



**T.C.**

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIK KULLANILAN ANTİEPİLEPTİK İLAÇLARIN LC-MS/MS İLE  
EŞ ZAMANLI ANALİZ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

**OSMAN AKSU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. Ümit ERGUN**

**DÜZCE, 2019**

**T.C.**  
**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIK KULLANILAN ANTİEPİLEPTİK İLAÇLARIN LC-MS/MS İLE**  
**EŞ ZAMANLI ANALİZ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

OsmanAKSU tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANSTEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Doç. Dr. Ümit ERGUN

Düzce Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Ümit ERGUN

Düzce Üniversitesi

Doç. Dr. Ertuğrul KAYA

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. ....

Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 27/06/2019

## BEYAN

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

27 Haziran 2019

Osman AKSU

## TEŞEKKÜR

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

Tez çalışmam boyunca yardım ve desteğini esirgemeyip bilgi birikimini benimle paylaşan Ertuğrul KAYA ve Nuri Cenk COŞKUN'a ayrıca kimyasal madde desteklerinden ötürü de Düzce Üniversitesi Farmakoloji Laboratuvarı sorumlularına şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen maddi ve manevi yanımda olan babam Cevdet AKSU ve annem Melahat AKSU'ya çalışma arkadaşım Meryem AYDIN'a ve desteklerinden dolayı Mert DÖNMEZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

27 Haziran 2019

Osman AKSU

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

|                                                          |      |
|----------------------------------------------------------|------|
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                       | vii  |
| ÇİZELGE LİSTESİ.....                                     | viii |
| KISALTMALAR.....                                         | ix   |
| SİMGELER.....                                            | x    |
| ÖZET .....                                               | xi   |
| ABSTRACT .....                                           | xii  |
| 1. GİRİŞ.....                                            | 1    |
| 1.1. EPİLEPSİNİN TANIMI VE TARİHÇESİ.....                | 1    |
| 1.1.1. Epilepsinin Epidemiyolojisi.....                  | 1    |
| 1.1.2. Epilepsinin Tedavisi .....                        | 2    |
| 1.1.3. Epilepside İlaç Seçimi.....                       | 2    |
| 1.1.4. Antiepileptik İlaçların Sınıflandırılması .....   | 3    |
| 1.2. KROMOTOGRAFİK YÖNTEMLER .....                       | 7    |
| 1.2.1. Kromotografik Yöntemlerin Sınıflandırılması ..... | 8    |
| 1.2.2. Sıvı Kromatografisi .....                         | 8    |
| 1.2.3. HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatogramı).....    | 9    |
| 1.3. KÜTLE SPEKTROSKOPİSİ .....                          | 11   |
| 1.4. LC-MS/MS YÖNTEMİ.....                               | 12   |
| 1.5. ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU .....                   | 14   |
| 1.5.1. Validasyon Parametreleri .....                    | 15   |
| 2. MATERYAL VE YÖNTEM.....                               | 17   |
| 2.1. KULLANILAN STANDART ÇÖZELTİLER VE CİHAZLAR.....     | 17   |
| 2.2. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI.....                      | 18   |
| 2.2.1. Örnek Numunelerin Hazırlanması .....              | 18   |
| 2.2.2. Kalibrasyon Çözeltilerin Hazırlanması .....       | 20   |
| 2.2.3. Mobil Fazların Hazırlanması .....                 | 20   |
| 2.3. LC-MS/MS ÇALIŞMA ŞARTLARI .....                     | 20   |
| 2.3.1. LC-MS/MS Sıvı Sistemi Akış Özellikleri .....      | 21   |
| 3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....                            | 22   |
| 3.1. ALIKONMA ZAMANLARI .....                            | 23   |
| 3.2. MRM SPEKTURUMLARI .....                             | 23   |
| 3.3. ÖZGÜNLÜK/SPEŞİFİKLİK .....                          | 26   |
| 3.4. KALİBRASYON EĞRİSİ VE DOĞRUSALLIK .....             | 29   |
| 3.5. GERİ KAZANIM .....                                  | 39   |

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.6. STANDART SAPMA, GÖZLENEBİLME SINIRI, ALT TAYİN SINIRI.....</b> | <b>40</b> |
| <b>3.7. KESİNLİK.....</b>                                              | <b>40</b> |
| <b>3.8. STABİLİTE .....</b>                                            | <b>43</b> |
| <b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                                       | <b>46</b> |
| <b>5. KAYNAKLAR .....</b>                                              | <b>50</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                   | <b>52</b> |



## ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                 | <u>Sayfa No</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Şekil 1.1. Tek bir standart için örnek bir kromatogram.....                                                                                                                                                                     | 8               |
| Şekil 1.2. Mikhail Tswett.....                                                                                                                                                                                                  | 9               |
| Şekil 1.3. Archer John Porter Martin, Richard Laurence Millington Synge .....                                                                                                                                                   | 9               |
| Şekil 1.4. HPLC cihazının şematik gösterimi.....                                                                                                                                                                                | 10              |
| Şekil 1.5. Üç kademeli kuadropol (TSQ) bir kütle analizörü .....                                                                                                                                                                | 12              |
| Şekil 1.6. LC-MS/MS sistematik görünümü .....                                                                                                                                                                                   | 13              |
| Şekil 1.7. MS/MS sıralı kütle analizörü.....                                                                                                                                                                                    | 14              |
| Şekil 2.1. LC-MS/MS cihazı.....                                                                                                                                                                                                 | 18              |
| Şekil 2.2. Örnek numunelerin hazırlanış sırası .....                                                                                                                                                                            | 19              |
| Şekil 3.1. Her bir maddenin MRM spektrumları a) Karbamazepin, b) Okskarbazepin,<br>c) Fenitoin, d) Diazepam, e) Lorazepam, f) Klonazepam, g) Levetirasetam,<br>h) Gabapentin, ı) Lamotrigin .....                               | 26              |
| Şekil 3.2. Her etken madde için alıkonma grafikleri (a-b) Karbamazepin,<br>(c-d) Okskarbazepin, (e-f) Fenitoin, (g-h) Diazepam, (ı-j) Lorazepam,<br>(k-l) Klonazepam, (m-n) Levetirasetam, (o-p) Gabapentin, (r-s) Lamotrigin . | 29              |
| Şekil 3.3. Karbamazepinin kalibrasyon grafiği .....                                                                                                                                                                             | 30              |
| Şekil 3.4. Okskarbazepinin kalibrasyon grafiği.....                                                                                                                                                                             | 31              |
| Şekil 3.5. Fenitoinin kalibrasyon grafiği .....                                                                                                                                                                                 | 32              |
| Şekil 3.6. Diazepamın kalibrasyon grafiği.....                                                                                                                                                                                  | 33              |
| Şekil 3.7. Lorazepamın kalibrasyon grafiği.....                                                                                                                                                                                 | 34              |
| Şekil 3.8. Klonazepamın kalibrasyon grafiği.....                                                                                                                                                                                | 35              |
| Şekil 3.9. Levetirasetamın kalibrasyon grafiği .....                                                                                                                                                                            | 36              |
| Şekil 3.10. Gabapentinin kalibrasyon grafiği .....                                                                                                                                                                              | 37              |
| Şekil 3.11. Lamotriginin kalibrasyon grafiği.....                                                                                                                                                                               | 38              |
| Şekil 3.12. Etken maddelerin eş zamanlı kromatogramı .....                                                                                                                                                                      | 45              |

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa No

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1. Antiepileptik ilaçların sınıfı, piyasa adı, kullanıldığı doz, endikasyonları ve yan etkileri.....        | 4  |
| Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasalların firma, seri numarası, son kullanma tarihi.....                                  | 17 |
| Çizelge 2.2. Deneyde kullanılan cihazların özellikleri .....                                                          | 18 |
| Çizelge 2.3. LC- MS/MS çalışma şartları.....                                                                          | 21 |
| Çizelge 2.4. LC-MS/MS sıvı sistemi gradiyent özellikleri.....                                                         | 21 |
| Çizelge 3.1. Her bir etken maddenin, kimyasal yapısı, ana iyonu, yavru iyonu parametreleri ve iyonlaşma türleri ..... | 22 |
| Çizelge 3.2. Her bir etken maddenin alıkonma zamanları.....                                                           | 23 |
| Çizelge 3.3. 3 kez tekrar verilen Karbamazepin için en iyi ortalama alanlar .....                                     | 30 |
| Çizelge 3.4. 3 kez tekrar verilen Okskarbazepin için en iyi ortalama alanlar .....                                    | 31 |
| Çizelge 3.5. 3 kez tekrar verilen Fenitoin için en iyi ortalama alanlar .....                                         | 32 |
| Çizelge 3.6. 3 kez tekrar verilen Diazepam için en iyi ortalama alanlar .....                                         | 33 |
| Çizelge 3.7. 3 kez tekrar verilen Lorazepam için en iyi ortalama alanlar .....                                        | 34 |
| Çizelge 3.8. 3 kez tekrar verilen Klonazepam için en iyi ortalama alanlar .....                                       | 35 |
| Çizelge 3.9. 3 kez tekrar verilen Levetirasetam için en iyi ortalama alanlar.....                                     | 36 |
| Çizelge 3.10. 3 kez tekrar verilen Gabapentin için en iyi ortalama alanlar.....                                       | 37 |
| Çizelge 3.11. 3 kez tekrar verilen Lamotrigin için en iyi ortalama alanlar .....                                      | 38 |
| Çizelge 3.12. İlaç etken maddelerinin konsantrasyon ve geri kazanımları .....                                         | 39 |
| Çizelge 3.13. Gün içi tekrarlanabilirlik değerleri (n=20) .....                                                       | 41 |
| Çizelge 3.14. Günler arası tekrarlanabilirlik (Tekrar Üretilebilirlik) değerleri (n=20) ..                            | 42 |
| Çizelge 3.15. Etken maddelerin LOD ve LOQ değerleri (n=20).....                                                       | 43 |
| Çizelge 3.16. Oda sıcaklığında 120 saat bekletilen etken maddeler için istatistiksel veriler .....                    | 44 |



## SİMGELER

|                |                      |
|----------------|----------------------|
| mg             | Miligram             |
| mL             | Mililitre            |
| mM             | Milimolar            |
| m/z            | Kütle/Yük            |
| ng             | Nanogram             |
| r <sup>2</sup> | Kolerasyon katsayısı |
| µL             | Mikrolitre           |



## KISALTMALAR

|                  |                                                      |
|------------------|------------------------------------------------------|
| ACN              | Asetonitril                                          |
| APCI             | Atmosferik basınçlı kimyasal iyonlaşma               |
| ESI              | Elektrospray iyonizasyon                             |
| GC               | Gaz kromatografisi                                   |
| HPLC             | Yüksek basınç sıvı kromatogramı                      |
| HPLC-ESI-MS / MS | Elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometrisi |
| LC               | Sıvı kromatografisi                                  |
| LC-MS/MS         | Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi             |
| LEV              | Levetirasetam                                        |
| LOD              | Gözlenebilme sınırı                                  |
| LOQ              | Tayin sınırı                                         |
| LTG              | Lamotrigin                                           |
| MeOH             | Metil alkol                                          |
| MRM              | Çoklu reaksiyon izleme                               |
| MS / MS          | Kütle spektrometresi                                 |
| PHT              | Fenitoin                                             |
| TFA              | Trifloro asetik asit                                 |
| UPLC-MS / MS     | Ultra performanslı sıvı kromatografisi               |
| Q1               | kütle spektrometresi                                 |
| Q2               | İyon seçimi                                          |
| Q3               | Çarpışma odası                                       |
|                  | Parça iyon seçimi                                    |

## ÖZET

### SIK KULLANILAN ANTİEPİLEPTİK İLAÇLARIN LC-MS/MS İLE EŞ ZAMANLI ANALİZ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Osman AKSU  
Düzce Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi  
Danışman: Doç. Dr. Ümit ERGUN  
Haziran 2019, 51 sayfa

Bu çalışmada, sık kullanılan antiepileptik ilaç etken maddeleri olan Karbamazepin, Okskarbazepin, Fenitoin, Diazepam, Lorazepam, Klonazepam, Levetirasetam, Gabapentin ve Lamotrigin gibi moleküllerin tayini için, insan kanında Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) cihazı ile basit, hızlı, kantitatif değer verilebilen ve güvenilir bir metot geliştirilmiştir. Her bir ilaç etken maddesi için geri kazanım, doğruluk, yüzde bağıl standart sapma, gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı gibi bazı validasyon parametreleri belirlenmiştir. Etken maddelerin her biri için belirlenen konsantrasyonlarda; LOD değerleri için 1 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,05 ng.mL<sup>-1</sup>-0,16 ng.mL<sup>-1</sup>, 25 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,12 ng.mL<sup>-1</sup>-0,46 ng.mL<sup>-1</sup>, 75 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,20 ng.mL<sup>-1</sup>-0,68 ng.mL<sup>-1</sup>, LOQ değerleri için 1 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,17 ng.mL<sup>-1</sup>-0,52 ng.mL<sup>-1</sup>, 25 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,40 ng.mL<sup>-1</sup>-1,54 ng.mL<sup>-1</sup>, 75 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,67 ng.mL<sup>-1</sup>-2,26 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında sonuçlar bulunmuştur. Metot % geri kazanım yönünden 1 ng.mL<sup>-1</sup> konsantrasyonunda %98 seviyelerinde, yüksek konsantrasyonlarda ise %99 seviyelerinde tutulmuş ve EURACHEM klavuzuna göre uygun olduğu görülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Epilepsi, Antiepileptik ilaç, LC-MS/MS, Validasyon.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT REAL-TIME ANALYSIS METHOD OF FREQUENTLY USED ANTIEPILEPTIC DRUGS WITH LC-MS/MS

Osman AKSU

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Chemistry

Master's Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ümit ERGUN

June 2019, 51 pages

In this study, it has been developed simple, rapid, quantitative, and reliable method for active substances of frequently used antiepileptic drugs detection such as carbamazepine, oxcarbazepine, phenytoin, diazepam, lorazepam, clonazepam, levetiracetam, gabapentin and lamotrigine in human blood by using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) device. It has been validated in terms of recovery, accuracy, percentage of relative standart deviation, limit of quantification and limit of detection for each active substance of drugs. LOD and LOQ values for obtained concentrations of each active substances were resulted that 1 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,05 ng.mL<sup>-1</sup>-0,16 ng.mL<sup>-1</sup>, 25 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,12 ng.mL<sup>-1</sup>-0,46 ng.mL<sup>-1</sup>, 75 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,20 ng.mL<sup>-1</sup>-0,68 ng.mL<sup>-1</sup> and 1 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,17 ng.mL<sup>-1</sup>-0,52 ng.mL<sup>-1</sup>, 25 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,40 ng.mL<sup>-1</sup>-1,54 ng.mL<sup>-1</sup>, 75 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,67 ng.mL<sup>-1</sup>-2,26 ng.mL<sup>-1</sup> respectively. This method was resulted in %98 recovery at 1 ng.mL<sup>-1</sup> concentration and %99 recovery at higher concentration levels and also confirmed to EURACHEM guide.

**Keywords:** Epilepsy, Antiepileptic drug, LC-MS/MS, Validation.

# 1. GİRİŞ

## 1.1. EPİLEPSİNİN TANIMI VE TARİHÇESİ

Epilepsi eski çağlardan beri bilinen ve nüfusun %1'den fazlasını etkileyen yaygın bir nörolojik hastalıktır [1]. Epilepsi “ansızın yakalamak veya tutmak” anlamına gelmektedir. Ülkemizde halk arasında “sara” olarak bilinmektedir. Epilepsi beyindeki hücrelerin kontrol edilemeyen elektriksel boşalma sonucu ani, istemsiz, aşırı deşarjlarla bağlı olarak kısa süreli nöbetler şeklinde tekrarlayan, duyu ve hareket bozuklukları ve bazen bilinç kaybı olan nörolojik bir hastalıktır [2]. Epilepsi hastalığının olabilmesi için 1 gün içinde aralıklı olarak en az iki veya daha fazla nöbet geçirilmesi ve beyindeki gelecekte nöbet geçirme olasılığının oluşumunu artıran bir bozukluk olması gerekmektedir [3]. Epilepsiyi, Hipokrat milattan önce 460 yılında beyin hastalığı olarak tanımlamıştır. Hipokrat epilepsi ile ilgili ilk monograf olan “Kutsal hastalık” kitabın da diğer birçok hastalıklar gibi, bu hastalığın da beyin merkezin de olduğunu ilk kez ifade etmiştir. Epilepsinin ilk bilimsel tanımı 19. yy. da John Huglins Jackson tarafından yapılmıştır ve tanımı “sinir dokusunun ara sıra, aşırı, düzensiz deşarji” olarak belirtmiştir. 20. yy. da epilepsi kavramı; birçok klinisyen tarafından epilepsinin sınıflandırılması ve tedavisi bilimsel olarak belirlenmiş ve birçok araştırmacı gözlemlerinin birikimi ile nörofizyoloji, görüntüleme yöntemi ve genetik ilerlemelerin katkısıyla yapılmıştır [4].

### 1.1.1. Epilepsinin Epidemiyolojisi

Epilepsi ergenlik çağına kadar görülen en sık, yetişkinler de ise beyin damar hastalıklarının ardından en sık rastlanan nörolojik hastalıklardandır [5]. Gelişmiş ülkelerdeki insidansı 40-70/100.000 olup az gelişmekte olan ülkelerdeki insidansı 100-190/100.000 değerleri arasındadır [4].

Az gelişmiş ülkelerdeki yüksek insidansın nedeni net bir şekilde bilinmese bile doğum öncesi ve doğum sonrasındaki travmaları, kafa travmaları, enfeksiyon hastalıklarının daha sık olması olarak bilinmektedir. Bunların yanına ek olarak ise az gelişmiş ülkelerdeki AIDS ve sıtma gibi hastalıkların da epilepsi sıklığını artırdığı

gözlemlenmiştir. Yaşamımızda aktif epilepsi prevalansı ile ilgili 2,3-46/1.000 arasında veriler bulunmaktadır. Gelişmiş ülkelerde 4-10/1.000 az gelişmiş olan ülkelerde ise 1,3-46/1.000 olup farklı sonuçlar olduğu görülmüştür [2]. Doğumdan başlayıp 20 yaşına kadar epilepsinin oluşma riski yaklaşık olarak yaklaşık %1 civarındadır, bu oran 75 yaşında ise %3'e kadar çıkmaktadır, yani epilepsinin insidansı yaşamın ilk 20 yılı içinde ve 65 yaşından sonra iki kez zirve yapar. Epilepsinin çocuklarda görülme riski daha sıktır ve epilepsinin en çok görülmesi ise 10 yaş altındadır [4].

Epilepsi en sık görülme sırası olarak %30'u 0-5 yaşları arasında , %34'ü erken okul dönemi çağında, %13'ü 20 yaşına kadar ve %23'ü 20 yaşından sonra başlamaktadır. Hayatın ilk 5 yılı içinde kızlarda görülen epilepsi erkeklere göre daha çoktur, fakat tüm zaman da ise erkeklerde görülme riski kızlara göre daha fazladır [3].

### **1.1.2. Epilepsinin Tedavisi**

Epilepsi tedavisindeki öncelik büyüyen çocuğun ve büyümekte olan çocukların gelişmesine zarar vermeden nöbet sıklığını ve şiddetini azaltıp gerekirse nöbet kontrolünü sağlamak, tekrar olacak nöbetlerin oluşturacağı hasarları engellemek ve günlük aktivitelerini tekrar yapabilmesini sağlamaktır [3]. Tedavinin kararı yöntemi ilaç seçimi ve tedavinin sonlandırılması gibi kararlar alırken hastaya getirdiği etkilerin olası yan etkileri ve geçici ya da kalıcı zararları göz önüne alınmalıdır. Epilepsi tedavisinde öncelik gün içinde tekrarlayan nöbetlerin araştırılmasını sağlamak ve bu nedenlerin tamamen ortadan kaldırılması için çaba göstermektir. Epilepsiyi önlemek için hedef ilaç tedavisi, ketojenik diyet, cerrahi tedavi ve vagal uyarı gibi yöntemler tedavi içinde yer almaktadır [3].

### **1.1.3. Epilepside İlaç Seçimi**

Epilepsi tedavisinde kullanılan antiepileptik ilaçlar ilk olarak 1857 yılında potasyum bromür ile başlamış ve fenobarbitalin 1912 yılında sentezine kadar tek nöbet kesici ilaç olarak kullanılmıştır. Daha sonra petit mal epilepsi tedavisin de kullanılmak için 1938 yılında fenitoin (PHT) 1944 yılında da trimetadiyonun senteziyle ilk adım atılmıştır. 1959 ve 1969 yılında sırasıyla karbamazepin ve valproat yerini almıştır. Valproat'dan sonra 1990 yılında piyasaya verilen felbamat, zonisamid, vigabatrin, gabapentin, lamotrigin (LTG), topiramat, okskarbazepin ve levetirasetamin (LEV)'da aralarında olduğu yaklaşık 16 ilaç yeni antiepileptik ilaçlar olarak anılmaya başlanmıştır. Antiepileptik ilaç tedavisi epilepsi için öncelik ilk tedavidir. Yeni epilepsi olan

hasatlarda ilk önce tek ilaç ile tedaviye başlanmalıdır. Uygun ilaç seçiminde ise; bulunan epilepsi ve nöbet tipleri, ilaçların farmakokinetiği, yan etkileri, doz aralıkları ile birlikte hastanın özellikleri göz önüne alınarak saptanır. Anti Epileptik İlaç (AEİ) tedavisi kişiye özgü bir tedavidir. İlacın dozu her kişiye göre ayrı olarak uygulanır. Lamotrigin, gabapentin, okskarbazepin, felbamat, tiagabin, zonisamid, topiramat, levetirasetam gibi birçok yeni antiepileptik ilacın diğer eski ilaçlara göre klinik bulguları benzer olsalar da yan etkiler açısından daha uygun ve güvenilirdirler.

Yeni ilaçların tedaviye girmeye başlamasından sonra tedavi seçenekleri, ilaç etkileşimleri riski ve ilaç kombinasyonları da artmıştır. Yeni antiepileptik ilaçlar ilaç etkileşimleri açısından eski ilaçlara göre farmakokinetik özellikleri sebebiyle daha düşük potansiyele sahiptirler [6].

#### **1.1.4. Antiepileptik İlaçların Sınıflandırılması**

Antiepileptik ilaçların kimyasal yapılarına göre aşağıdaki şekilde sınıflandırabiliriz [6].

Fenitoin ve benzerleri: Fenitoin, Sodyum fosfenitoin.

Fenobarbital ve türevleri: Fenobarbital, Mefobarbital, Metarbital, Primidon.

Karbamazepin grubu.

Antiepileptik benzodiazepinler: Diazepam, Klonazepam.

Yeni antiepileptik ilaçlar: Gabapentin, Lamotrigin, Levetirasetam, okskarbamazepin.

Literatür çalışmalarına bakıldığında; Kwon-Bok Kim ve arkadaşları 2011 yılında ilaç takibi için insan plazmasında basit, doğru hassas olan bir sıvı kromatografisi (LC) kütle spektrometresi (MS/MS) ile 10 farklı insan için önemli antiepileptik ilaçların eş zamanlı olarak ölçülmesi için yöntem geliştirmişlerdir. Plazma örnekleri asetonitril ilavesi ile çöktürülüp ve süpernatantlar alınıp C18 kolonda analiz edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri 50 kat konsantrasyon aralığında doğrusal ve katsayıları tüm AEİ'ler için 0,997'den büyüktür. Gün içi ve günler arası hassaslık %12'den azdır ve doğruluk %85,9 ile %114,5 arasındadır. Bu yöntem başarıyla mono veya tek başına tedavi gören hastalarda AEİ'lerin tanımlanmasında ve kantitatif olarak kullanılmasında başarıyla oluşturulmuştur [7].

A. A. Kadia ve arkadaşları 2013 yılında Fenitoin ve Lamotrijin için tespiti ve ölçümü hızlı, basit, duyarlı ve seçici bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) geliştirmişlerdir. Numuneler sıvı-sıvı ekstraksiyonu

Çizelge 1.1. Antiepileptik ilaçların sınıfı, piyasa adı, kullanıldığı doz, endikasyonları ve yan etkileri [6].

| Etken Madde   | Piyasa Adı                               | Kullanıldığı Doz | Endikasyonlar                                                                                                       | Yan Etkileri                                                                                         |
|---------------|------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Karbamazepin  | Tegretol, Temporal, Karbaleks, Karazepin | 600-1200 mg      | Parsiyel nöbetler, primer ya da sekonder generalize tonik-klonik nöbetler                                           | Bulantı, kusma, mide sıkıntısı, karın ağrısı, iştahsızlık, uyuşukluk, ataksi                         |
| Okskarbazepin | Trileptal, Epsile, Oxilepsi              | 600-1200 mg      | Parsiyel nöbetler, primer ya da sekonder generalize tonik-klonik nöbetler                                           | Baş dönmesi yorgunluk, baş ağrısı, sersemlik ,hafıza kontrol bozuklukları                            |
| Fenitoin      | Epdantoin                                | 200-800 mg       | Parsiyel nöbetler, primer ya da sekonder generalize tonik-klonik nöbetler                                           | Ataksi, konuşma tutukluğu,baş dönmesi, uykusuzluk, geçici sinirlilik hali, kaslarda seğirme          |
| Diazepam      | Diazem                                   | 5-10 mg          | Status epileptikus                                                                                                  | Titreme,sinirlilik, uykusuzluk, baş ağrısı, araba kullanmakta sorun yaşama, kas spazmları            |
| Lorazepam     | Ativan                                   | 2-3 mg           | Status epileptikus                                                                                                  | Kas zayıflığı, depresyon, anksiyete, kabus görme, vücutta ağrılar, terleme, mide bulantısı, kusma    |
| Klonazepam    | Rivotril                                 | 1,5 mg *2 kere   | Parsiyel nöbetler, generalize tonik-klonik, absans, atonik, myoklonik nöbetler                                      | Uyuşukluk, çarpıntı, saç kaybı, cilt döküntüsü, ishal, kabızlık, kuru ağız                           |
| Levetirasetam | Keppra, Epixx, Levend                    | 500 mg           | Primer jenerize tonik-klonik nöbetlerde ve idiyopatik jenerize epilepsili çocuklarda                                | Baş dönmesi, halsizlik, uyuklama hali , bulantı, sinirlilik, duygusal dalgalanmalar,deri döküntüleri |
| Gabapentin    | Neurontin                                | 2000-4000 mg     | Sekonder generalizasyon olsun ya da olmasın parsiyel nöbetler                                                       | Kilo alımı, baş dönmesi, ataksi ve diplomi                                                           |
| Lamotrigin    | Lamictal                                 | 100-200 mg       | Parsiyel nöbetler; primer ve sekonder generalize tonik-klonik, tipik ve atipik absans, atonik ve myoklonik nöbetler | Cilt döküntüsü, uykusuzluk, panik atak, baş dönmesi, baş ağrısı, kusma, çift görme, ataksi           |

ve bir Phenomenex Luna HILIC 3 $\mu$  (2 $\times$ 150 mm) kullanılarak saflaştırılmıştır. PHT için Çoklu Reaksiyon İzleme (MRM) modunda ve LTG için SIM modda çalışılmıştır. İnsan plazmasında PHT ve LTG için Gözlenebilme Sınırı (LOD) sırasıyla 5,17 ng/ml ve 0,13 ng/ml. İnsan plazmasındaki her iki analit için Tayin Sınırı (LOQ) sırasıyla 17,24 ng/ml



ve 0,46 ng/ml. Ayrıca, bu çalışma içsel MRM modundaki standart, bileşiğin en yüksek oranının hesaplanmasında kullanılamaz. SIM modunda belirlenmiştir [8].

Helene Breton ve arkadaşlarının 2005 yılındaki çalışmasında epilepsi tedavisinde sık olarak kullanılan karbamazepin ve okskarbazepin ve 8 tane metabolitleri olan bir yüksek oranda tekrarlanabilir bir sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi yöntemi oluşturulmuşlardır. İnsan kanında analitlerin ayrılması için Zorbax eclipse XD8 C8 analitik kolon kullanarak 50 dakika elde edilmiştir. Analiz, bir elektrosprey iyon kaynağı ile donatılmış bir dört kutuplu kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon geri kazanımı %80-105 metabolitleri arasındadır. Hassaslık %2 ile %13 arasında ve doğruluk %86 ile %112 arasındadır. Bu yöntem plazma örneklerinin analizi için uygun bulunmuştur [9].

Murali Subramanian ve arkadaşları 2008 yılında hem yeni hem de eski antiepileptik ilaçları izlemek için bir yöntem geliştirmişlerdir. Numune ön işlemi, 100 Mililitre (mL)'lik bir plazma numunesindeki tüm AEİ'ler için tek bir katı faz ekstraksiyonundan oluşmaktadır. HPLC ayrılması, asetat tamponu, Metanol (MeOH), Asetonitril (ACN) ve tetrahidrofuranın gradient mobil fazına sahip bir Shimadzu Shim Pack XR-ODS (4,6 id 350 mm, 2,2 mm) kolonunda gerçekleştirilmiştir. Algılama SIM moda yapılarak atmosferik basınçlı kimyasal iyonlaşma (APCI-MS) ile geliştirilmiştir. Tüm bileşikler için geri kazanım (%88-%96) elde edilmiştir. Tüm antiepileptik ilaçlar için kalibrasyon eğrileri  $r^2$  0,99'dan daha yüksek çıkmıştır. Standartlar için doğruluk %89,3'ten %111,8'e çıkmıştır [10].

Courtney Heideloff ve arkadaşları 2010 yılında 10 farklı antiepileptik ilaçların ve metabolitlerin terapötik ilaç takibi için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analizi için bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem 0,4-4,9 ile 21,2-190,9 mg/mL arasında doğrusal bulunmuştur. Geri kazanım ise %80-%114 arasında değişmektedir. Bu, 10 AEİ veya metaboliti ölçmek için uygun basit ve hızlı bir HPLC yöntemi olmuştur. Monolitik kolonun kullanımı, artan bir hassasiyet, daha iyi çözünürlük ve düzenli bir C18 kolonuna kıyasla daha kısa bir analitik süre ile sonuçlanmıştır [11].

Raphael Hösli ve arkadaşları 2018 yılında insan beyin diyalizinde, kanında ve tükürükte fenitoinin ölçülmesi için LC-MS/MS yöntemi geliştirmiş ve yöntemin validasyonu yapıldıktan sonra bir Gaz Kromatografisi (GC-MS) yöntemi ile karşılaştırmışlardır. LC-MS/MS yöntemi, GC-MS yöntemine kıyasla daha yüksek bir performans göstermiştir.

LC-MS/MS yönteminde daha küçük bir numune hacmine (25 µL) ve daha az kimyasal maddeye ihtiyaç duymuşlar ve daha az zaman harcamışlardır. Ayrıca yöntemin daha duyarlı olduğu ve daha düşük LOD (<1 ng/mL) ve LOQ (10 ng/mL) değerleri verdiği görülmüştür. Kalibrasyon eğrisi, test edilen tüm matrisler (kan, tükürük ve diyaliz) için korelasyon katsayıları  $r^2 > 0,995$  olan daha geniş bir aralıkta doğrusallık göstermiştir. Bu çalışma sonucunda rutin analizler için LC-MS/MS yöntemi, GC-MS yöntemine göre önemli avantajlar sunmuştur [12].

Karas K ve arkadaşları 2015 yılında geniş spektrumlu bir antiepileptik ilaç olan levetirasetamın ölçümü için Elektrosprey İyonizasyon Tandem Kütle Spektrometrisine (HPLC-ESI-MS/MS) bağlı yeni, duyarlı ve seçici ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi geliştirmiş ve valide edilmiştir. İnsan plazmasından ve tükürüğünden LEV çıkarmak için çözücü olarak asetonitril kullanılmıştır. 2 dakikalık çalışma süresi boyunca 0,2 ml/dak akış hızında çalışılmıştır. Plazma için µg/mL yöntem 1,0-50,0 kalibrasyon aralığında doğrulanmıştır ve tükürük için 0,5-30,0 µg/mL arasındadır. Bu nedenle, insan plazmasında ve tükürükte LEV tayini için mevcut HPLC-MS/MS yöntemi yüksek duyarlılıktadır, 2 dakikalık kısa çalışma süresiyle hızlıdır ve yüksek örnekler için uygun olmaktadır. Geliştirilen yöntem, daha önceki yayınlanmış LC-MS/MS yöntemlerine kıyasla minimal örnek hazırlama ve daha az plazma örnek hacmi gerektirmektedir [13].

Shaza Deeb ve arkadaşları 2014 yılında kan ve serum örneklerinde aynı anda en sık karşılaşılan AEİ'lerin analizi için eş zamanlı ölçüm yöntemleri yapmışlardır. 22 farklı AEİ'lerin ve metabolitlerin eş zamanlı olarak ölçülmesi için basit, doğru ve uygun maliyetli sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometri metodu geliştirilmiş ve onaylanmıştır. Tüm AEİ'lar 17 dakika içinde tespit edilmiştir. Korelasyon katsayısı 0,995'dir. Tüm analitler için doğruluk %90 ile %113 ve hassasiyet < %13 arasında değişmektedir. İyileşme %70 ile %98 arasındadır. Yöntem, daha önce farklı yöntemler kullanılarak sayısallaştırılmış orijinal vaka örnekleri kullanılarak başarıyla doğrulanmıştır [14].

Nada Kostic ve arkadaşları 2013 yılında Vigabatrin, Pregabalin ve Gabapentin analizi için tandem kütle spektrometresi analizi ile birleştirilen sıvı kromatografi yöntemi kullanmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, tarama süresi, iyon kaynağı geometrisi, kılıf ve yardımcı gaz basıncı, kapiler, sıcaklık, çarpışma basıncı ve hareketli faz bileşimi gibi parametrelerin optimizasyonunun LC-MS/MS yöntemlerinin

duyarlılığı üzerinde pozitif bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Söz konusu ilaçların kanda belirlenmesi için uygun bir yöntem doğrulanmıştır. Yöntemin test edilen konsantrasyon aralığı için mükemmel doğrusallık ile doğru ve kesin olduğu kanıtlanmıştır [15].

Mai Shibata ve arkadaşları 2011 yılında rutin terapötik izlemede 22 antiepileptiğin analizi için Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi (UPLC-MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırıştırma 0,4 mL/dak akış hızında %0,1 formik asit ve metanol içeren bir 10 mM amonyum asetat gradyanlı bir mobil faza sahip bir Acquity UPLC BEH C18 kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tüm antiepileptik ilaçlar 10 dk içerisinde tespit edilmiştir ve ölçülmüştür. Tüm kalibrasyon eğrileri, terapötik aralıkta iyi doğrusallık göstermiştir ( $r^2 < 0,99$ ). Sonuç olarak, antiepileptiklerin rutin terapötik izlenmesi için uygun basit ve seçici bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir [16].

Bu tez çalışması kapsamında sık kullanılan antiepileptik ilaç olan etken maddeleri olan Karbamazepin, Okskarbazepin, Fenitoin, Diazepam, Lorazepam, Klonazepam, Levetirasetam, Gabapentin, Lamotrigin moleküllerinin insan kanının serum kısmı kullanılarak Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) cihazı ile ön hazırlık aşaması basit ve kısa olan eş zamanlı analiz yöntemi geliştirilmesi, LOD, LOQ, % bağıl standart sapma, gün içi tekrarlanabilirlik, günler arası tekrarlanabilirlik ve geri kazanım gibi validasyon parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

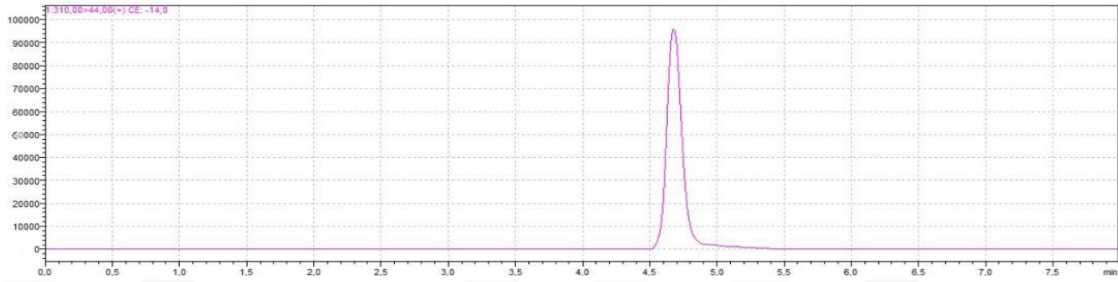
## 1.2. KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER

Kromatografi, bilimin tüm dallarında bulunan ve uygulaması olan güçlü bir ayırma yöntemidir. 20 yy. başlarında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuş ve isimlendirilmiştir. Tswett bu tekniği ise; toz kalsiyum karbonat doldurulmuş bir cam kolondan bitki pigmentleri çözeltisini geçirip birçok bitki pigmentini ayırmak için kullanmıştır. Birbirinden ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar halinde gözüktüğü için bu yöntem kromatografi adını vermiştir. (Yunanca da chroma “renk” ve graphein “yazma” anlamına gelmektedir) [17].

En genel açıklama ise kromatografi, karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri ise hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde maddelerin

ayrılması ve saflaştırılmasıdır. Maddeler hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde, değişik hızlarla hareket eder veya sürüklenirler [18].

Kromatografi bilimin çok geniş ve faydalı bir alanı olduğu için bu alanda yapılan çalışmalardan ötürü şu ana kadar 12 bilim adamı Nobel ödülünü almıştır. Hiçbir çalışma için bu kadar çok Nobel ödülü verilmemiştir [19].



Şekil 1.1. Tek bir standart için örnek bir kromatogram [18].

### 1.2.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

A: Ayrılma Mekanizmalarına Göre;

1. Adsorpsiyon Kromatografisi
2. Partisyon Kromatografisi
3. İyon Değiştirme Kromatografisi
4. Jel Filtrasyon (Moleküler eleme) Kromatografisi
5. İyon Çifti Kromatografisi
6. Affinite Kromatografisi

B: Uygulama Biçimine Göre;

1. Düzlemsel Kromatografi
2. Kağıt Kromatografisi
3. İnce Tabaka Kromatografisi
4. Kolon Kromatografisi
5. Gaz Kromatografisi
6. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi [18].

### 1.2.2. Sıvı Kromatografisi

Kromatografi, 1900 yılında İtalya’da doğan bilim adamı Mikhail Tswett tarafından Rusya’da ilk kez kullanılmıştır. 20. yy. ilk on yıllarında kromatografi ile çalışmaya devam etmiş ve ilk olarak klorofil, karotenler ve ksantofiller gibi bitki pigmentlerinin

ayrılması için çalışma yapmıştır. Bu bileşenler yeşil, turuncu ve sarı gibi farklı renklere sahip oldukları için tekniğe adını vermişlerdir. 1930 ve 1940 yıllarında geliştirilen yeni kromatografi tekniği ile birçok ayırıştırma işlemi için başarılı sonuçlar elde edilmiştir [19].



Şekil 1.2. Mikhail Tswett.

1940'lar ve 1950'ler de Archer John Porter Martin ve Richard Laurence Millington Synge kromatografi tekniğini daha da geliştirmişler ve her iki bilim adamı da Nobel ödülü kazanmışlardır. Bölme kromatografisinin ilkelerini ve temel tekniklerini belirleyip kağıt kromatografisi, gaz kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi birkaç kromatografik yöntemi ilerletmişlerdir ve o zamandan beri kromatografi hızla gelişmiştir [19].



a)

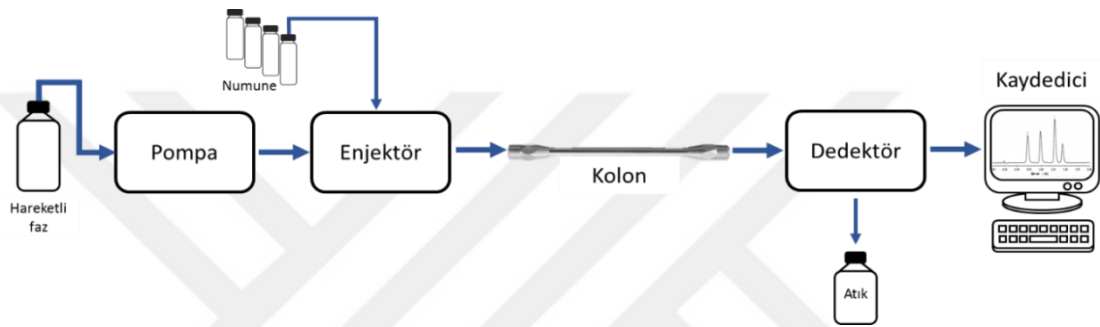
b)

Şekil 1.3. a) Archer John Porter Martin, b) Richard Laurence Millington Synge.

### 1.2.3. HPLC (Yüksek Basınç Sıvı Kromatogramı)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, analitik ayırma teknikleri arasında en fazla kullanılan metottur ve cihazın yıllık satışı bir milyar dolara yakındır. Fazla kullanılmasının sebebi duyarlılığı, kantitatif tayinler için kolayca uyarlanabilir olması, sıcaklıkta kolayca bozulabilen maddelerin ayrılmasını sağlayabilmesidir [17].

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde, küçük boyutlu paslanmaz çelikten bir kolona ve yüzeyi çok küçük partiküllerle doldurulmuş ve sıvı bir tabaka ile kaplanmıştır. Numuneler hareketli faz yardımıyla sabit fazın üzerinden geçerken sabit fazda ve hareketli fazda farklı oranlarla dağılırlar. Dağılma oranı düşük olan maddeler sabit fazda kolunu erkenden terk ederken, yüksek oranda olan maddeler ise sabit fazda kolunu daha geç terk ederler. HPLC cihazlarında kolondan çıkan maddeler dedektörle izlenerek kolondan çıkış zamanları ve miktarları tespit edilirler. Preparatif HPLC de ise maddeler dedektörden çıktıktan sonra farklı kaplarda biriktirilerek fiziksel ayırım sağlanmış olur [20].



Şekil 1.4. HPLC cihazının şematik gösterimi [20].

HPLC genel olarak 5 kısımdan oluşur:

- Pompa: HPLC cihazında sisteme hareketli fazdan alınıp sisteme verilmesi, kolon boyunca yüksek basınçla ilerlemesini, dedektöre ve son olarak atık kabına ulaşmasını sağlayan hareketleri sağlar. İkili veya dördü pompa sistemleri kullanılarak farklı kaplarda bulunan hareketli faz bileşenlerinde su, tampon, metanol gibi çözücüler farklı oranlarda karıştırılıp yapılır.
- Enjektör: Numunenin hareketli fazla birlikte karıştırılarak kolona verilmesini sağlar. Otomatik enjektörler ile bilgisayar kontrolü sağlanarak istenilen zaman ve şartlarda gerçekleştirilir.
- Kolon: Maddelerin ayrımının gerçekleştiği kısımdır. Genel olarak 10-30 cm boyuna ve 4-10 mm çapına sahip ve paslanmaz çelikten bir kolonun küçük partiküllerle doldurulması ile üretilir. Partiküllerin dışı sıvı bir film ile kaplıdır. Kolonun bulunduğu kısım ise genellikle sıcaklık kontrollüdür.
- Dedektör: Kolondan çıkacak maddelerin sinyallerini algılayan kısım olarak bilinir.
- Kaydedici: Dedektör'den çıkan sinyalleri sayısal verilere çevirir ve zamana karşı grafiğe geçirerek kromatogram olarak kaydeder.

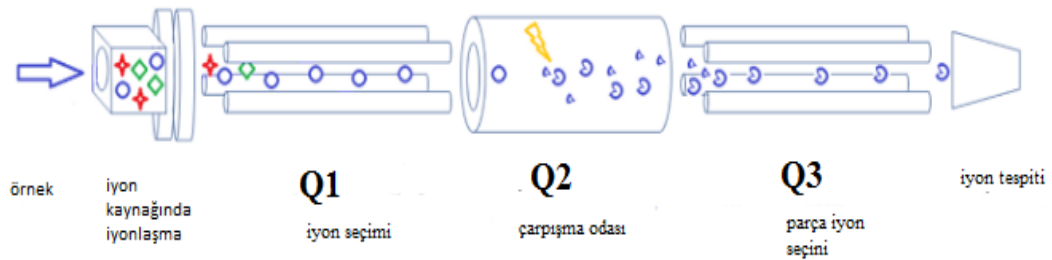


ya da moleküllerden elektron ayrılması sonucu, pozitif yüklü radikal bir katyon oluşturur. Molekülden ayrılan elektronun kütlesi hesaba katılmayacak kadar küçüktür ve gerçekleşen moleküler iyon, molekülün gerçek kütlesine eşit olacaktır.

Madde moleküllerini bombardıman eden elektronların enerjisi artırılıp, moleküler iyonun fazlaca parçalanmalara uğraması da söz konusu olur. Parçalanma ve iyonlaşma sonucunda çeşitli radikal katyonlar, katyonlar, nötr veya radikal parçacıkların bir karışımı gerçekleşir. Bir bileşiğin aynı şartlarda parçalanma şekli kendine özgüdür. Gerçekleşen + yüklü iyonların yükü her zaman +1 olacağından  $m/z$  değeri iyonun kütlesine eşittir. Kütle spektrometresindeki amaç; elektron bombardımanı ile oluşan + yüklü parçacıkların  $m/z$  değerinin bağlı bolluklarına göre grafiğe geçirilmesiyle kütle spektrumu'nu oluşturarak molekülün yapısını tayin eder [19].

#### 1.4. LC-MS/MS YÖNTEMİ

LC-MS/MS tekniğinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde ayrılan moleküller kütle detektörü ile analiz edilmektedir. İyonlaşma odasında iyonlaştırılan ve birincil parçalanmaya uğratılan moleküller filtreden geçerek birinci kuadrupol (Q1)  $m/z$  oranına göre ayırım sağlanır. Tayin yapılacak iyonlar filtreden geçer ve yaramayan iyonlar kalır. Filtreden geçen iyon molekülleri collision gas ile birlikte argon gazı sayesinde parçalanmaya tabi tutulurlar ve ikinci kuadrupol (Q2) filtrede parçalanma sonucu oluşan iyonlar arasından seçilen ikincil iyon dedektöre ulaşır ve ulaşan iyon ile teşhis ve miktar tayini yapılır [21].



Şekil 1.5. Üç kademeli kuadrupol (TSQ) bir kütle analizörü.

Doğada aynı  $m/z$  oranına sahip pek çok molekülün mevcut olmasından dolayı aynı parçalanma iyonlarına sahip birçok molekül vardır. Bu nedenle LC-MS/MS tekniği çok güvenilir ve özgün bir metot olup çok düşük derişimlere kadar miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılar. Ayrıca sonuçların herhangi bir cihaz ile doğrulanmasına



da gerek kalmamaktadır. Standart HPLC tekniğinde madde sadece alıkonma süresine göre teşhis edilirken LC/MS/MS tekniği ile birçok maddenin alıkonma sürelerine ek olarak moleküler iyon ve yavru iyonların da miktarı belirlenmektedir.

Madde enjeksiyondan sonra kolondan geçerek yağlar ve diğer kolon tıkayıcı maddeleri engelleyerek analitik ayırmanın gerçekleştirileceği kolondan mobil faz karışımı içinde geçer. Maddeler kolondan geçerken birbirinden ayrılırlar. Maddelerin ayrımını gerçekleştirmek için istenilen özelliklere göre mobil faz karışımlarını kullanarak istenilen pikleri birbirinden ayırması sağlanır. Kolonla etkileşimde ve madde bileşenlerinin birbirinden ayırmak için yapılacak en iyi yöntemlerden biri polarite ve pH'ını en iyi şekilde optimize etmektir. Maddenin hangi oranda iyonlaşmamış formda bulunacağı ortamın pH değerine bağlıdır ve bu yüzden suya uçucu özellikte tampon çözeltileri katmak önemlidir. Hareketli faz ile normal faz degaze edilerek sisteme hava veya başka gazların girmesi engellenir.

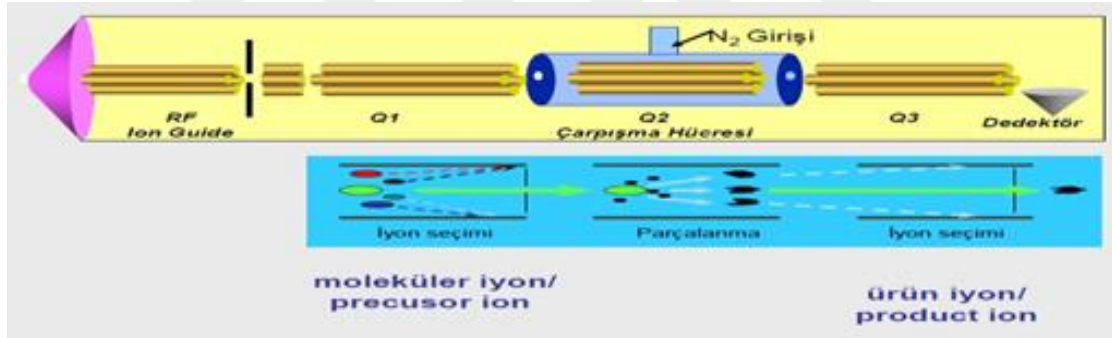
Kolondan çıkan sıvı madde MS'in iyon kaynağına gelir ve Elektro Spray İyonizasyon (ESI) sistemi ile iyonlaşır. Mobil faz içindeki madde veya maddeler, atmosferik basınçta mobil faz yardımıyla iyonlaşma odasına yüksek voltaj olacak şekilde bir iğneden püskürtülürken iyonlaşır, yüklü damlacıkların açığa çıkması için, sıcak kurutucu gaz damlacıkları ile kuruturlar. Damlacıklar küçüldükçe, içindeki yük konsantrasyonu artar. Bir yandan da, iyonlar arasındaki itme kuvveti, atomları bir arada birbirine bağlayan enerji ile iyonlar gaz fazına geçerler ve yüklü iyonlar açığa çıkar voltaj açısından farklı bir levhaya doğru hızlandırılır. Bu levhanın ortasındaki kapiller örnekleme bloğundan geçerek MS detektöre yönlendirilir. İyonlaşmayanlar kısım ise atık borusuna gider [21].



Şekil 1.6. LC-MS/MS sistematik görünümü.

Elektrospray pozitif veya negatif modda çalışabilir. Pozitif modda temel iyonunun yanı sıra ve mobil faz kompozisyonuna bağlı olarak farklı iyonlar da oluşabilir. Negatif mod ise en çok, kararlı sodyum tuzları oluşturabilen asidik ilaçlar için uygundur. Yapısal bilgi için, analit iyonları nötral moleküllerle çarpıştırılarak parçalanmaya uğrar ve çarpışmaya enerji eklemek ve daha fazla parça elde etmek için, analit iyonlarına voltaj uygulanmasıyla yapılır.

Multiple-Stage MS lerde; kapiler boruya giren örnek, burada parçalanır, Birinci Quadrupol (Q1) iyon seçmek için kullanılır. Çarpışma hücresi (Q2) gerçekleşir. Q2, gazla dolu bir odada radyo frekanslı bir quadrupol'dur. Q2, seçilen öncül iyonlardan yavru iyonların elde edildiği hücredir. Parça İyon Seçimi (Q3) sadece tek bir ikincil iyonlardan çıkan maddeleri filtre eder. Sadece bu iyon dedektöre ulaşır ve bu iyonlardan nicel tayin ve nitel tayin gerçekleştirilebilir. Birincil parçalanmadan çıkan iyonun ikinci kez parçalanması ve bu parçalanmadan elde edilen o analite özgü karakteristik iyonun izlenmesi işlemine çoklu reaksiyon izleme (MRM) denir. MRM işleminin duyarlılığı ise oluşan ikincil iyonun miktarını belirler. Q3'ten dedektöre gelen iyonlar sayılır.



Şekil 1.7. MS/MS sıralı kütle analizörü.

Quadrupol kütle analizörleri scan modu ve SIM modu olarak iki modda çalışırlar. Scan modunda, kütle analizörü geniş bir aralıkta farklı m/z oranlarına sahip iyonları izlerken, SIM modunda ise, sadece belli m/z oranına sahip parçaları izler. Daha duyarlı olmasının yanında, daha az iyon hakkında bilgi verir. Scan mod, tipik olarak önceden tüm analit kütlelerinin bilinmediği zaman, kantitatif analiz için de kullanılır. SIM mod ise, hedef bileşiklerin tayini ve izlenmesi amacıyla kullanılır [21].

## 1.5. ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Validasyon kelime anlamı geçerlilik anlamına gelmektedir. Analitik validasyon için kastedilen metodun uygulanan laboratuvar şartlarında kullanılması için uygunluğunun belirlenmesi amacıyla yapılan işlemlerdir. Yani validasyon her derecede aynı işlemi uygulayıp aynı sonuçların elde edilmesidir [22]. Analitik yöntem validasyonu, çalışması yapılmış olan bir metod için o metodun doğruluğu, kesinliği, tekrarlanabilirliği ve tayin sınırları hakkında değerlendirmeler yapılabilir aksi halde o metod için yapılacak değerlendirmeler anlamını kazanmış olmayacaktır. Geliştirilen yöntemler aşağıdaki parametreler eşliğinde değerlendirilerek valide edilip güvenliği sağlanmıştır. Analitik yöntemin validasyonu sırasında FDA'in ve Eurachem Klavuzunun belirlediği bazı parametreler çalışılarak yöntem geçerliliği gösterilmiştir [23].

### 1.5.1. Validasyon Parametreleri

**Seçicilik/Özgünlük:** Analitik yöntemin amaçlanan bileşen veya bileşenleri tayin edebilme yeteneği olarak kabul edilir. Analizi yapılacak numunede var olan ve analizi yapılan madde ile benzer özellik gösteren diğer bileşenlerin girişimlerinden ayrı olarak maddenin ölçülebilme kapasitesidir [24].

**Gözlenebilme Sınırı (LOD):** Kullanılacak metodun laboratuvar şartlarında tespit edilebildiği en küçük analit derişimidir. Sinyal ve gürültü oranını 3 olduğu değer LOD değeridir [25].

**Alt Tayin Sınırı (LOQ):** LOQ değeri uygun doğruluk ve kesinlikle miktarı saptanabilen en küçük derişim olarak tanımlanır. Zemin gürültüsünden farklı olarak hesaplanır ve kabul görür. Hesaplama ise standart sapmanın kalibrasyon eğrisinin eğimine oranının 10 katı ile çarpımıyla bulunur [25].

**Doğruluk:** Analitik yöntemin doğruluğunu genelde ölçülen değer doğru ya da doğru kabul elden değerlerin yakınlığı ile ölçülür. Doğruluk değerinin ölçülmesi bilinen bir konsantrasyonun tekrarlanan analizleri ile belirlenir. Belirlenen konsantrasyonda genellikle en az 3 konsantrasyonda 5 ölçüm gereklidir. Doğruluk için gerçek sonuçtan %20'den fazla sapma olmaması gerekir. Ortalama değer ise gerçek sonucun  $\pm$  %15 sınırı içinde olmalıdır [22].

**Çalışma Aralığı:** Metodun uygulanabileceği analit konsantrasyon aralıklarını tanımlar. LOQ çalışma aralığının alt sınırı olarak kabul görür. Çalışma aralığının en üst sınırı

analitik duyarlılıkta bozulduğu yer olarak belirlenir [22].

**Kalibrasyon Duyarlılığı:** Cihazın ya da yöntemin kalibrasyon duyarlılığı analit konsantrasyonundaki küçük farkları ayırt edebilme ya da konsantrasyonları saptayabilme yeteneği olan standart kalibrasyon eğrisinin eğimidir [24].

**Geri Kazanım:** Analizi yapılan maddelerin çalışma ortamından hangi oranda geri alınabildiğini gösterebilmek ve dolayısıyla numunenin etken madde üzerindeki etkisinin olup olmadığını gözlemlemek ve incelemek için kullanılan bir parametredir. Geri kazanım deneyleri genellikle 3 farklı konsantrasyonda yapılmalıdır. Bunlar genellikle doğrusallık bölgesinin düşük, orta ve yüksek derişim bölgelerinden birer değerin gerçekleştirilmesiyle olur. Seçilen her bir konsantrasyon için 5 ölçüm yapılarak hesaplanır [24].

**Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık:** Analitik bir prosedürün doğrusallığı belirli bir aralık dahilinde test yapabilme yeteneğidir. Kalibrasyon eğrisi her madde için oluşturulmalıdır. Uygun bir konsantrasyon aralığı seçilerek, cihaz cevabının analitin konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesiyle doğrusal bir ilişki elde edilir. Elde edilen regresyon katsayısı,  $r^2 \geq 0,95$  olmalıdır. Standart bir eğri ise, en az 5 en fazla ise 8 standart nokta içermeli ve tekrarlanabilir olmalıdır. Bu yöntemde, belli bir çalışma aralığında genellikle doğrusallık gösteren eğriler elde edilir. Çünkü, bunlar doğrusal olmayan kalibrasyon eğrilerine göre daha az hata verir. Kalibrasyon eğrisinde LOQ'nun %20'den büyük, LOQ dışındaki standartların ise %15'den büyük sapma göstermemesi gerekmektedir [26].

**Kesinlik:** Aynı şartlarda ve aynı yöntemle metottaki sonuçların birbirine ne kadar yakın olduğunun ölçüsüdür. Yani başka bir deyişle ölçümlerin tekrarlanabilirliğini göstermek için kullanılır. Analitik yöntemin kesinliği gerçek homojen ve orijinal bir numune kullanılarak ölçümlerin tekrarlanmasıyla kolaylıkla bulunur. Tekrarlanabilirlik ise aynı analizci, aynı yöntem, aynı cihaz, aynı alet hatta aynı laboratuvarında kısa sürede uygulaması ile sağlanır [24].

**Stabilite:** Bir analitin amaçlanan saklanma ısısında, donma veya çözme etkisinde, oda sıcaklığında ya da diğer çevresel faktörlerin etkisindeki stabilitesi olarak tanımlanır. Stabilite, istenilen saklanma süresinin bitmesinden sonra yeni hazırlanmış çözeltileri karşılaştırılarak tespit edilir [24].

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

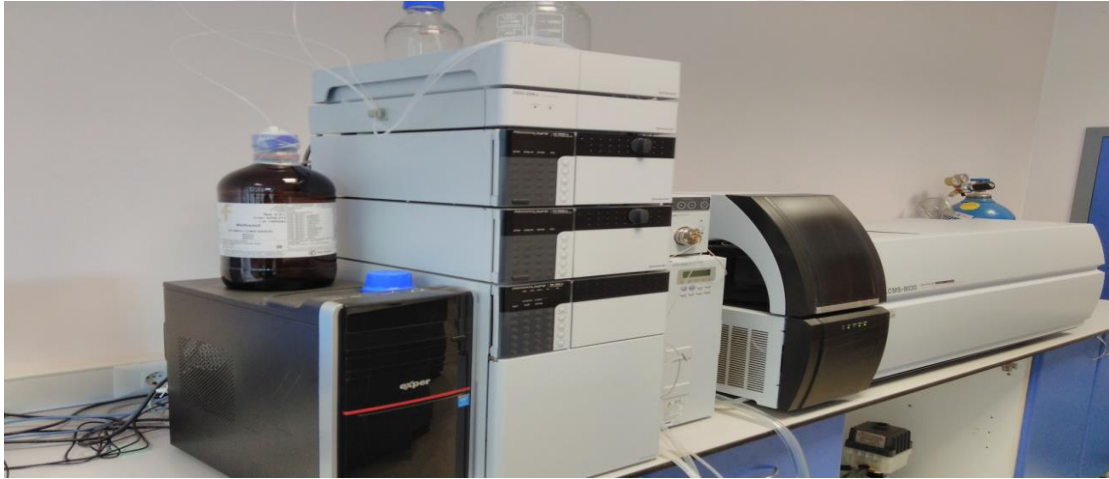
### 2.1. KULLANILAN STANDART ÇÖZELTİLER VE CİHAZLAR

Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasalların firma, seri numarası, son kullanma tarihi.

| Kimyasallar<br>ve Standartlar | Firma           | Seri<br>Numarası | Son Kullanma<br>Tarihi |
|-------------------------------|-----------------|------------------|------------------------|
| Karbamazepin                  | Sigma-Aldrich   | 298-46-4         | 04.2020                |
| Okskarbazepin                 | Sigma-Aldrich   | 28721-07-5       | 09.2019                |
| Fenitoin                      | Sigma-Aldrich   | 57-41-0          | 01.2020                |
| Diazepam                      | Sigma-Aldrich   | 439-14-5         | 06.2019                |
| Lorazepam                     | Sigma-Aldrich   | 846-49-1         | 12.2019                |
| Klonazepam                    | Sigma-Aldrich   | 1622-61-3        | 05.2020                |
| Levetirasetam                 | Sigma-Aldrich   | 102767-28-2      | 02.2020                |
| Gabapentin                    | Sigma-Aldrich   | 60142-96-3       | 08.2019                |
| Lamotrigin                    | Sigma-Aldrich   | 84057-84-1       | 08.2019                |
| Asetonitril                   | Sigma-Aldrich   | 75-05-8          | 03.2019                |
| FormikAsit                    | Sigma-Aldrich   | 64-18-6          | 03.2020                |
| Metanol                       | Sigma-Aldrich   | 67-56-1          | 02.2021                |
| Amonyum format                | Sigma-Aldrich   | 540-69-2         | 09.2020                |
| Su                            | Human Ultrapure | -                | -                      |

Çizelge 2.2. Deneyde kullanılan cihazların özellikleri.

|                      |                                                  |
|----------------------|--------------------------------------------------|
| Sıvı sistem (LC)     | Shimadzu DGU-20A3R                               |
| Kütle sistem (MS/MS) | Shimadzu Upgrade with UF-Lens LC/MS/MS 8030/8040 |
| Kolon                | XB-C18 Welch 2,1x150x3µm                         |
| Yazılım              | Labsolution                                      |
| Ultra saf su cihazı  | Human Ultrapure                                  |
| Hassas terazi        | Precisa XB 220A                                  |
| Mikro pipetler       | Eppendorf, Brand                                 |
| Vorteks              | Jeio Tech                                        |
| Buzdolabı            | Vestel                                           |
| Derin dondurucu      | Vestel                                           |
| Santrifüj            | Nüve NF 800                                      |
| Ultrasonik banyo     | Lapcompanion UCP-02                              |
| pH metre             | XS Instruments 50+                               |
| Filtre               | Welchrom Syringe Filter PTFE 25mm                |



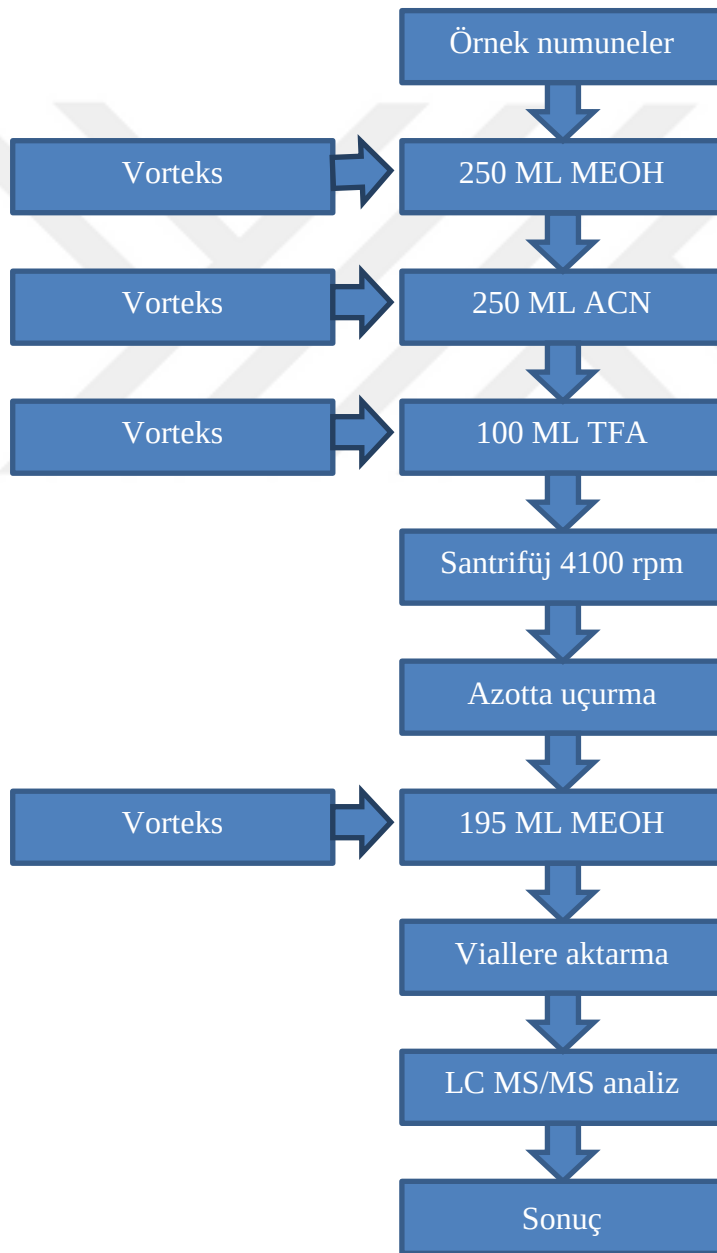
Şekil 2.1. LC-MS/MS cihazı.

## 2.2. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

### 2.2.1. Örnek Numunelerin Hazırlanması

Bu çalışmamızda cihaza enjeksiyon yapılan tüm çözeltiler insan kanının serum kısmı kullanılarak hazırlanır. Ana iyon tarama, MRM optimizasyonu, kalibrasyon çözeltileri, metot validasyonu için verilen tüm kan numunelerden 500 mikrolitre (µL) alınır.

Sırasıyla 250'şer  $\mu\text{L}$  metanol ve asetonitril eklenip 2'şer dakika vortekslenir. Sonra 100  $\mu\text{L}$  Trifloro Asetik Asit (TFA) eklenip tekrar 2 dakika vortekslenir. Oluşan çözeltiler 10 dakika 4100 rpm'de santrifüjlendikten sonra süpernatant kısımları alınır. Süperlant kısımları falkon tüpüne alındıktan sonra azotta soğuk uçurma yapılarak çözücülerin uzaklaşması sağlanır. Daha sonra falkon tüpünde kalan kalıntılar için 200  $\mu\text{L}$  hareketli faz A'dan eklenerek 10 dakika vortekslenir. Tekrar 10 dakika 4100 rpm'de santrifüjlendikten sonra süpernatant kısmı alınıp viallere aktarılır ve cihaz için enjeksiyona hazır hale gelir.



Şekil 2.2. Örnek numunelerin hazırlanış sırası.

### 2.2.2. Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

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

Karbamazepin, okskarbazepin, fenitoin, diazepam, lorazepam, klonazepam, levetirasetam, gabapentin ve lamotriginin iç standart 10 mg alınıp son hacim 100 mL olacak şekilde %99,9 saflıkta metanol veya ultra saf su kullanılarak her bir etken maddesi çözülür. Çözeltiler kullanılmaya başlayıncaya kadar + 4°C’de bekletilerek bozulması önlenmiştir.

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

Ana stok çözeltiden 1 mL alınıp %99,9 saflıkta metanol ile 100 mL ye tamamlandı ve kalibrasyon eğrileri tanımlanacak olan karbamazepin, okskarbazepin, fenitoin, diazepam, lorazepam, klonazepam, levetirasetam, gabapentin ve lamotriginin ilaç etken maddelerinin ara stok çözeltilerinden 1 mL alınıp 2 mL’ye insan kanının serum kısmı ile tamamlanır. Elde edilen  $500 \text{ ng.mL}^{-1}$  çözelti, insan kanının serum kısmı kullanılarak  $100 \text{ ng.mL}^{-1}$ ,  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ,  $25 \text{ ng.mL}^{-1}$ ,  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ,  $5 \text{ ng.mL}^{-1}$ ,  $2,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ ,  $1 \text{ ng.mL}^{-1}$  konsantrasyonlarına ayarlanır. Her bir çözelti viallere hazırlanır ve kalibrasyon eğrisi çizimi için hazır hale getirilir.

### 2.2.3. Mobil Fazların Hazırlanması

**Mobil faz A** : 2 mM amonyum format çözeltisi, formik asit oranı %0,1’lik olacak şekilde hazırlanır ve 10 dakika süre ile ultrasonik banyoda bekletilir.

**Mobil faz B** : Son hacimde %0,1’lik formik asit olacak şekilde 1 L 99,9 saflıkta metanol hazırlanır ve ultrasonik banyoda 10 dakika süre ile bekletilir.

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

### 2.3. LC- MS/MS ÇALIŞMA ŞARTLARI

Metot validasyon çalışmalarını yapmak için kullanılan Shimadzu marka LC/MS-MS 8030 model sıvı kromatografi (LC) cihazı ile kütle spektrometresi (MS) cihazlarının tandem hale getirilmesiyle kullanılmıştır. Validasyon için en iyi çalışma şartları belirlenmiştir. Cihazın parametreleri ve çalışma şartları her bir parametre için Çizelge 2.3’de tablo halinde gösterilmiştir.



Çizelge 2.3. LC- MS/MS çalışma şartları.

|                       |                                                   |
|-----------------------|---------------------------------------------------|
| Akış Hızı             | 0,3 mL/dk                                         |
| Enjeksiyon Hacmi      | 10 µL                                             |
| Analiz Süresi         | 15 dakika                                         |
| Kolon Fırın Sıcaklığı | 45°C                                              |
| Mobil Faz A           | %0,1'lik formik asit- 2 mM amonyum format tamponu |
| Mobil Faz B           | %0,1'lik formik asit- %99;9'luk 2 mM metanol      |
| Collision Energy (CE) | 35                                                |
| Collision Gas         | N <sub>2</sub>                                    |
| Dwell Time            | 100 milisaniye                                    |
| İyon Kaynağı          | Elektro sprey iyonizasyon                         |
| Pompa Programı        | Gradient                                          |

### 2.3.1. LC-MS/MS Sıvı Sistemi Akış Özellikleri

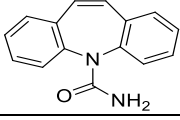
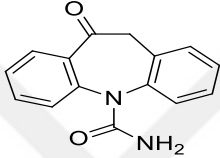
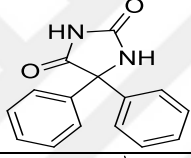
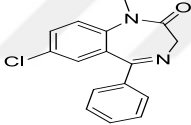
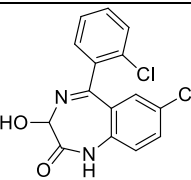
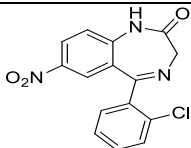
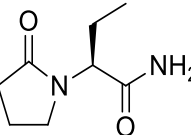
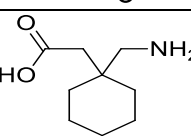
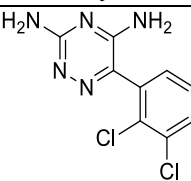
HPLC üzerinde uygulanan akış diyagramı parametreleri Çizelge 2.4'de görülmektedir.

Çizelge 2.4. LC-MS/MS sıvı sistemi gradiyent özellikleri.

| Zaman Tablosu | Zaman(dk) | Akış(ml/dk) | Mobil FazA(%) | Mobil FazB(%) |
|---------------|-----------|-------------|---------------|---------------|
| 1             | 0,01      | 0,4         | 90            | 10            |
| 2             | 5         | 0,4         | 10            | 90            |
| 3             | 13        | 0,4         | 10            | 90            |
| 4             | 13.01     | 0,4         | 90            | 10            |
| 5             | 15        | 0,4         | 90            | 10            |

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 3.1. Her bir etken maddenin, kimyasal yapısı, ana iyonu, yavru iyonu parametreleri ve iyonlaşma türleri.

| İlaçlar       | Molekül Şekli                                                                       | Ana İyon | Ürün İyon | Giriş Basınç (Q1) | Çıkış Basınç (Q2) | Kapiler Voltaj (CE) | İyonlaşma Türü |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|-------------------|-------------------|---------------------|----------------|
| Karbamazepin  |    | 236,80   | 194,10    | -16               | -22               | -20                 | +              |
|               |                                                                                     |          | 193,10    | -15               | -21               | -32                 |                |
| Okskarbazepin |    | 253,20   | 180,10    | -19               | -20               | -31                 | +              |
|               |                                                                                     |          | 236,10    | -12               | -26               | -13                 |                |
| Fenitoin      |   | 253,10   | 180,10    | -19               | -20               | -31                 | +              |
|               |                                                                                     |          | 236,05    | -19               | -26               | -13                 |                |
| Diazepam      |  | 285,10   | 154,20    | -30               | -27               | -28                 | +              |
|               |                                                                                     |          | 222,30    | -30               | -20               | -27                 |                |
| Lorazepam     |  | 321      | 275,10    | -16               | -28               | -23                 | +              |
|               |                                                                                     |          | 303,10    | -16               | -20               | -13                 |                |
| Klonazepam    |  | 316      | 241,20    | -22               | -28               | -51                 | +              |
|               |                                                                                     |          | 270,20    | -16               | -20               | -28                 |                |
| Levetirasetam |  | 170,90   | 126,05    | -17               | -19               | -15                 | +              |
|               |                                                                                     |          | 69        | -17               | -29               | -28                 |                |
| Gabapentin    |  | 172,15   | 154,25    | -19               | -14               | -16                 | +              |
|               |                                                                                     |          | 54,95     | -11               | -22               | -26                 |                |
| Lamotrigin    |  | 256,09   | 109       | -21               | -16               | -28                 | +              |
|               |                                                                                     |          | 211       | -22               | -25               | -35                 |                |

### 3.1. ALIKONMA ZAMANLARI

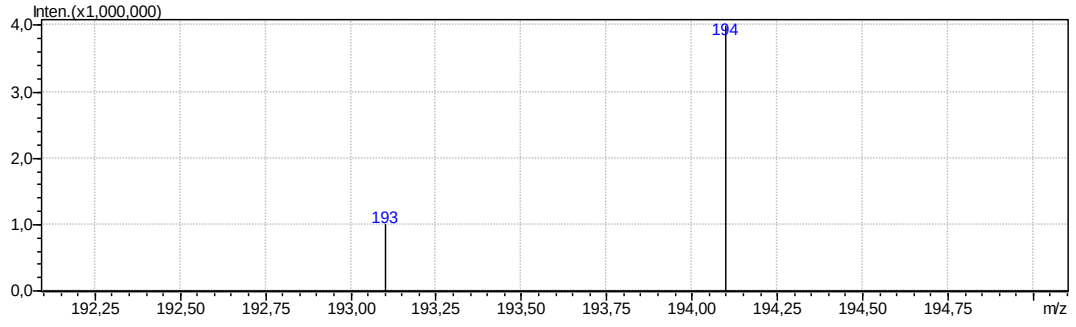
Her bir ilaç etken maddelerinin kendine has bir alıkonma zamanları vardır ve Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Her bir etken maddenin alıkonma zamanları.

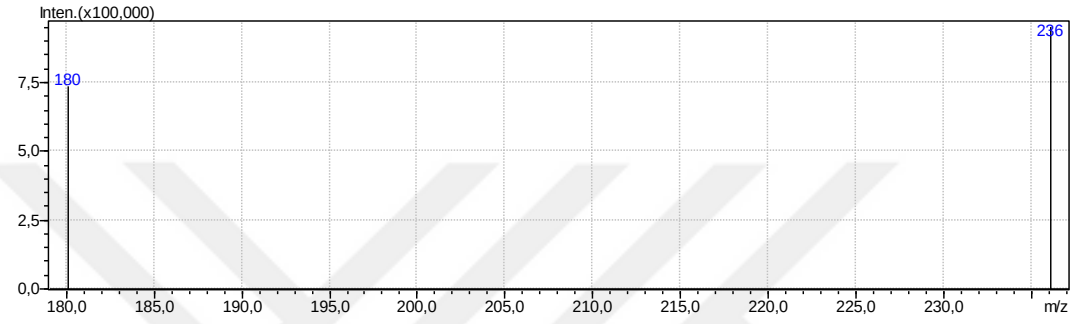
| İlaç Etken Madde | Alıkonma Zamanları |
|------------------|--------------------|
| Karbamazepin     | 8,55               |
| Okskarbazepin    | 7,82               |
| Fenitoin         | 7,45               |
| Diazepam         | 9,82               |
| Lorazepam        | 9,07               |
| Klonazepam       | 8,64               |
| Levetirasetam    | 5,50               |
| Gabapentin       | 6,32               |
| Lamotrigin       | 5,27               |

### 3.2. MRM SPEKTRUMLARI

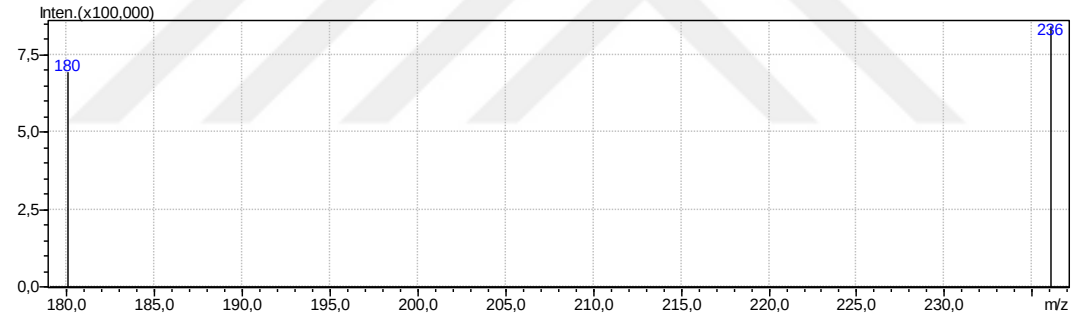
Çoklu reaksiyon izleme, tek bir deneyde yüzlerce hedeflenen ilaçların eşzamanlı olarak nicelendirme için kullanılır. Son derece hassas, spesifik ve uygun maliyetli analiz sunmaktadır. Bu etken maddeler Q1 de hedef analitin sağlam iyonlarına karşılık gelen belirli bir kütle yük oranına sahip iyonları seçici olarak iletir. Öncü iyonlar daha sonra nötr gazlı bir çarpışma hücreinde Q2 ayrışmaya tabi tutulur. Bu işlem analitin parça iyonlarını üretir. Önceden seçilen ana ve yavru iyon çiftleri daha sonra üçüncü dört kutuplu Q3 tarafından izlenir. İletilen iyonlar kütle spektrometresinde iyon detektöre ulaşır ve tespit edilen sinyallerden kopan en yüksek piklerin spektrumları Şekil 3.1’de verilmiştir.



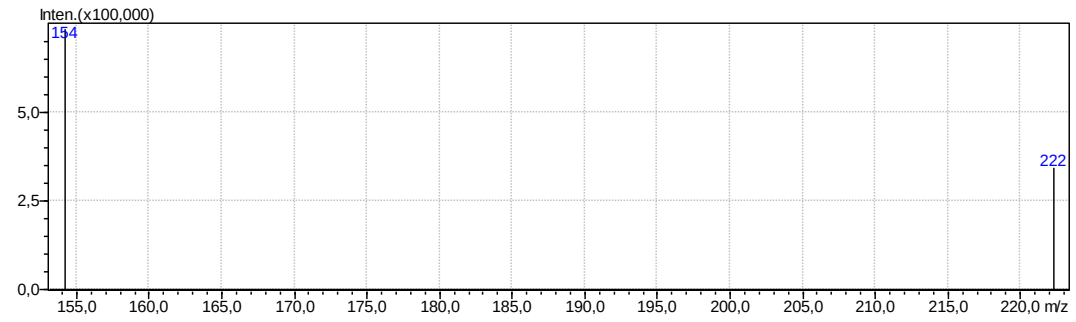
a)



b)

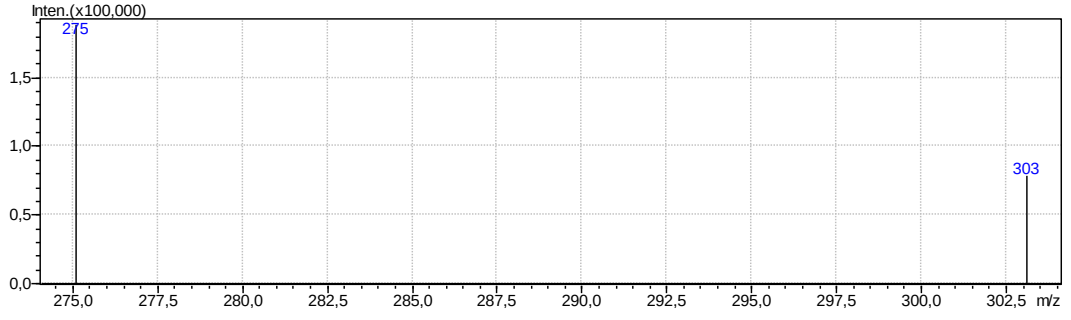


c)

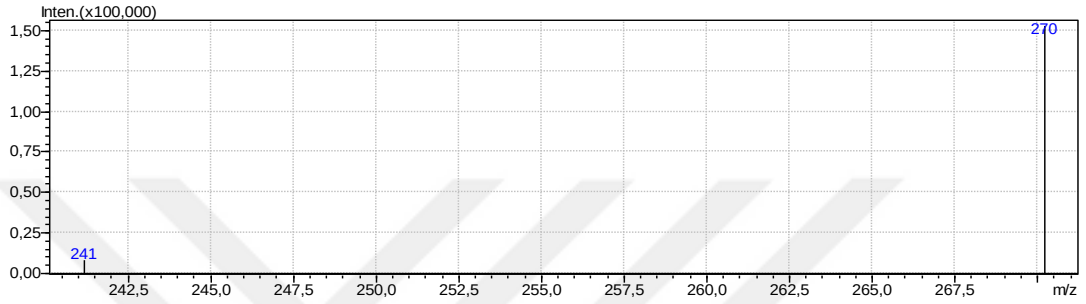


d)

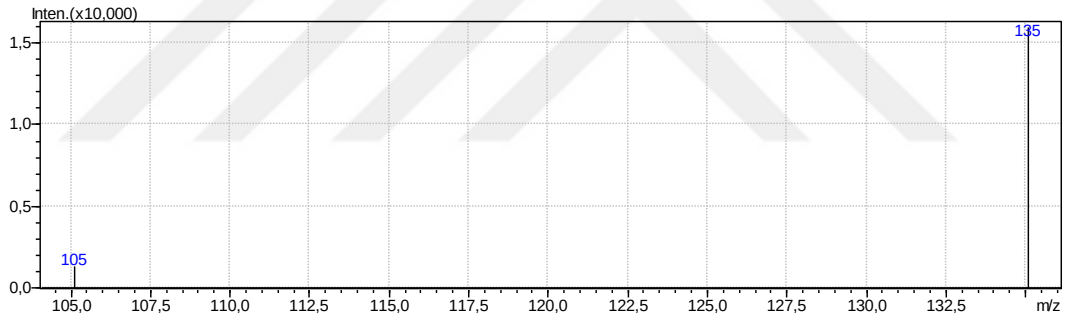
Şekil 3.1 (devam) Her bir etken maddenin mrm spektrumları a) Karbamazepin b) Okskarbazepin c) Fenitoin d) Diazepam e) Lorazepam f) Klonazepam g) Levetirasetam h) Gabapentin ı) Lamotrigin.



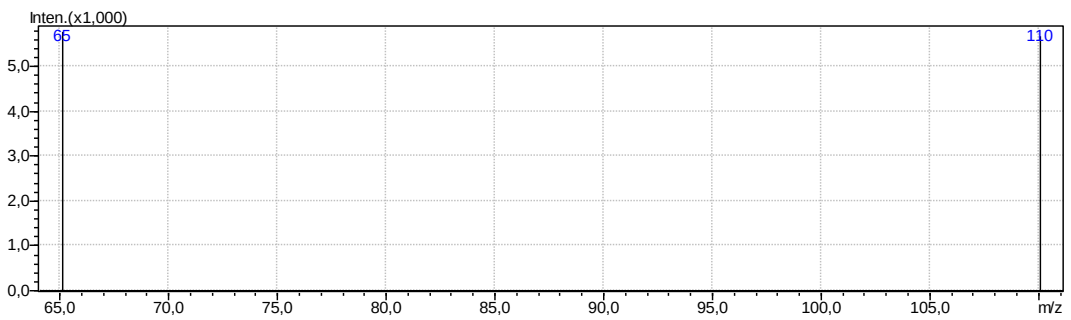
e)



f)

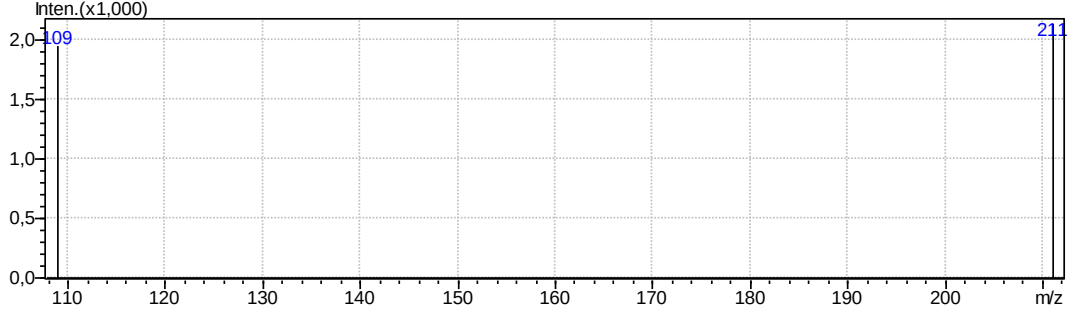


g)



h)

Şekil 3.1 (devam) Her bir etken maddenin mrm spektrumları a) Karbamazepin b) Okskarbazepin c) Fenitoin d) Diazepam e) Lorazepam f) Klonazepam g) Levetirasetam h) Gabapentin i) Lamotrigine.

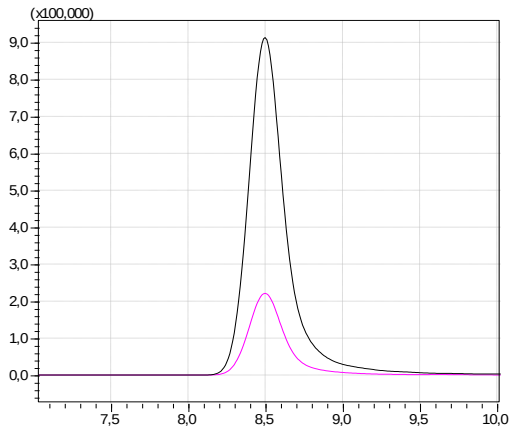


1)

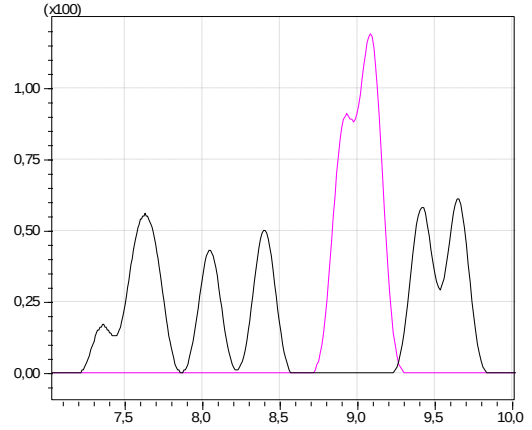
Şekil 3.1. Her bir etken maddenin mrm spektrumları a) Karbamazepin b) Okskarbazepin c) Fenitoin d) Diazepam e) Lorazepam f) Klonazepam g) Levetirasetam h) Gabapentin i) Lamotriginin.

### 3.3. ÖZGÜNLÜK/SPEŞİFİKLİK

İnsan kanının serum örneklerinde biyolojik matriksten yararlanılarak tüm etken maddeler son konsantrasyonları  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$  olacak şekilde 10'ar ( $n \geq 6$ ) kez LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. İlaç etken maddelerinin spesifik alıkonma zamanların da herhangi bir pikin olup olmadığı incelenmiştir. Şekillerde görüldüğü gibi etken maddelerin her birinin alıkonma zamanları ve boş olarak verilen numunelerin o spesifik dakikalarda herhangi bir pik olmadığı her etken madde için gösterilmiştir. İlk verilenler pikler dolu diğer verilen pikler ise boş olarak görülmektedir.

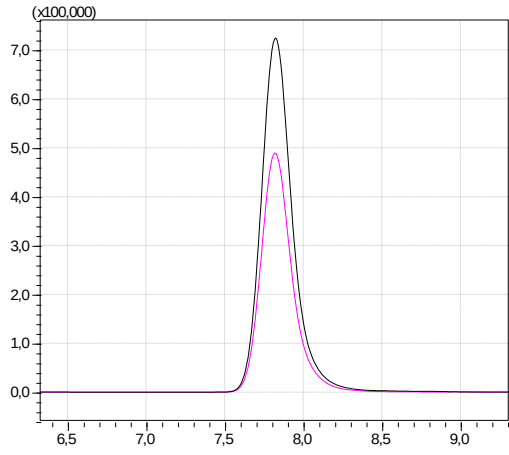


a)

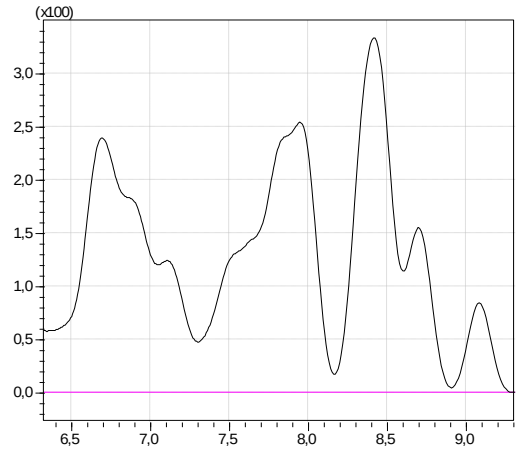


b)

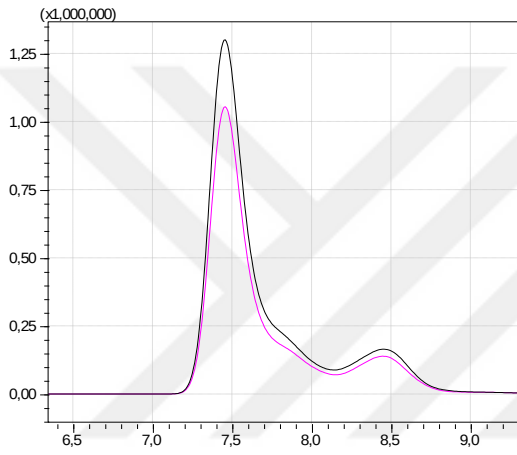
Şekil 3.2 (devam) Her bir etken madde için alıkonma grafikleri (a-b) Karbamazepin (c-d) Okskarbazepin (e-f) Fenitoin (g-h) Diazepam (i-j) Lorazepam (k-l) Klonazepam (m-n) Levetirasetam (o-p) Gabapentin (r-s) Lamotriginin.



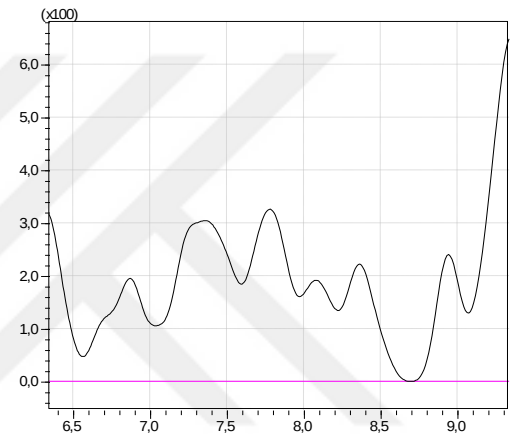
c)



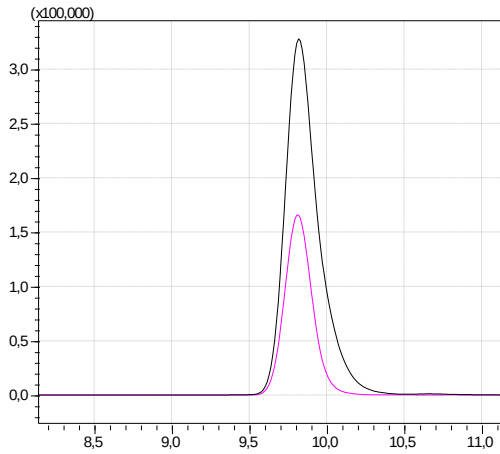
d)



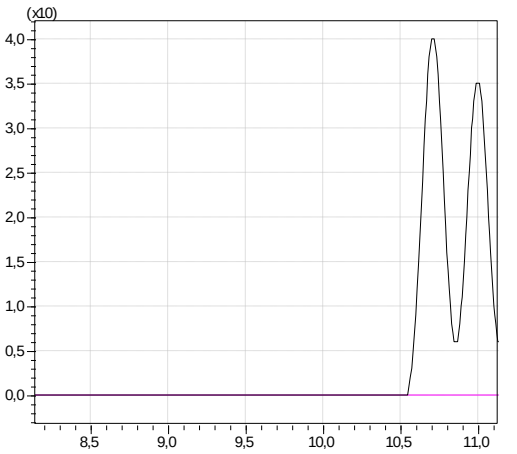
e)



f)

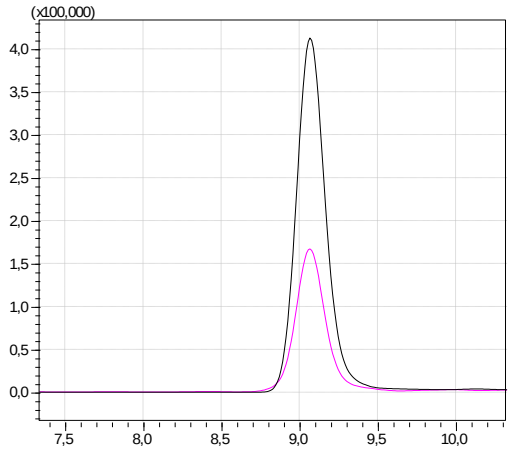


g)

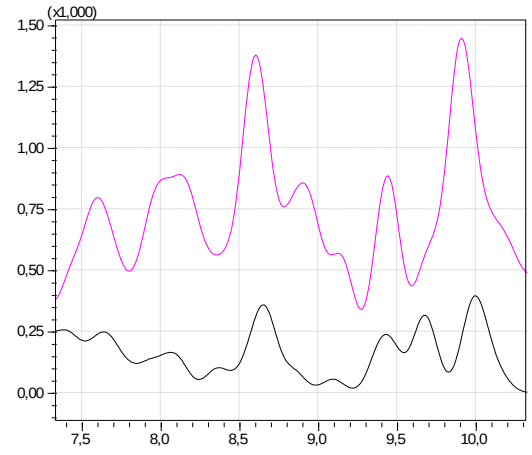


h)

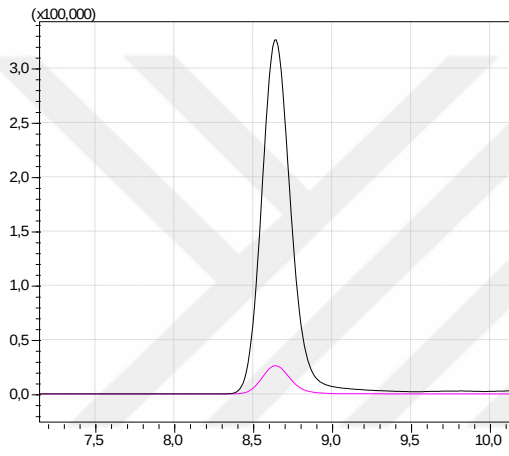
Şekil 3.2 (devam) Her bir etken madde için alıkonma grafikleri (a-b) Karbamazepin (c-d) Okskarbazepin (e-f) Fenitoin (g-h) Diazepam (ı-j) Lorazepam (k-l) Klonazepam (m-n) Levetirasetam (o-p) Gabapentin (r-s) Lamotriglin.



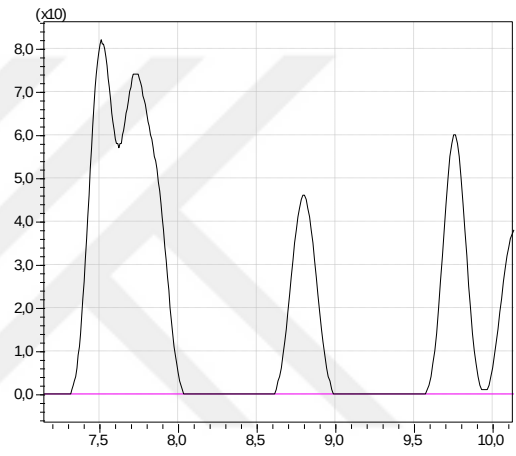
i)



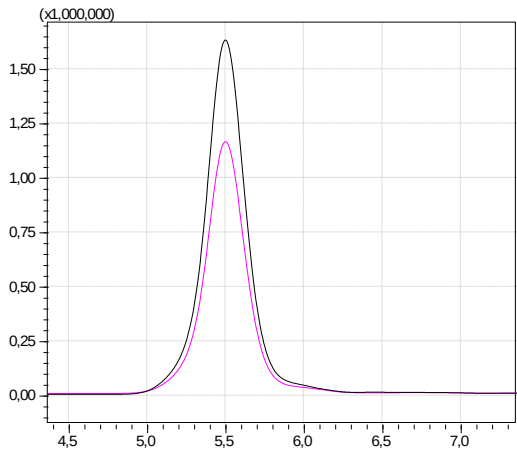
j)



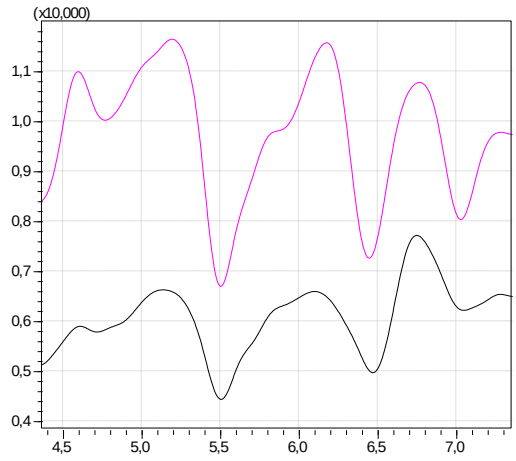
k)



l)



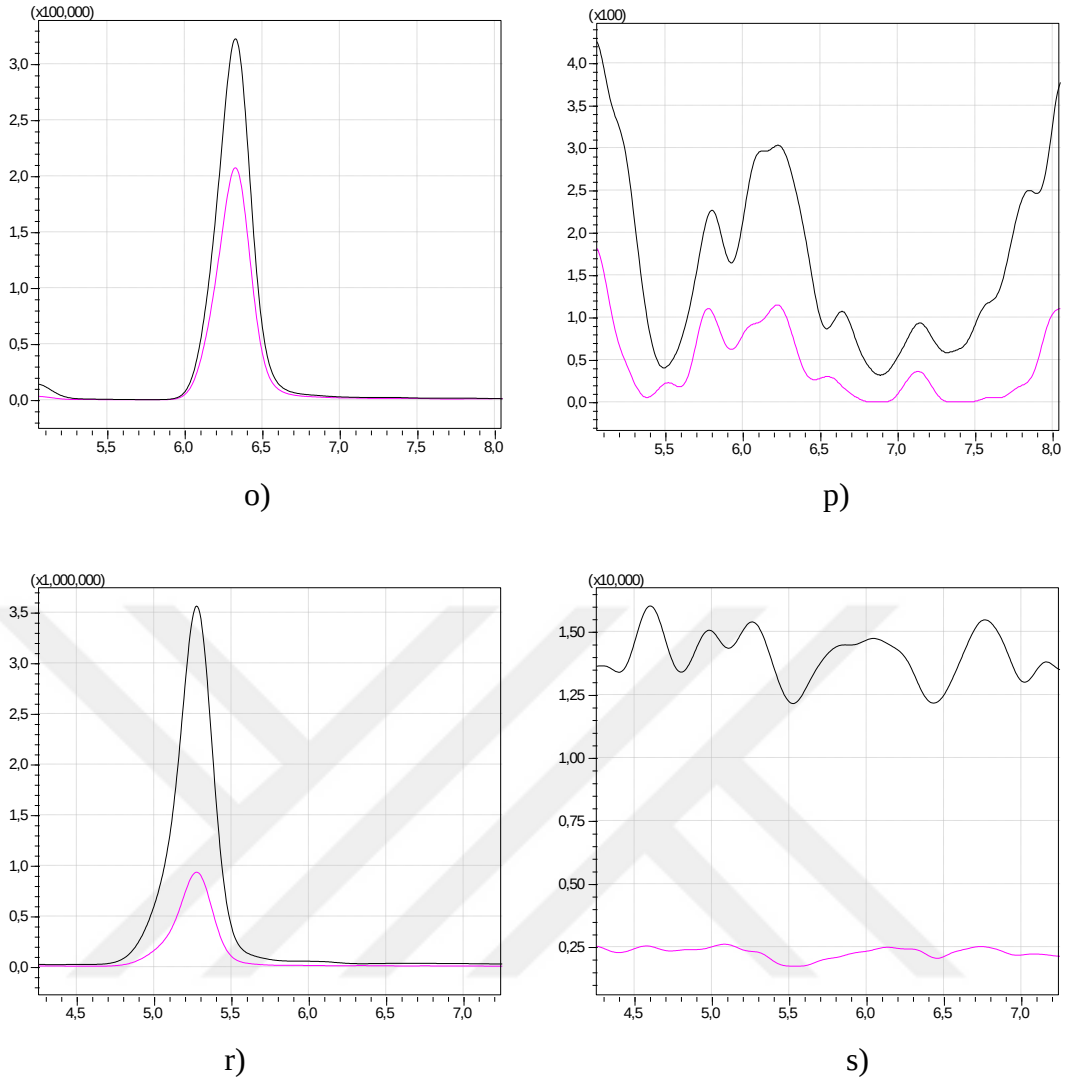
m)



n)

Şekil 3.2 (devam) Her bir etken madde için alıkonma grafikleri (a-b) Karbamazepin (c-d) Okskarbazepin (e-f) Fenitoin (g-h) Diazepam (ı-j) Lorazepam (k-l) Klonazepam (m-n) Levetirasetam (o-p) Gabapentin (r-s) Lamotrigin.



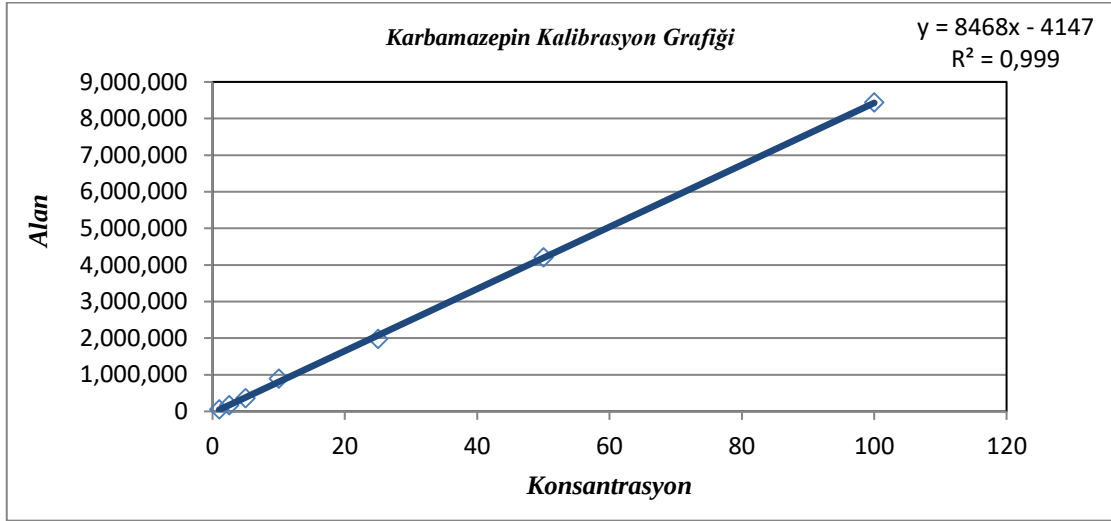


Şekil 3.2. Her bir etken madde için alıkonma grafikleri (a-b) Karbamazepin (c-d) Okskarbazepin (e-f) Fenitoin (g-h) Diazepam (ı-j) Lorazepam (k-l) Klonazepam (m-n) Levetirasetam (o-p) Gabapentin (r-s) Lamotrigin.

### 3.4. KALİBRASYON EĞRİSİ VE DOĞRUSALLIK

İnsan kanının serum örneklerinde 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 ng.mL<sup>-1</sup> yedi farklı konsantrasyondan her birinden beş ölçüm yapılmıştır ve en iyi sonuçlar alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Karbamazepin, Okskarbazepin, Fenitoin, Diazepam, Lorazepam, Klonazepam, Levetirasetam, Gabapentin ve Lamotrigin maddeleri için kanın serum halinde çizilmiş olan kalibrasyon eğrileri görülmektedir. Her bir konsantrasyon için belirli bir aralıkta doğrusal bir grafik çizilmiş ve denklem otomatik olarak cihazda hesaplanmıştır. Regresyon katsayısı her bir etken madde için > 0,99 olarak hesaplanmıştır.

Karbamazepin;

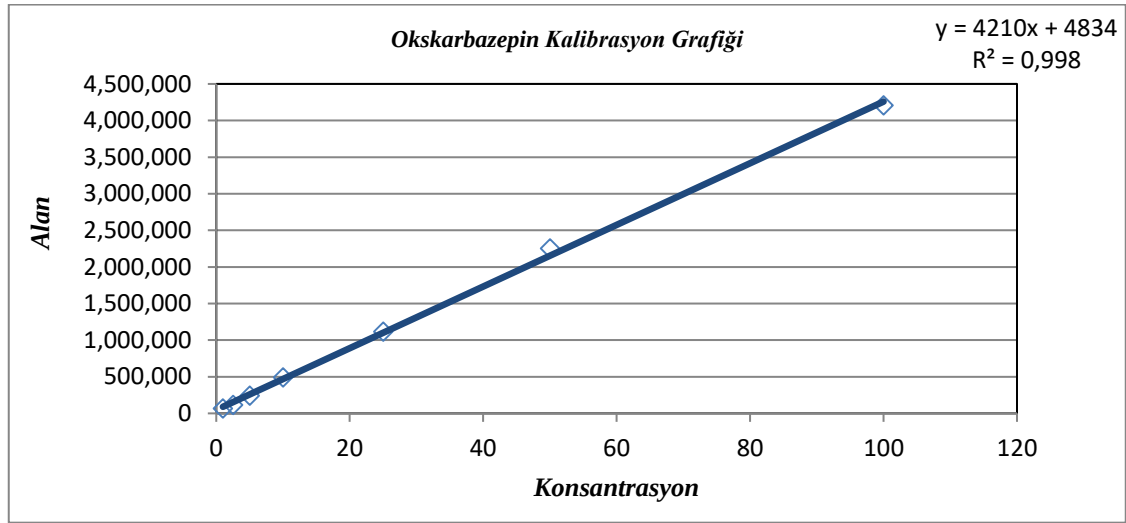


Şekil 3.3. Karbamazepinin kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.3. 3 kez tekrar verilen Karbamazepin için en iyi ortalama alanlar.

| Konsantrasyon (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Tekrar | Ortalama Alan |
|--------------------------------------|--------|---------------|
| 1                                    | 1      | 4.538         |
|                                      | 2      | 4.975         |
|                                      | 3      | 5.412         |
| 2,5                                  | 1      | 16.582        |
|                                      | 2      | 17.025        |
|                                      | 3      | 17.467        |
| 5                                    | 1      | 35.491        |
|                                      | 2      | 36.017        |
|                                      | 3      | 36.544        |
| 10                                   | 1      | 86.210        |
|                                      | 2      | 89.514        |
|                                      | 3      | 92.819        |
| 25                                   | 1      | 194.027       |
|                                      | 2      | 197.820       |
|                                      | 3      | 201.621       |
| 50                                   | 1      | 403.792       |
|                                      | 2      | 420.578       |
|                                      | 3      | 437.364       |
| 100                                  | 1      | 829.720       |
|                                      | 2      | 843.694       |
|                                      | 3      | 857.669       |

Okskarbazepin;

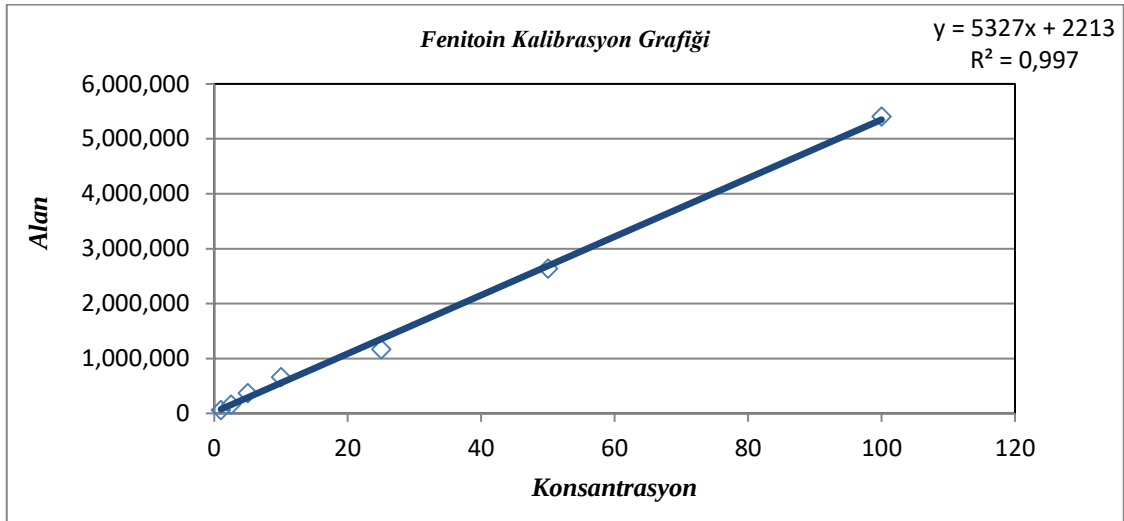


Şekil 3.4. Okskarbazepinin kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.4. 3 kez tekrar verilen Okskarbazepin için en iyi ortalama alanlar.

| Konsantrasyon (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Tekrar | Ortalama Alan |
|--------------------------------------|--------|---------------|
| 1                                    | 1      | 6.420         |
|                                      | 2      | 6.603         |
|                                      | 3      | 6.787         |
| 2,5                                  | 1      | 11.268        |
|                                      | 2      | 11.502        |
|                                      | 3      | 11.736        |
| 5                                    | 1      | 23.651        |
|                                      | 2      | 24.092        |
|                                      | 3      | 24.532        |
| 10                                   | 1      | 48.597        |
|                                      | 2      | 49.063        |
|                                      | 3      | 49.530        |
| 25                                   | 1      | 108.301       |
|                                      | 2      | 111.573       |
|                                      | 3      | 114.544       |
| 50                                   | 1      | 220.697       |
|                                      | 2      | 225.052       |
|                                      | 3      | 229.406       |
| 100                                  | 1      | 416.872       |
|                                      | 2      | 420.630       |
|                                      | 3      | 424.388       |

Fenitoin;

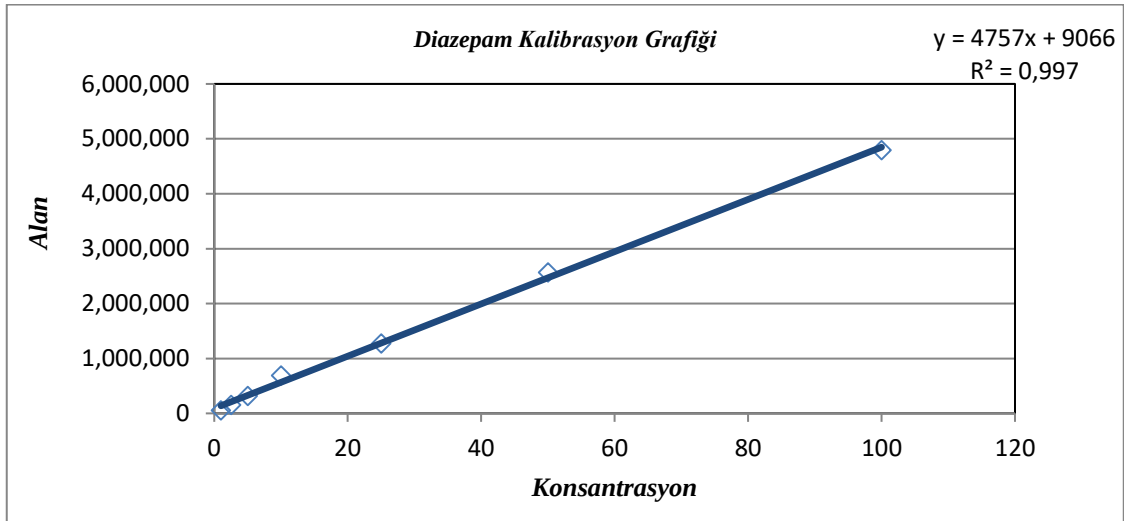


Şekil 3.5. Fenitoinin kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.5. 3 kez tekrar verilen Fenitoin için en iyi ortalama alanlar.

| Konsantrasyon (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Tekrar | Ortalama Alan |
|--------------------------------------|--------|---------------|
| 1                                    | 1      | 5.786         |
|                                      | 2      | 6.037         |
|                                      | 3      | 6.288         |
| 2,5                                  | 1      | 15.620        |
|                                      | 2      | 16.087        |
|                                      | 3      | 16.555        |
| 5                                    | 1      | 36.201        |
|                                      | 2      | 37.059        |
|                                      | 3      | 37.916        |
| 10                                   | 1      | 65.641        |
|                                      | 2      | 66.077        |
|                                      | 3      | 66.513        |
| 25                                   | 1      | 109.582       |
|                                      | 2      | 116.739       |
|                                      | 3      | 123.897       |
| 50                                   | 1      | 243.069       |
|                                      | 2      | 263.870       |
|                                      | 3      | 284.671       |
| 100                                  | 1      | 533.692       |
|                                      | 2      | 540.578       |
|                                      | 3      | 547.464       |

Diazepam;

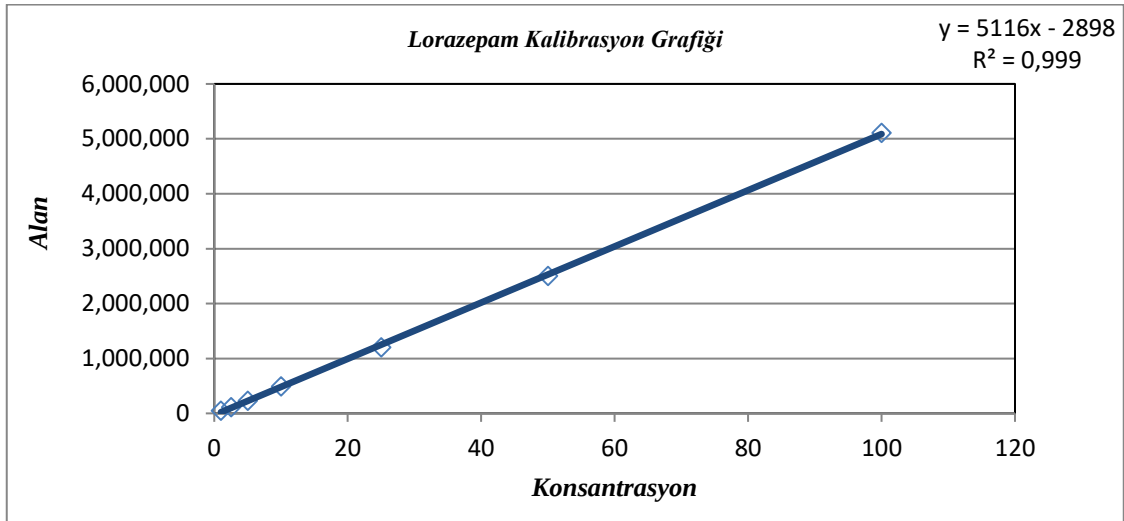


Şekil 3.6. Diazepamın kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.6. 3 kez tekrar verilen Diazepam için en iyi ortalama alanlar.

| Konsantrasyon (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Tekrar | Ortalama Alan |
|--------------------------------------|--------|---------------|
| 1                                    | 1      | 5.262         |
|                                      | 2      | 5.501         |
|                                      | 3      | 5.740         |
| 2,5                                  | 1      | 14.592        |
|                                      | 2      | 15.069        |
|                                      | 3      | 15.547        |
| 5                                    | 1      | 29.647        |
|                                      | 2      | 31.489        |
|                                      | 3      | 33.330        |
| 10                                   | 1      | 68.792        |
|                                      | 2      | 69.025        |
|                                      | 3      | 69.259        |
| 25                                   | 1      | 112.047       |
|                                      | 2      | 126.971       |
|                                      | 3      | 141.894       |
| 50                                   | 1      | 237.106       |
|                                      | 2      | 256.713       |
|                                      | 3      | 276.319       |
| 100                                  | 1      | 449.204       |
|                                      | 2      | 479.201       |
|                                      | 3      | 509.197       |

Lorazepam;

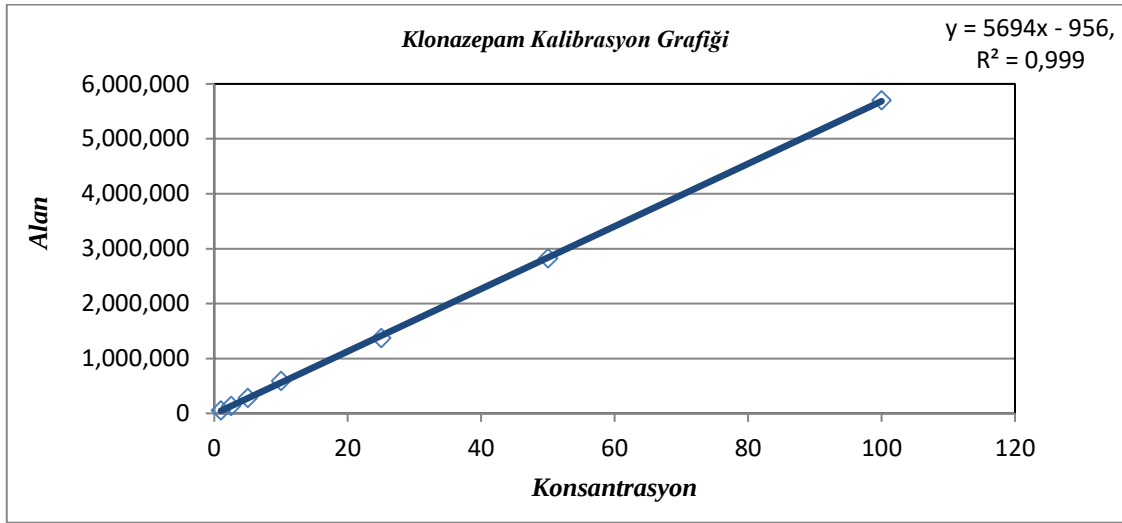


Şekil 3.7. Lorazepamın kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.7. 3 kez tekrar verilen Lorazepam için en iyi ortalama alanlar.

| Konsantrasyon (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Tekrar | Ortalama Alan |
|--------------------------------------|--------|---------------|
| 1                                    | 1      | 4.208         |
|                                      | 2      | 4.503         |
|                                      | 3      | 4.797         |
| 2,5                                  | 1      | 10.963        |
|                                      | 2      | 11.367        |
|                                      | 3      | 11.771        |
| 5                                    | 1      | 22.714        |
|                                      | 2      | 23.047        |
|                                      | 3      | 23.381        |
| 10                                   | 1      | 48.591        |
|                                      | 2      | 49.032        |
|                                      | 3      | 49.473        |
| 25                                   | 1      | 117.291       |
|                                      | 2      | 120.369       |
|                                      | 3      | 123.447       |
| 50                                   | 1      | 246.037       |
|                                      | 2      | 250.368       |
|                                      | 3      | 254.698       |
| 100                                  | 1      | 509.132       |
|                                      | 2      | 510.978       |
|                                      | 3      | 512.873       |

Klonazepam;

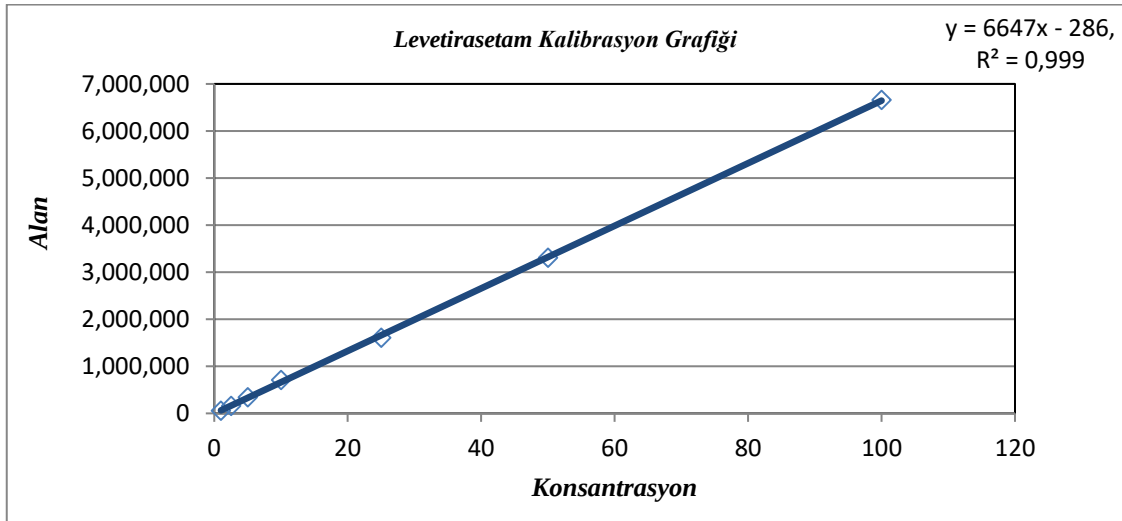


Şekil 3.8. Klonazepamın kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.8. 3 kez tekrar verilen Klonazepam için en iyi ortalama alanlar.

| Konsantrasyon (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Tekrar | Ortalama Alan |
|--------------------------------------|--------|---------------|
| 1                                    | 1      | 5.068         |
|                                      | 2      | 5.275         |
|                                      | 3      | 5.482         |
| 2,5                                  | 1      | 13.208        |
|                                      | 2      | 13.692        |
|                                      | 3      | 14.175        |
| 5                                    | 1      | 27.691        |
|                                      | 2      | 28.069        |
|                                      | 3      | 28.448        |
| 10                                   | 1      | 58.834        |
|                                      | 2      | 59.064        |
|                                      | 3      | 59.293        |
| 25                                   | 1      | 133.620       |
|                                      | 2      | 136.924       |
|                                      | 3      | 140.227       |
| 50                                   | 1      | 280.910       |
|                                      | 2      | 282.067       |
|                                      | 3      | 283.224       |
| 100                                  | 1      | 566.820       |
|                                      | 2      | 570.147       |
|                                      | 3      | 573.475       |

Levetirasetam;



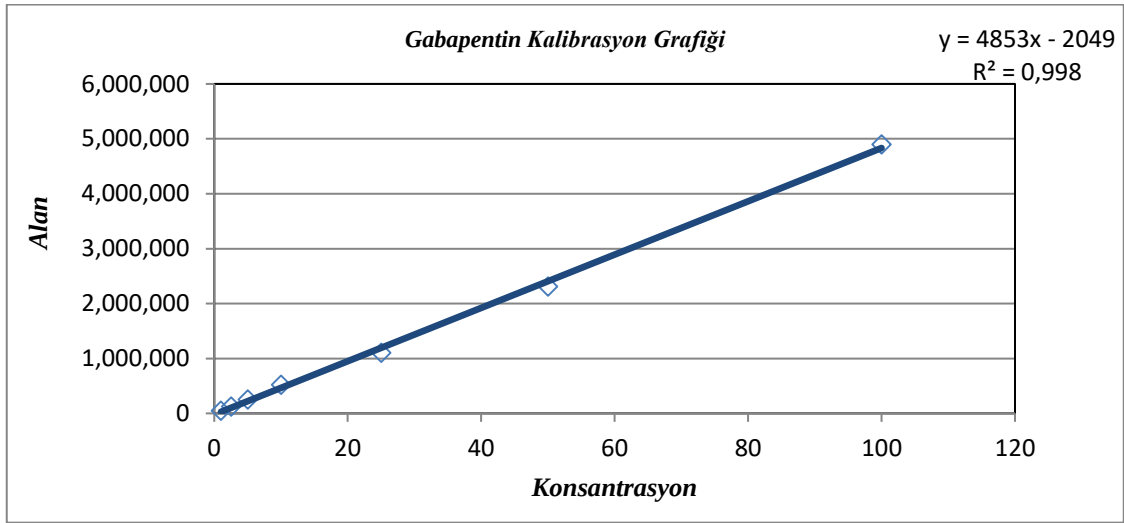
Şekil 3.9. Levetirasetamın kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.9. 3 kez tekrar verilen Levetirasetam için en iyi ortalama alanlar.

| Konsantrasyon (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Tekrar | Ortalama Alan |
|--------------------------------------|--------|---------------|
| 1                                    | 1      | 5.361         |
|                                      | 2      | 5.710         |
|                                      | 3      | 6.059         |
| 2,5                                  | 1      | 15.782        |
|                                      | 2      | 16.039        |
|                                      | 3      | 16.296        |
| 5                                    | 1      | 33.862        |
|                                      | 2      | 34.056        |
|                                      | 3      | 34.251        |
| 10                                   | 1      | 69.571        |
|                                      | 2      | 70.982        |
|                                      | 3      | 72.393        |
| 25                                   | 1      | 157.693       |
|                                      | 2      | 160.873       |
|                                      | 3      | 164.053       |
| 50                                   | 1      | 326.527       |
|                                      | 2      | 330.781       |
|                                      | 3      | 335.035       |
| 100                                  | 1      | 662.109       |
|                                      | 2      | 665.873       |
|                                      | 3      | 669.636       |



Gabapentin;

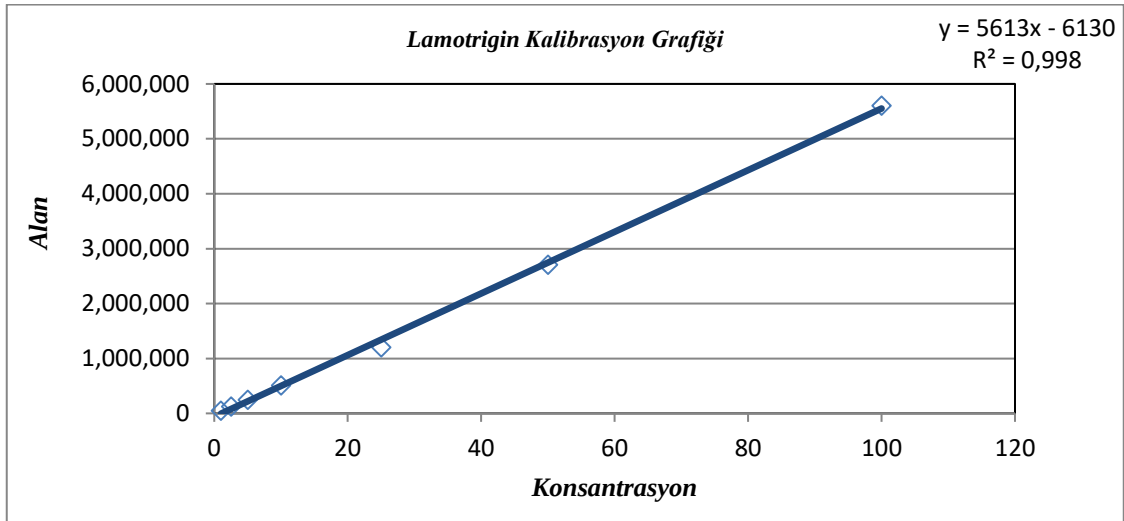


Şekil 3.10. Gabapentinin kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.10. 3 kez tekrar verilen Gabapentin için en iyi ortalama alanlar.

| Konsantrasyon (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Tekrar | Ortalama Alan |
|--------------------------------------|--------|---------------|
| 1                                    | 1      | 4.585         |
|                                      | 2      | 4.820         |
|                                      | 3      | 5.056         |
| 2,5                                  | 1      | 11.742        |
|                                      | 2      | 12.067        |
|                                      | 3      | 12.392        |
| 5                                    | 1      | 24.563        |
|                                      | 2      | 25.067        |
|                                      | 3      | 25.572        |
| 10                                   | 1      | 51.752        |
|                                      | 2      | 52.037        |
|                                      | 3      | 52.323        |
| 25                                   | 1      | 108.920       |
|                                      | 2      | 110.379       |
|                                      | 3      | 111.837       |
| 50                                   | 1      | 226.830       |
|                                      | 2      | 230.721       |
|                                      | 3      | 234.612       |
| 100                                  | 1      | 452.039       |
|                                      | 2      | 489.710       |
|                                      | 3      | 527.380       |

Lamotrigin;



Şekil 3.11. Lamotriginin kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.11. 3 kez tekrar verilen Lamotrigin için en iyi ortalama alanlar.

| Konsantrasyon (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Tekrar | Ortalama Alan |
|--------------------------------------|--------|---------------|
| 1                                    | 1      | 4.410         |
|                                      | 2      | 4.701         |
|                                      | 3      | 4.992         |
| 2,5                                  | 1      | 11.692        |
|                                      | 2      | 12.059        |
|                                      | 3      | 12.426        |
| 5                                    | 1      | 21.308        |
|                                      | 2      | 24.397        |
|                                      | 3      | 27.485        |
| 10                                   | 1      | 49.830        |
|                                      | 2      | 50.910        |
|                                      | 3      | 51.990        |
| 25                                   | 1      | 118.403       |
|                                      | 2      | 120.369       |
|                                      | 3      | 122.335       |
| 50                                   | 1      | 265.710       |
|                                      | 2      | 270.598       |
|                                      | 3      | 275.486       |
| 100                                  | 1      | 557.203       |
|                                      | 2      | 560.325       |
|                                      | 3      | 563.448       |

### 3.5. GERİ KAZANIM

Miktar tayini yöntemi için doğruluk kriteri geçerlidir. Bu yöntem için doğruluk kriteri belirlenmiştir. Bu sonuca göre, %80, %100 ve %120 geri kazanım yeterlidir. Yapılan analiz sonuçlarına göre geri kazanım değerlerinin ortalaması alınarak metodun geri kazanımı olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada en küçük, orta ve en büyük konsantrasyon ile hazırlanan çözeltilerin sonucunda elde edilen geri kazanım değerleri aşağıdaki grafikte yer almaktadır.

Çizelge 3.12. İlaç etken maddelerinin konsantrasyon ve geri kazanımları.

| Etken Madde   | En küçük, Orta, En büyük konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Bulunan Konsantrasyon (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Geri Kazanım % |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------|
| Karbamazepin  | 1                                                                                        | 0,971                                        | 97,10          |
|               | 25                                                                                       | 25,351                                       | 98,61          |
|               | 75                                                                                       | 75,851                                       | 98,87          |
| Okskarbazepin | 1                                                                                        | 0,984                                        | 98,40          |
|               | 25                                                                                       | 24,681                                       | 98,72          |
|               | 75                                                                                       | 75,730                                       | 99,03          |
| Fenitoin      | 1                                                                                        | 0,981                                        | 98,10          |
|               | 25                                                                                       | 25,457                                       | 98,20          |
|               | 75                                                                                       | 75,978                                       | 98,71          |
| Diazepam      | 1                                                                                        | 0,985                                        | 98,50          |
|               | 25                                                                                       | 24,749                                       | 98,99          |
|               | 75                                                                                       | 74,320                                       | 99,09          |
| Lorazepam     | 1                                                                                        | 0,982                                        | 98,20          |
|               | 25                                                                                       | 25,360                                       | 98,58          |
|               | 75                                                                                       | 75,621                                       | 99,17          |
| Klonazepam    | 1                                                                                        | 0,986                                        | 98,60          |
|               | 25                                                                                       | 24,713                                       | 98,85          |
|               | 75                                                                                       | 74,251                                       | 99,00          |
| Levetirasetam | 1                                                                                        | 0,981                                        | 98,10          |
|               | 25                                                                                       | 25,462                                       | 98,18          |
|               | 75                                                                                       | 75,992                                       | 98,69          |
| Gabapentin    | 1                                                                                        | 0,983                                        | 98,30          |
|               | 25                                                                                       | 24,628                                       | 98,51          |
|               | 75                                                                                       | 74,500                                       | 99,33          |
| Lamotrigin    | 1                                                                                        | 0,986                                        | 98,60          |
|               | 25                                                                                       | 25,323                                       | 98,72          |
|               | 75                                                                                       | 75,712                                       | 99,05          |

### 3.6. YÜZDE BAĞIL STANDART SAPMA (%RSD), GÖZLENEBİLME SINIRI (LOD) VE ALT TAYİN SINIRI (LOQ)

Yapılan yeni metodun üstünlüğü ve güvenilirliği cihazın görebileceği düşük farklı konsantrasyonların hazırlanıp LOD ve LOQ değerlerinin bulunmuş olmasıdır. Yapılan analizler sonucunda EURACHEM standartlarına göre uygunluğu görülmüştür. Bütün ilaç etken maddeleri için % RSD değeri 2'nin altında bulunmuştur ve metodun kesinliğinin EURACHEM standartlarına göre uygun olduğu belirlenmiştir.

% RSD, LOD ve LOQ hesaplama;

$$S_0' = S_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} \quad (3.1)$$

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Ortalama Pik Alanı}} \times 100 \quad (3.2)$$

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

$S_0'$  ; LOD ve LOQ değerlerini hesaplamak için kullanılan standart sapma değeridir.

n ; Tüm ölçüm prosedürü takip edilerek elde edilen sonuçların ortalaması alınan tekrarlı gözlemlerin sayısıdır.

$n_b$ ; Ölçüm çalışmalarına göre boş düzeltmesinin hesaplanmasında ortalaması alınan boş gözlemlerin sayısıdır.

LOD için ;  $S_0' \times 3 = \text{LOD}$

LOQ için ;  $S_0' \times 10 = \text{LOQ}$  değeri şeklinde yapılmıştır.

### 3.7. KESİNLİK (TEKRARLANABİLİRLİK)

Kesinlik değerinin hesaplanması için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmalarında iki analizci tarafından aynı laboratuvar, aynı cihazla ve aynı gün altı bağımsız çalışma yapılarak, analiz sonuçlarının birbirlerine olan yakınlığı değerlendirilmiştir. Tekrar üretilebilirlik çalışmaları için iki farklı analizci tarafından 3 farklı konsantrasyonda aynı laboratuvar, aynı cihazla ve farklı günlerde altı bağımsız çalışma yapılarak rastgele hata hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar belirtilmiştir. % RSD değerlerinin kabul edilebilirliği %15'den küçük olup olmadığına göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.13. Gün içi tekrarlanabilirlik değerleri (n=20).

| Etken Madde   | Konsantrasyonlar      |                    |       |                        |                    |       |                        |                    |       |
|---------------|-----------------------|--------------------|-------|------------------------|--------------------|-------|------------------------|--------------------|-------|
|               | 1 ng.mL <sup>-1</sup> |                    |       | 25 ng.mL <sup>-1</sup> |                    |       | 75 ng.mL <sup>-1</sup> |                    |       |
|               | Standart Sapma        | Ortalama Pik Alanı | % RSD | Standart Sapma         | Ortalama Pik Alanı | % RSD | Standart Sapma         | Ortalama Pik Alanı | % RSD |
| Karbamazepin  | 0,089                 | 1,139              | 7,81  | 0,285                  | 25,296             | 1,12  | 0,626                  | 76,3478            | 0,81  |
| Okskarbazepin | 0,134                 | 1,251              | 10,71 | 0,167                  | 26,179             | 0,63  | 0,217                  | 77,2571            | 0,28  |
| Fenitoin      | 0,076                 | 1,029              | 7,38  | 0,221                  | 25,147             | 0,87  | 0,435                  | 73,986             | 0,58  |
| Diazepam      | 0,059                 | 0,936              | 6,30  | 0,239                  | 26,473             | 0,90  | 0,334                  | 75,2428            | 0,44  |
| Lorazepam     | 0,081                 | 0,925              | 8,75  | 0,185                  | 24,198             | 0,76  | 0,331                  | 74,3972            | 0,44  |
| Klonazepam    | 0,067                 | 1,027              | 6,52  | 0,118                  | 25,671             | 0,45  | 0,149                  | 74,9258            | 0,19  |
| Levetirasetam | 0,092                 | 0,985              | 9,34  | 0,361                  | 24,671             | 1,46  | 0,659                  | 76,173             | 0,86  |
| Gabapentin    | 0,105                 | 1,167              | 8,99  | 0,172                  | 24,982             | 0,68  | 0,287                  | 78,457             | 0,36  |
| Lamotrigin    | 0,125                 | 1,095              | 11,41 | 0,301                  | 25,178             | 1,19  | 0,686                  | 77,3764            | 0,88  |

Çizelge 3.14. Günler arası tekrarlanabilirlik (Tekrar Üretilebilirlik) değerleri (n=20).

| Etken Madde   | Gün | Konsantrasyonlar      |                |       |                |                        |                |       |                |                        |                |       |                |
|---------------|-----|-----------------------|----------------|-------|----------------|------------------------|----------------|-------|----------------|------------------------|----------------|-------|----------------|
|               |     | 1 ng.mL <sup>-1</sup> |                |       |                | 25 ng.mL <sup>-1</sup> |                |       |                | 75 ng.mL <sup>-1</sup> |                |       |                |
|               |     | Standart Sapma        | Ortalama Değer | % RSD | Ortalama % RSD | Standart Sapma         | Ortalama Değer | % RSD | Ortalama % RSD | Standart Sapma         | Ortalama Değer | % RSD | Ortalama % RSD |
| Karbamazepin  | 1   | 0,135                 | 1,127          | 11,98 | 11,94          | 0,128                  | 25,149         | 0,51  | 0,95           | 0,312                  | 75,179         | 0,42  | 0,76           |
|               | 2   | 0,142                 | 1,108          | 12,82 |                | 0,231                  | 26,095         | 0,89  |                | 0,796                  | 76,268         | 1,04  |                |
|               | 3   | 0,127                 | 1,151          | 11,03 |                | 0,361                  | 25,029         | 1,44  |                | 0,637                  | 78,137         | 0,82  |                |
| Okskarbazepin | 1   | 0,155                 | 1,145          | 13,54 | 12,43          | 0,369                  | 27,348         | 1,35  | 1,11           | 0,212                  | 77,392         | 0,27  | 0,63           |
|               | 2   | 0,127                 | 1,145          | 11,09 |                | 0,285                  | 27,279         | 1,04  |                | 0,691                  | 78,735         | 0,88  |                |
|               | 3   | 0,148                 | 1,17           | 12,65 |                | 0,249                  | 26,347         | 0,95  |                | 0,569                  | 76,039         | 0,75  |                |
| Fenitoin      | 1   | 0,065                 | 1,065          | 6,10  | 7,91           | 0,159                  | 25,842         | 0,62  | 0,66           | 0,218                  | 74,189         | 0,29  | 0,52           |
|               | 2   | 0,087                 | 1,015          | 8,57  |                | 0,221                  | 26,183         | 0,84  |                | 0,436                  | 76,397         | 0,57  |                |
|               | 3   | 0,095                 | 1,048          | 9,06  |                | 0,139                  | 27,482         | 0,51  |                | 0,517                  | 75,285         | 0,69  |                |
| Diazepam      | 1   | 0,164                 | 1,148          | 14,29 | 13,27          | 0,227                  | 25,158         | 0,90  | 0,79           | 0,315                  | 75,358         | 0,42  | 0,42           |
|               | 2   | 0,186                 | 1,115          | 16,68 |                | 0,258                  | 25,251         | 1,02  |                | 0,293                  | 75,247         | 0,39  |                |
|               | 3   | 0,101                 | 1,141          | 8,85  |                | 0,118                  | 26,367         | 0,45  |                | 0,337                  | 76,496         | 0,44  |                |
| Lorazepam     | 1   | 0,121                 | 1,185          | 10,21 | 10,77          | 0,218                  | 26,059         | 0,84  | 1,08           | 0,715                  | 73,485         | 0,97  | 0,87           |
|               | 2   | 0,152                 | 1,116          | 13,62 |                | 0,393                  | 23,379         | 1,68  |                | 0,689                  | 74,369         | 0,93  |                |
|               | 3   | 0,098                 | 1,157          | 8,47  |                | 0,171                  | 23,319         | 0,73  |                | 0,525                  | 75,175         | 0,70  |                |
| Klonazepam    | 1   | 0,053                 | 1,125          | 4,71  | 7,78           | 0,268                  | 27,129         | 0,99  | 0,79           | 0,379                  | 74,352         | 0,51  | 0,41           |
|               | 2   | 0,097                 | 0,896          | 10,83 |                | 0,229                  | 26,367         | 0,87  |                | 0,202                  | 75,496         | 0,27  |                |
|               | 3   | 0,091                 | 1,168          | 7,79  |                | 0,137                  | 27,319         | 0,50  |                | 0,337                  | 76,769         | 0,44  |                |
| Levetirasetam | 1   | 0,113                 | 1,124          | 10,05 | 11,67          | 0,469                  | 27,183         | 1,73  | 1,41           | 0,512                  | 76,374         | 0,67  | 0,73           |
|               | 2   | 0,151                 | 1,132          | 13,34 |                | 0,391                  | 27,492         | 1,42  |                | 0,639                  | 76,296         | 0,84  |                |
|               | 3   | 0,118                 | 1,015          | 11,63 |                | 0,282                  | 26,378         | 1,07  |                | 0,521                  | 77,195         | 0,67  |                |
| Gabapentin    | 1   | 0,078                 | 0,847          | 9,21  | 11,05          | 0,472                  | 24,348         | 1,94  | 1,64           | 0,704                  | 77,287         | 0,91  | 0,84           |
|               | 2   | 0,093                 | 0,836          | 11,12 |                | 0,348                  | 24,279         | 1,43  |                | 0,693                  | 76,039         | 0,91  |                |
|               | 3   | 0,119                 | 0,928          | 12,82 |                | 0,396                  | 25,347         | 1,56  |                | 0,529                  | 75,785         | 0,70  |                |
| Lamotrigin    | 1   | 0,128                 | 1,115          | 11,48 | 11,54          | 0,487                  | 28,915         | 1,68  | 1,64           | 0,569                  | 75,682         | 0,75  | 0,87           |
|               | 2   | 0,112                 | 1,157          | 9,68  |                | 0,512                  | 27,692         | 1,85  |                | 0,614                  | 75,746         | 0,81  |                |
|               | 3   | 0,137                 | 1,017          | 13,47 |                | 0,392                  | 28,279         | 1,39  |                | 0,802                  | 76,482         | 1,05  |                |

Çizelge 3.15. Etken maddelerin LOD ve LOQ değerleri (n=20).

| Etken Madde   | LOD                            |                                 |                                 | LOQ                            |                                 |                                 |
|---------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|               | 1<br><i>ng.mL<sup>-1</sup></i> | 25<br><i>ng.mL<sup>-1</sup></i> | 75<br><i>ng.mL<sup>-1</sup></i> | 1<br><i>ng.mL<sup>-1</sup></i> | 25<br><i>ng.mL<sup>-1</sup></i> | 75<br><i>ng.mL<sup>-1</sup></i> |
| Karbamazepin  | 0,13                           | 0,12                            | 0,30                            | 0,43                           | 0,40                            | 0,99                            |
| Okskarbazepin | 0,15                           | 0,35                            | 0,20                            | 0,49                           | 1,17                            | 0,67                            |
| Fenitoin      | 0,06                           | 0,15                            | 0,21                            | 0,21                           | 0,50                            | 0,69                            |
| Diazepam      | 0,16                           | 0,22                            | 0,30                            | 0,52                           | 0,72                            | 1,00                            |
| Lorazepam     | 0,11                           | 0,21                            | 0,68                            | 0,38                           | 0,69                            | 2,26                            |
| Klonazepam    | 0,05                           | 0,25                            | 0,36                            | 0,17                           | 0,85                            | 1,20                            |
| Levetirasetam | 0,11                           | 0,44                            | 0,49                            | 0,36                           | 1,48                            | 1,62                            |
| Gabapentin    | 0,07                           | 0,45                            | 0,67                            | 0,25                           | 1,49                            | 2,23                            |
| Lamotrigin    | 0,12                           | 0,46                            | 0,54                            | 0,40                           | 1,54                            | 1,80                            |

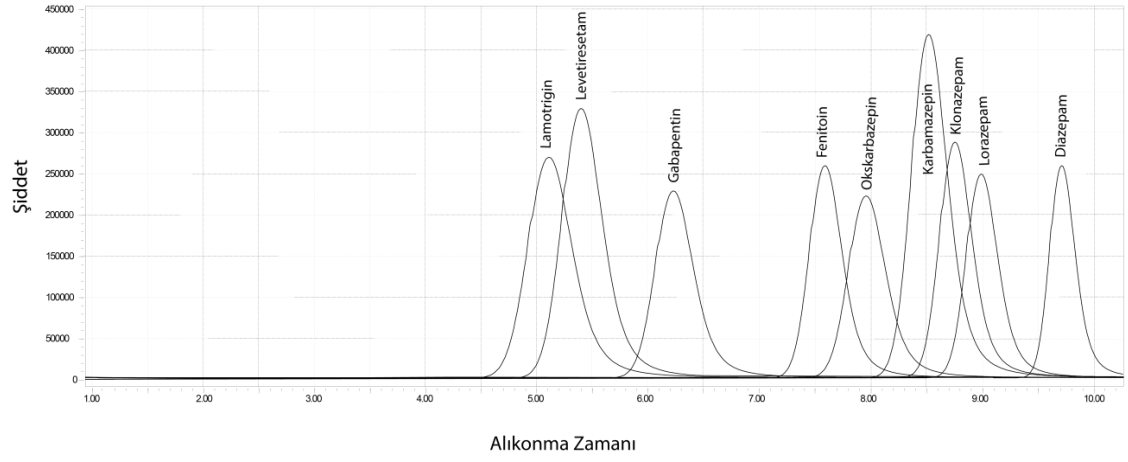
### 3.8. STABİLİTE

İnsan kanının serum örneklerinde - 2°C, + 4°C ve oda sıcaklığında bekletilmiş standartların 120 saat boyunca ölçümleri yapılmış ve aynı gün taze hazırlanmış taze çözeltilerin alanları ile karşılaştırılmıştır. Her bir numune için 3 farklı konsantrasyondaki (2 *ng.mL<sup>-1</sup>*, 30 *ng.mL<sup>-1</sup>*, 80 *ng.mL<sup>-1</sup>*) bütün etken maddeler için kalite kontrol numunelerinden 10'ar adet validasyonun herhangi bir serisiyle ekstre edilmiştir. Stabilité serisinin birlikte hazırlandığı validasyon serisine ait kalibrasyon eğrisi ile okutulmuş ve kabul kriterleri arasında bulunan değerler sonucunda numunelerin oda sıcaklığında 120 saat boyunca stabil olduğu kanıtlanmıştır.

Çizelge 3.16. Oda sıcaklığında 120 saat bekletilen etken maddeler için istatistiksel veriler.

| Etken Madde   | Konsantrasyon (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Bulunan Konsantrasyon (ng.mL <sup>-1</sup> ) | Standart Sapma | Ortalama Pik alanı | % RSD | Doğruluk % |
|---------------|--------------------------------------|----------------------------------------------|----------------|--------------------|-------|------------|
| Karbamazepin  | 2                                    | 2,04                                         | 2.536,81       | 247.639            | 1,02  | 98,03      |
|               | 30                                   | 30,50                                        | 35.913,59      | 3.648.124          | 0,98  | 98,36      |
|               | 80                                   | 81,00                                        | 105.626,83     | 11.054.948         | 0,95  | 98,76      |
| Okskarbazepin | 2                                    | 2,03                                         | 2.691,22       | 236.490            | 1,13  | 98,52      |
|               | 30                                   | 30,30                                        | 32.691,82      | 3.356.782          | 0,97  | 99,00      |
|               | 80                                   | 80,40                                        | 75.696,13      | 8.524.912          | 0,88  | 99,50      |
| Fenitoin      | 2                                    | 2,05                                         | 398,96         | 32.507             | 1,22  | 97,56      |
|               | 30                                   | 30,60                                        | 4.973,12       | 485.691            | 1,02  | 98,03      |
|               | 80                                   | 81,10                                        | 13.496,58      | 1.372.510          | 0,98  | 98,64      |
| Diazepam      | 2                                    | 2,02                                         | 582,63         | 46.819             | 1,24  | 99,00      |
|               | 30                                   | 30,20                                        | 7.382,20       | 716.929            | 1,02  | 99,33      |
|               | 80                                   | 80,40                                        | 16.386,82      | 1.651.372          | 0,99  | 99,50      |
| Lorazepam     | 2                                    | 2,04                                         | 2.265,82       | 137.273            | 1,65  | 98,03      |
|               | 30                                   | 30,40                                        | 26.910,30      | 2.356.973          | 1,14  | 98,68      |
|               | 80                                   | 80,90                                        | 58.061,17      | 5.702.523          | 1,01  | 98,88      |
| Klonazepam    | 2                                    | 2,03                                         | 462,85         | 38.610             | 1,19  | 98,52      |
|               | 30                                   | 30,30                                        | 6.382,25       | 595.723            | 1,07  | 99,00      |
|               | 80                                   | 80,70                                        | 15.209,89      | 15.67.953          | 0,97  | 99,13      |
| Levetirasetam | 2                                    | 2,04                                         | 1.820,62       | 116.274            | 1,56  | 98,03      |
|               | 30                                   | 30,50                                        | 17.620,12      | 15.28.159          | 1,15  | 98,36      |
|               | 80                                   | 81,20                                        | 43.472,36      | 4.214.249          | 1,03  | 99,52      |
| Gabapentin    | 2                                    | 2,02                                         | 396,28         | 33.549             | 1,18  | 99,00      |
|               | 30                                   | 30,10                                        | 5.561,48       | 522.839            | 1,06  | 99,66      |
|               | 80                                   | 80,20                                        | 14.192,97      | 1.403.591          | 1,01  | 99,75      |
| Lamotrigin    | 2                                    | 2,04                                         | 3.689,10       | 313.576            | 1,17  | 98,03      |
|               | 30                                   | 30,30                                        | 48.950,63      | 4.567.892          | 1,07  | 99,00      |
|               | 80                                   | 80,70                                        | 130.679,13     | 12.521.489         | 1,04  | 99,13      |





Şekil 3.12. Etken maddelerin eş zamanlı kromatogramı.

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada antiepileptik ilaç etken maddeleri olan Karbamazepin, Okskarbazepin, Fenitoin, Diazepam, Lorazepam, Klonazepam, Levetirasetam, Gabapentin, Lamotrigin'nin insan kanının serum kısmı kullanılarak LC-MS/MS ile eş zamanlı analizi için metot validasyon yöntemi geliştirilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucu 15 dakikalık enjeksiyon süresinde 9 etken maddenin belirlendiği bir LC-MS/MS yöntemi yapılmış ve validasyon çalışmaları başarıyla elde edilmiştir. Ön hazırlık çalışması ve numune hazırlamanın basit, kısa, güvenilir, anlaşılır olması, maliyetin az olması açısından diğer yöntemlerden ayrıldığı görülmüştür.

LC/MS-MS ile elde edilen MRM değerleri literatür ile uyumludur. Bu çalışmada kullanılan etken maddeler literatüre benzer şekilde pozitif iyonlaşmış ve elde edilmiştir. Validasyon çalışmaları için düşük tayin limitli, stabilitesi, tekrarlanabilirliği, tekrar üretilebilirliği ve geri kazanımı yüksek bir tayin yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Bu çalışmanın rutin tarama çalışmalarında etken maddelerin düşük değerlerinin tespiti ve izlenmesi açısından oldukça faydalı olacağı düşünülmektedir.

Validasyon için geçerli kılma prosedürü çerçevesinde;

Seçicilik (yöntemin spesifikliği)

Doğruluk (geri kazanım)

Doğrusallık

Gün içi tekrarlanabilirlik ve Günler arası tekrarlanabilirlik

Gözlem limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ)

Stabilite

parametreleri test edilerek geçerli olduğu görülmüştür.

Seçicilik (yöntemin spesifikliği);

Seçicilik için temiz bir kan numunesi ile Karbamazepin, Okskarbazepin, Fenitoin, Diazepam, Lorazepam, Klonazepam, Levetirasetam, Gabapentin, Lamotrigingibi etken maddelerin standart çözeltilerinin piklerinin elde edildiği kromatogram kıyaslanmış ve

ilaç etken maddelerin pikinden başka herhangi bir pik gelmediği gözlemlenmiştir. Her etken madde için kendine özgü alıkonma zamanları aşağıda gösterilmiştir

|               |   |      |
|---------------|---|------|
| Karbamazepin  | : | 8,55 |
| Okskarbazepin | : | 7,82 |
| Fenitoin      | : | 7,45 |
| Diazepam      | : | 9,82 |
| Lorazepam     | : | 9,07 |
| Klonazepam    | : | 8,64 |
| Levetirasetam | : | 5,50 |
| Gabapentin    | : | 6,32 |
| Lamotrigin    | : | 5,27 |

Doğruluk parametresi;

Yöntemin doğruluğu yöntemin geri kazanım parametresine bakılarak test edilmiştir. Karbamazepin için %97,10 - %98,87, Okskarbazepin %98,40- %99,03, Fenitoin %98,10 - %98,71, Diazepam %98,50 - %99,09, Lorazepam %98,20 - %99,17, Klonazepam %98,60 - %99,00, Levetirasetam %98,10 - %98,69, Gabapentin %98,30 - %99,33, Lamotrigin %98,60 - %99,05 arasındadır. Metot % geri kazanım yönünden 1 ng.mL<sup>-1</sup> konsantrasyonunda her etken madde için %97,10 ile %98,60 arasındaki seviyelerinde, 75 ng.mL<sup>-1</sup> seviyelerinde %98,69 ile %99,33 arasındaki seviyelerde tutulmuş olup EURACHEM klavuzuna göre %95 değerlerinin üzerinde olduğu her bir ilaç etken maddelerinin konsantrasyonu için uygun olduğu tespit edilmiş ve ispatlanmıştır.

Doğrusallık;

Standart çözeltiler ile hazırlanan 1 ng.mL<sup>-1</sup>, 2,5 ng.mL<sup>-1</sup>, 5 ng.mL<sup>-1</sup>, 10 ng.mL<sup>-1</sup>, 25 ng.mL<sup>-1</sup>, 50 ng.mL<sup>-1</sup>, 100 ng/mL<sup>-1</sup> derişimlerde çözeltiler analiz edilmiş ve elde edilen pik alanları ile 7 farklı nokta ile kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve hesaplanmıştır. Her bir ilaç etken maddenin kalibrasyon değerleri %99'dan büyük olduğu görülmüştür ve ideal regresyon katsayısı 1'e oldukça yakındır.

Gün içi tekrarlanabilirlik;

Gün içi tekrarlanabilirlik için Çizelge 3.13’de bakıldığında % RSD değerleri için

1 ng.mL<sup>-1</sup>; 6,30 ng.mL<sup>-1</sup>-11,41 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında

25 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,45 ng.mL<sup>-1</sup>-1,46 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında

75 ng.mL<sup>-1</sup>; 0,19 ng.mL<sup>-1</sup>-0,88 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında sonuçlar elde edilmiştir. Tüm konsantrasyonlarda RSD değerleri % 15’in altında olduğu belirlenmiştir ve bize gün içi tekrarlanabilirliklerin EURACHEM klavuzuna göre uygun olduğunu göstermektedir.

Günler arası tekrarlanabilirlik;

Günler arası tekrarlanabilirlik için Çizelge 3.14’e bakıldığında % RSD değerleri için;

1 ng.mL<sup>-1</sup> ; 7,78 ng.mL<sup>-1</sup>-13,27 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında

25 ng.mL<sup>-1</sup> ; 0,79 ng.mL<sup>-1</sup>-1,64 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında

75 ng.mL<sup>-1</sup> ; 0,41 ng.mL<sup>-1</sup>-0,87 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında sonuçlar elde edilmiştir. Günler arası değişimlerin gün içi değişim değerlerine oranla istatistiksel olarak daha fazla olmadığı ve yöntemin tekrar tekrar çalışılması durumunda değerlerin tekrar üretilebilir olduğu sonucuna varılmıştır. % RSD değerlerinin her bir etken madde için farklı konsantrasyonlarda %15’in altında olduğu görülmüştür ve EURACHEM standartlarına göre doğruluğu kanıtlanmıştır.

Gözlem limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ);

LOD ve LOQ değerleri her bir etken madde için EURACHEM klavuzuna uygun olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda tam kanın serum kısmı kullanılarak her bir etken madde için LOD ve LOQ değerleri aşağıda gösterilmiştir ve diğer literatür taramalarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

LOD değerleri için;

1 ng.mL<sup>-1</sup> ; 0,05 ng.mL<sup>-1</sup>- 0,16 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında

25 ng.mL<sup>-1</sup> ; 0,12 ng.mL<sup>-1</sup>- 0,46 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında

75 ng.mL<sup>-1</sup> ; 0,20 ng.mL<sup>-1</sup>- 0,68 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar göre 25 ng.mL<sup>-1</sup>de kalitatif olarak en iyi sonuçları aldığımız göstermiştir.

LOQ değerleri için;

1 ng.mL<sup>-1</sup> ; 0,17 ng.mL<sup>-1</sup>- 0,52 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında

25 ng.mL<sup>-1</sup> ; 0,40 ng.mL<sup>-1</sup>- 1,54 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında

75 ng.mL<sup>-1</sup> ; 0,67 ng.mL<sup>-1</sup>- 2,26 ng.mL<sup>-1</sup> aralığında sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar göre 25 ng.mL<sup>-1</sup> de kantitatif olarak en iyi sonuçları aldığımız göstermiştir.

Stabilite;

Stabilite çalışmasında ise + 4°C sıcaklıkta saklanan stok çözeltilerin 120 saat boyunca bu sıcaklıkta stabil oldukları gözlenmiştir. Her bir etken maddenin stabilitesinin güvenilirliği için üç farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin 15'er tekrar olacak şekilde 120 saat boyunca + 4°C de bekletildikten sonra cihaza verilmiş ve bulunan değerler sonucunda numunelerin oda sıcaklığında 120 saat boyunca + 4°C de stabil olduğu kanıtlanmıştır.



## 5. KAYNAKLAR

- [1] N. Erten ve Z. Erişgin, “Gebelikte epilepsi tedavisinde yeni nesil antiepileptik ilaçlar,” *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, c. 11, sayı 3, 2014.
- [2] E. Ertan, “Edirne merkez ve köy ilköğretim okulu öğrencilerinde epilepsi prevalansı ve epidemiyolojik özelliklerinin araştırılması,” Uzmanlık tezi, Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye, 2006.
- [3] B. Çetin, “Epilepsi hastası çocuklarda ketojenik diyetin epileptik nöbet sayısı üzerine etkisinin araştırılması,” Yüksek lisans tezi, Diyetetik Programı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2013.
- [4] S. Çelik, “İdiopatik jeneralize epilepsili hastalarda talamik volumetri ve mr spektroskopik incelemeler,” Uzmanlık tezi, Nöroloji Kliniği, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 2008.
- [5] S. Doğdu, “Epilepsi hastalığı ve tedavi yöntemleri,” Yüksek lisans tezi, Eczacılık Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye, 2013.
- [6] N. Bölükbaşı, “Antiepileptik ilaçların tiroid hormon düzeyleri ve serum biyokimyasına etkileri,” Doktora tezi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, Türkiye, 2009.
- [7] K. B. Kim, K. A. Seo, S. E. Kim, S. K. Bae, D. H. Kim and J. G. Shin, “Simple and accurate quantitative analysis of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, c. 1, sayı 56, ss. 771– 777, 2011.
- [8] A. A. Kadi, M. G. Kassem, H. A. Makeen and H. A. Alhazmi, “Simultaneous determination of phenytoin and lamotrigine in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry,” *Digest Journal of Nanomaterial and Biostructures*, c. 1, sayı 8, ss. 1113 - 1122, 2013.
- [9] H. Breton, M. Cociglio, F. Bressolle, H. Peyriere, J. P. Blayac and D. H. Buys, “Liquid chromatography–electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma,” *Journal of Chromatography B*, c. 1, sayı 828, ss. 80–90, 2005.
- [10] M. Subramanian, A. K. Birnbaum and R. P. Remmel, “High-speed simultaneous determination of nine antiepileptic drugs using liquid chromatography–mass spectrometry,” *Ther Drug Monit*, c. 1, sayı 30, ss. 347-356, 2008.
- [11] C. Heideloff, D. R. Bunch and S. Wang, “A novel HPLC method for quantification of 10 antiepileptic drugs or metabolites in serum/plasma using a monolithic column,” *Ther Drug Monit*, c. 1, sayı 32, ss. 102-106, 2010.
- [12] R. Hösli, S. König and S. F. Mühlebach, “Development and validation of an LC-MS/MS method and comparison with a GC-MS method to measure phenytoin in human brain dialysate, blood and saliva,” *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, c. 1, sayı 2018, ss. 1-8, 2018.

- [13] K. Karas, J. Kuczynska, H. J. Sienkiewicz, P. Bienkowski and P. Mierzejewski, "A Simple bioanalytical method for the quantification of levetiracetam in human plasma and saliva," *Chromatography Separation Techniques*, c. 1, sayı 6, ss. 1-8, 2015.
- [14] S. Deeb, D. A. McKeown, H. J. Torrance, F. M. Wylie, B. K. Logan and K. S. Scott, "Simultaneous analysis of 22 antiepileptic drugs in postmortem blood, serum and plasma using LC-MS-MS with a focus on their role in forensic cases," *Journal of Analytical Toxicology*, c. 1, sayı 38, ss. 485-494, 2014.
- [15] N. Kostic, Y. Dotsikas, A. Malenovic, B. J. Stojanovic, T. Rakic, D. Ivanovic and M. Medenica, "Stepwise optimization approach for improving LC-MS/MS analysis of zwitterionic antiepileptic drugs with implementation of experimental design," *Journal Mass Spectrom*, c. 1, sayı 48, ss. 875-884, 2013.
- [16] M. Shibata, S. Hashi, H. Nakanishi, S. Masuda, T. Katsura and I. Yano, "Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring," *Biomedical Chromatography*, c. 1, sayı 26, ss. 1519-1528, 2012.
- [17] D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Instrumental Analysis*, 6. baskı, Ankara, Türkiye: Bilim Yayıncılık, 1998, böl. 5, ss. 150-500.
- [18] F. Selimoğlu, "Parasetamol içeren kombine farmasötik preparatların UPLC yöntemi ile kantitatif analizi," Doktora tezi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye, 2013.
- [19] T. Gündüz, *Instrumental Analiz*, 10. baskı, Ankara, Türkiye: Gazi Yayınevi, 2007, böl. 4, ss. 175-400.
- [20] Anonim, (2018, 26 Mayıs). [Online].  
Erişim: <https://acikders.ankara.edu.tr/mod/resource/view.php?id=61487.doc>.
- [21] S. Zazoğlu, "İmmünolojik analiz (Cedia) pozitif sonuçlarının LC-MS/MS yöntemi ile teyidi ve yöntemin validasyonu," Doktora tezi, Kimya Mühendisliği, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye, 2011.
- [22] A. K. Tunca. (2018, 20 Haziran). *Analitik yöntem validasyonu*. [Online].  
Erişim: <https://www.slideplayer.biz.tr/slide/8827185/.ppt>.
- [23] R. J. Williams, "Determination of inorganic anions by ion chromatography with ultraviolet absorbance detection," *Analytical Chemistry*, c. 6, sayı 55, ss. 851-854, 1983.
- [24] B. Magnusson and U. Örnemark, "The fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics," Eurachem, İtalya, Rep. 2, 2014.
- [25] M. E. Swartz and I. S. Krull, "Analytical method development and validation," *Journal of Liquid Chromatography*, c. 21, sayı 3, ss. 433-434, 2006.
- [26] Food and Drug Administration, "Guidance for industry bioanalytical method Validation," U.S.A, Rep. 05, 2011.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Osman AKSU  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 06.04.1992 - Artvin  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**E-posta** : osmanaksu1992@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

| Derece    | Alan     | Okul/Üniversite                | Mezuniyet Yılı |
|-----------|----------|--------------------------------|----------------|
| Y. Lisans | Kimya    | Düzce Üniversitesi             | 2019           |
| Lisans    | Kimya    | Afyon Kocatepe<br>Üniversitesi | 2013           |
| Lise      | Düz lise | Burhaniye Lisesi               | 2009           |

### YAYINLAR:

O. Aksu, M. K. Temel Ü. Ergun, E. Kaya ve M. Dönmez, “Bazı antidepresan ve antiepileptik ilaçların insan kanında eş zamanlı analizi için LC-MS/MS yöntemi geliştirilmesi,” Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, c. 7, sayı 3, 2019.