimethane as a new derivatization reagent for high-performance liquid chromatography and thin – layer chromatography: rapid screening of plasma for some antidepressants.,*Journal Of Chromatography B*,774149-155
- [24]Nevado J.J.B.,Llerena V., Cabanillas G., Robledo R.(2006) Screening of citalopram, fluoxetine and their metabolites in human urine samples by gas chromatography- mass spectrometry. A global robustness/ruggedness study, *Journal of Chromatography A*,1123: 130-133
- [25] Nash F.J., Bopp J.R., Carmichael H.R., Farid Z. K., Lemberger Z. (1982), Determination of Fluoxetine and Norfluoxetine in Plasma by Gas Chromatography with Electron Capture Detection, *Clin. Chem.* 28: 2100-2102
- [26] Wille M.R.S., Maudes E.K., Lambert E.E.W.,(2005), Development of a solid phase extraction for 13 new generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic – mass spectrometric analysis *Journal of Chromatography A*. 1098:19-29
- [27] Roberts Paul, Bersuder P.,(2006), Analysis of OSPAR priority pharmaceuticals using high performance liquid chromatography- electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1134: 143-150
- [28] [http://www.wikipedia.org/wiki/Ekstraksiyon\(13/06/2007\)](http://www.wikipedia.org/wiki/Ekstraksiyon(13/06/2007))
- [29] Yavuz O., Aksoy A.,(2006) Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu, *F.Ü. Sağlık Bil. Der.* 20(3):259-269

- [30] Gündüz T., (2004) İnrümental Analiz, 7. baskı, s 1115-1119, 1177-1190, Gazi Kitabevi, Ankara
- [31] Skoog D., Holler J., Nieman T., Enstrümental Analiz İlkeleri, s 498-531, 702-716, Bilim Yayıncılık. Ankara
- [32] Ersoy L., Obalı M., Cesur Z., Özkırmılı S., (1989), Aletli Analiz Yöntemleri II Kromatografi Okulu, T.M.M.O.B. Kimya Mühendisleri Odası İstanbul Şubesi
- [33] <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/sep/npd.html13/06/2007>
- [34] Ahuja S., (1976), Derivization in Gas Chromatography, Journal of Pharmaceutical Sci. 65(2)
- [35] Lefebvre M., Marchand M., Torres G., (1999), Detection of fluoxetine in brain, blood, liver and hair of rats using GC-MS *Life Sci.* 64(9):805-811 *tartısma*
- [36] Juan H., Zhiling Z., Huande L., (2005), Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry Journal of Chromatography B 820: 33-39
- [37] Crifasi JA, Le NX, Long C., (1997), Simultaneous identification and quantitation of fluoxetine and its metabolite, norfluoxetine, in biological samples by GC-MS. *J Anal. Toxicol.* Oct;21(6):415-9
- [38] Fox D.J., Long G., Telephack M., and Hee E.T. Fluoxetine and Norfluoxetine analysis using solid phase extraction and GC-MS detection
- [39] Frahnert C., Rao L.M., Grasmader K., (2003), Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring Journal of Chromatography B 794:35-47
- [40] Berzas J., Guiberteau C., Rodriguez V., (2004), Development of a capillary gas chromatographic procedure, *Analytica Chimica Acta* 519(2): 219-230
- [41] Frankenfield L., Baker S., Lange R., (1994), Fluoxetine and violent death in Maryland, *Forensic Science International*, 64(2);107-117
- [42] Gupta N.R., Molnar G., Gupta L.M., (1977), Estimation of Maprotiline in Serum by Gas Chromatography with use of Nitrogen specific detector *Clin. Chem.* 23:1849-1852
- [43] Khan A., Kolts R., Brown WA., (2003), Suicide rates in clinical trials of SSRIs, other antidepressants, and placebo: analysis FDA reports, *Am J Psychiatry* 160(4):790-792

[44] Karamustafalıoğlu K., Karamustafalıoğlu N.,(2000), Obsesif Kompulsif Bozukluk ve Depresyon, Klinik Psikofarmakoloji Bülteni 10; 26-31

[45] Lerena A., Dorado P., Bereez R., Gonzales A., Norberto J., Rubai A.,(2003), Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection in psychiatric patients Journal of Chromaography B 783:25-31

[46] Schaller D.,Hilder F.E., Haddad R.P.,(2005), Separation of antidepressants by capillary electrophoresis with in- line solid phase extraction using a novel monolithic adsorbent Analytica Chimica Acta

[47] Schmitz M., Averill P., Stotts L., Moeller G., Grabowski J.,(2001), Fluoxetine treatment of cocaine-dependent patients with major depressive disorder, Drug and Alcohol Dependence 63:207-214

9.EKLER

GÖNÜLLÜLERE VERİLECEK BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

Araştırmanın yürütüldüğü kuruluş: İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp

Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı

Araştırmanın Adı: Fluoksetin ve metaboliti olan Norfluoksetinin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Yöntemi ile Biyolojik Materyalden (idrar) Tayini

Amaç: Son yıllarda yapılan araştırmalara göre, dünyada en çok tüketilen ilaç gruplarından biri antidepresanlardır. Günümüz yaşamı, yoğun stresleri ve depresyonun görülme sıklığı, antidepresan kullanımında artışa neden olmaktadır.

Güncel antidepresanlar içinde Fluoksetin dikkat çekmektedir. Bu çalışmanın amacı Fluoksetin ve metaboliti Norfluoksetin'in idrardan GC-MS yöntemi ile kullanılarak analizinin yapılmasıdır. Araştırmaya katılmak ve katılmamak tamamen kişinin kendi isteğine bağlıdır. Yapılacak işlemler ve analizler için gönüllülerden kesinlikle hiçbir ücret talep edilmeyecektir. Gönüllülerin kimliği ile ilgili kayıtlar gizli tutulacaktır.

Araştırmaya hiçbir baskı olmaksızın kendi arzumuyla katıldığımı beyan ederim.

Sağlıklı, gönüllü deneğin adı soyadı ve imzası:

Yürütücü Araştırmacı:

Kimyager Dilek Salkım

İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi

Telefon: 212 414 30 00/22821

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı - Soyadı: Dilek Salkım

Doğum Tarihi ve Yeri: 19.08.1981, İstanbul

Ehliyet: B sınıfı

Adres: Kartaltepe mah. Gülay sk. Gülay apt. No:2/11 Bakırköy-İstanbul

E-posta:salkimdilek@gmail.com

EĞİTİM DURUMU:

2007- Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nda Doktora Eğitimi

2007 İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans
Diploması

2004 İ.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Tezsiz Yüksek Lisans Diploması

2002 Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Lisans
Diploması

1998 İstanbul Yahya Kemal Beyatlı Lisesi, Lise Diploması

1995 İstanbul Bakırköy Ortaokulu, Ortaokul Diploması

1992 İstanbul Yeşilköy Arif Şenel İlkokulu, İlkokul Diploması

BİLİMSEL ETKİNLİKLER:

Tamamlanan Tez ve Dönem Projeleri:

Trakya Üniversitesi Lisans Bitirme Tezi (2002) *Spektrofotometrik Titrasyon*

İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (2004) *Sigara ve Bağımlılık*

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü(2007) *Fluoksetin ve metaboliti Norfluoksetinin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi(GC-MS) ile Biyolojik Materyalden(İdrar) Tayini*

Katıldığı Kongreler ve Konferanslar:

The 3rd International Congress of The Balkan Academy of Forensic Sciences

“New Trends of Forensic Sciences in Balkan Area” (2005 - Romanya)

VII. Adli Bilimler Kongresi(2006 - Konya)

DNA ve Adli Laboratuvarlarda Kalite Güvencesi (2007 - İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü - İstanbul)

14. Ulusal Adli Tıp Günleri (2007-Antalya)

Poster sunumu: “Microextraction Techniques in Enviromental Analysis”

Açikkol M.,**Salkım D.**, Baykara E., in: Integrated Coastal Zone Management & Biodiversity & Marine Environment, IntenSynergy 2006 Foça, İzmir

“Adli Örneklere Uygulanan Ekstraksiyon Yöntemleri”

Sakım D. Acikkol M.,Türkmen Z.,Cengiz S.,(14. Ulusal Adli Tıp Günleri – 2007-Antalya)

MESLEKİ DENEYİM

1999 - 2000 Novartis İlaç Fabrikasında AR-GE Laboratuvarında laboratuvar stajı.

2000-2001 Novartis İlaç Fabrikasında AR-GE Laboratuvarında işletme stajı.

2005- İ.Ü Adli Tıp Enstitüsünde öğrenci statüsünde “Yarı zamanlı” çalışmaktadır.

İ.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen G10/11052006 sayılı “İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü Toksikoloji ve Hemogenetik Laboratuvarları Geliştirme” Projesinde yardımcı araştırmacı olarak bulunmaktadır.