

**VORTİOKSETİN'İN İNSAN PLAZMASINDAKİ TAYİNİ İÇİN KEMOMETRİK
OLARAK OPTİMİZE EDİLMİŞ YENİ BİR HPLC YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi
Nurana RASHIDOVA
Eskişehir 2020**

**VORTİOKSETİN'İN İNSAN PLAZMASINDAKİ TAYİNİ İÇİN KEMOMETRİK
OLARAK OPTİMİZE EDİLMİŞ YENİ BİR HPLC YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Nurana RASHIDOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temmuz 2020

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

ÖZET

VORTİOKSETİN'İN İNSAN PLAZMASINDAKİ TAYİNİ İÇİN KEMOMETRİK OLARAK OPTİMİZE EDİLMİŞ YENİ BİR HPLC YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Nurana RASHIDOVA

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2020

Danışman: Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR

Vortioksetin (VOR) yaşam kalitesini önemli ölçüde düşüren zihinsel bir hastalık olan majör depresyon bozukluğunun tedavisinde kullanılmaktadır. Hem seratonin taşıyıcısının inhibisyonu, hem de reseptör aktivitesinin modülasyonu olacak şekilde çift etkiye sahip olması nedeniyle ilgi odağı olmaktadır. Bu tez çalışması sırasında deneysel tasarım yöntemi kullanılarak, VOR'in insan plazmasındaki tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem sırasında Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 mm x 50 mm, 3,5µm partikül çapı) kolonu kullanılmıştır. Ön işlemlerden sonra iç standart (IS) olarak Klorpromazin (CLP) seçilmiştir. Hareketli faz olarak 30 mM fosfat tamponu (pH=3) ve ACN (65:35, h/h) karışımı kullanılmış, akış hızı 0,9 mL/dak , enjeksiyon hacmi 5 µL ve kolon sıcaklığı 35°C 'ye ayarlanmıştır. 230 nm dalga boyunda saptama yapılmıştır. VOR ve CLP için alıkonma zamanları sırasıyla 4,60 ve 3,63 dakika olarak bulunmuştur. Yöntemin doğrusallık aralığı 0,05-10 µg/mL, saptama ve tayin sınırları sırasıyla 0,004 µg/mL ve 0,013 µg/mL bulunmuştur. VOR insan plazmasındaki tayini için geliştirilen HPLC-DAD yöntemi ile % 100,1-103,9 aralığındaki geri kazanım ve %4'ten düşük bağıl standart sapma değerleri, yöntemin kesinliğini ve doğruluğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Vortioksetin; HPLC; İnsan plazması; Deneysel tasarım; Validasyon.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A NEW CHEMOMETRICALLY OPTIMIZED HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF VORTIOXETINE IN HUMAN PLASMA

Nurana RASHIDOVA

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2020

Supervisor: Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR

Vortioxetine (VOR) is used to treat major depression, a mental illness that causes significant reductions in quality of life. It is of interest as it has two effects both as inhibition of the serotonin transporter and modulation of receptor activity. During this thesis, using the experimental design method, HPLC method was developed for the determination of VOR in human plasma. During the method, the Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6 mm x 50 mm, 3.5 μ m particles) column was used. Chlorpromazine (CLP) was chosen as the internal standard (IS) after pretreatment. As a mobile phase, a mixture of 30 mM phosphate buffer (pH=3) and ACN (65:35, v/v) was used. The flow rate of 0.9 mL/min, injection volume of 5 μ L and column temperature set at 35° C were used. The detection was made at 230 nm. Retention times for VOR and CLP were 4.60 and 3.63 minutes, respectively. The linearity range of the method was 0.05-10 μ g/mL, the limits of detection and quantification were 0.004 μ g/mL and 0.013 μ g/mL, respectively. With the HPLC-DAD method developed for the determination of VOR in human plasma, 100.1 to 103.9% recovery and less than 4% relative standard deviation values show the precision and accuracy of the method.

Keywords: Vortioxetine; HPLC; Human plasma; Experimental design; Validation

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşarak bana rehber olup destek veren değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR'a çok teşekkür ederim.

Tezimin değerlendirilmesinde jüri üyesi olarak yer alan Sayın Prof. Dr. Dilek AK ve Sayın Prof. Dr. Ali ÖZCAN teşekkür ederim.

Tez süreci boyunca desteklerini hiç esirgemeyen, her zaman yanımda olan Prof. Dr. Dilek AK'a, Sakine ATİLLA KARACA'ya, Nurlan RASHIDOV'a sonsuz teşekkür ederim.

Nurana RASHIDOVA

09/07/2020

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait özgün bir çalışma olduğunu, çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	2
2.1. Vortioksetin	2
2.1.1. Fizikokimyasal özellikleri.....	2
2.1.2. Farmakolojik özellikleri.....	2
2.1.3. Farmakokinetik özellikleri.....	3
2.1.4. Farmakodinamik özellikleri.....	3
2.2. Vortioksetin Tayini ile İlgili Çalışmalar.....	4
2.3. Örnek Hazırlama.....	5
2.3.1. Plazma proteinlerini çöktürme işlemi.....	5
2.3.2. Kullanılan çöktürücü ajanlar.....	5
2.3.3. Çöktürücü maddelerin miktarları.....	6
2.3.4. Avantajları ve dezavantajları.....	7
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER.....	8
3.1. Kimyasal Maddeler.....	8
3.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler.....	8
3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	9
3.4. Numune Çözeltilerinin Hazırlanması.....	9
3.5. Kromatografik Koşullar.....	9
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	10
4.1 Yöntem Optimizasyon Çalışmaları.....	10

4.2. Yöntem Validasyonu.....	15
4.2.1. Kesinlik.....	15
4.2.2. Doğrusallık.....	16
4.2.3. Saptama sınırı ve tayin sınırı.....	17
4.2.4. Özgünlük.....	17
4.2.5. Sağlamlık.....	18
4.2.6. Stabilité.....	20
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	21
KAYNAKÇA.....	24
ÖZGEÇMİŞ.....	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1.	Çöktürücü ajanların, çöktürülen plazma proteini oranında % bağlı etkinlikleri.....	7
Çizelge 4.1.	Optimizasyonda kullanılan faktörler ve seviyeleri.....	10
Çizelge 4.2.	Deneyisel tasarımın planı ve gözlenen yanıtlar.....	10
Çizelge 4.3.	Modelin hesaplanan katsayıları ve onların p değerleri.....	11
Çizelge 4.4.	Optimizasyondaki her bir yanıt için alt, üst ve hedef değerler.....	13
Çizelge 4.5.	Bireysel ve genel isteklilik fonksiyonları	13
Çizelge 4.6.	Optimum çalışma koşulları.....	14
Çizelge 4.7.	Sistem uygunluk parametreleri.....	15
Çizelge 4.8.	Plazmaya eklenen VOR`in 0,6; 4 ve 9 µg/mL derişimlerinde doğruluk ve kesinlik sonuçları (n=7).....	16
Çizelge 4.9.	Plazmaya eklenen VOR`in 0,05-10 µg/mL derişim aralığında doğrusallık sonuçları (n=7).....	17
Çizelge 4.10.	Plazmaya eklenen VOR`in sağlamlık sonuçları.....	19
Çizelge 4.11.	Plazmaya eklenen VOR`in üç farklı koşulda stabilite sonuçları.....	20
Çizelge 5.1.	Biyolojik numunelerde VOR miktarının belirlenmesi için geliştirilen HPLC yöntemlerinin karşılaştırılması.....	23

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. VOR molekül formülü.....	2
Şekil 4.1. Kontur ve yüzey grafikleri.....	14
Şekil 4.2. Boş plazma, standart çözelti, kalite kontrol çözeltisi kromatogramları.....	18

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ach	: Asetilkolin
ACN	: Asetonitril
Adj, R ² _D	: Düzeltilmiş tayin katsayısı
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CLP	: Klorpromazin
D	: Genel isteklilik
DA	: Dopamin
DAD	: Diyod Dizisi Dedektörü
dp	: Partikül Çapı
GK	: Geri Kazanım
HA	: Histamin
HClO ₄	: Perklorik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPO ₄	: Metafosforik Asit
ICH	: Uluslararası Uyumluluk Konferansı (International Conference of Harmonization)
IS	: İç Standart
k _{CLP}	: Klorpromazin'in alıkonma faktörü
k _{VOR}	: Vortiksetin'in alıkonma faktörü
k'	: Kapasite faktörü
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
m	: Kalibrasyon eşitliğinin eğim değeri
MDB	: Majör Depresyon Bozukluğu
MeOH	: Metanol
MS	: Kütle Spektrometresi
N	: Teorik tabaka sayısı
n	: Enjeksiyon sayısı
NA	: Noradrenalin
ort	: Ortalama
PN	: Pik Normalizasyonu

R	: Rezolüsyon
R^2_D	: Tayin katsayısı
ss	: Standart Sapma
T	: Kuyruklanma faktörü
TCA	: Trikloroasetik Asit
T_{CLP}	: Klorpromazin`in kuyruklanma faktörü
T_{VOR}	: Vortioksetin`in kuyruklanma faktörü
UHPLC	: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	: Ultraviyole
VOR	: Vortioksetin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde Majör Depresif Bozukluk (MDB) önemli ölçüde yaşam kalitesine zarar vermektedir. Bu zihinsel hastalık Amerika Birleşik Devletleri nüfusunun %13-16'sını etkilemektedir (Grace vd., 2018). Tedavi sırasında çok fazla ilaç kullanılmasına rağmen, bunlar tedavinin ihtiyaçlarını karşılamamıştır (Atul, Paula and Yinzhong, 2013; Neven, 2012). Vortioksetin (VOR) ABD ve Kanada'da Trintellix®, dünya çapında Britellix® adı altında onaylanan yeni bir antidepresan ilaç olup, MDB tedavisindeki etkinliği gösterilmiştir (Atul, Paula and Yinzhong, 2013). Serotonin taşıyıcısının inhibisyonu ve reseptör aktivitesinin modülasyonu olarak 2 farklı multimodal farmakolojik etkiye sahiptir (Grace, Wencan and Michael, 2015; Grace vd., 2013; Grace vd., 2018).

Literatüre göre, biyolojik numunelerde VOR miktarının belirlenmesi için geliştirilen yöntemlerin çoğunluğu kütle spektrometrisi (MS) detektörleri ile birleştirilmiş HPLC'yi içermektedir (Kall, Rohde and Jørgensen, 2015; Qin vd., 2018; Huang vd., 2016; Gu vd., 2015). Biyolojik numunelerde VOR tayini için geliştirilmiş iki adet HPLC-DAD yöntemi vardır. Bunlardan birincisi; Wroblewski vd., (2017) tarafından gerçekleştirilen VOR miktarının insan serumu ve tükürük örneklerinde diyot dizisi detektörü ile birleştirilmiş bir HPLC yöntemi ile belirlenmesi, diğeri ise Chen vd., (2019) tarafından geliştirilmiş olan HPLC yöntemi ile VOR'un tavşan plazmasındaki tayinidir. Wroblewski vd., (2017) nin geliştirdiği yöntemde dar derişim aralığı, yüksek tayin sınırı ile uzun çalışma süresi (10 dakika) gibi dezavantajlar gözlenmektedir. Ve her iki çalışmada geleneksel tek değişkenli optimizasyon yaklaşımı kullanılmıştır (Wróblewski vd., 2017; Chen vd., 2019).

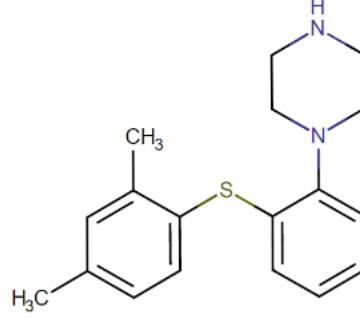
Bu tezin amacı, tek değişkenli optimizasyon yerine deneysel tasarım yaklaşımı kullanarak insan serumundaki VOR miktarının belirlenmesi için yeni, basit ve hızlı bir HPLC yöntemi geliştirmektir. Deneysel tasarım yöntemleri uygulanarak, geçerli ve güvenilir verilerin elde edilmesi ve aynı zamanda emek, zaman tasarrufu gibi avantajlar sağlanması hedeflenmiştir. Validasyon ICH kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir (ICH, 2005).

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Vortioksetin

2.1.1. Fizikokimyasal özellikleri

VOR kimyasal adı 1-[2-(2,4-dimetilfenil)sülfanilfenil]piperazin hidrobromür, kapalı formülü $C_{18}H_{23}BrN_2SBr$ ve molekül ağırlığı 379,35762 g/mol olan bir ilaç etkin maddesidir.



Şekil 2.1. VOR'in molekül formülü

Toz şeklinde olup, rengi beyazdan hafif bej-kreme kadar değişmektedir. 25°C'de saklanır ve suda az çözünmektedir (Andrew, Clayton and Jose, 2015).

2.1.2. Farmakolojik özellikleri

Depresyon Dünya Sağlık Örgütü raporlarına göre giderek daha da artmaktadır ve bu nedenle terminal aşamadaki kanser hastası ile aynı engellilik kategorisindedir. MDB değersizlik, umutsuzluk, karamsarlık dehşete düşme gibi olumsuzlukları içinde barındıran depresyon tipidir (Andrew and Emma, 2014; Sanil and James, 2017). Depresyon dünya nüfusunun yaklaşık %21'ni etkileyen kronik bir hastalık olup, kelime anlamı ("depres") çökkünlük, işlevsel ve yaşam aktivitesinin azalması anlamına gelmektedir (Grace, Wencan and Michael, 2015). Hastalarda işe başlamakta güçlük çekme, özel ajitasyon hissi, irritabilite, parkinsonizm, gastrointestinal, cinsel işlev bozuklukları, alerjik durumlar, vücut ağırlığının değişmesi, iştah artışı veya azalması gibi bulgulara rastlanmaktadır (Andrew and Emma, 2014; Filippo and Guido, 2013). İntihar düşünceleri majör depresyonun yan etkileri olarak insan hayatı için en güçlü risk faktörüdür (Enric, Victor, and Francese, 2014). Bu yüzden kısa zamanda depresyonun belirlenmesi önem taşımaktadır (Grace vd., 2013).

MDB sırasında çevresel olaylara tepkisizlik, hareketsizlik gibi bulgular gözlenmektedir, ayrıca uyku bozukluğu ve kronik ağrılar ortaya çıkmaktadır. Doğru

kullanılan antidepresan ilaçlarla depresyon belirtilerini azaltmak mümkündür (Grace, Wencan and Michael, 2015). Hastaların %50'sinde MDB belirtilerinde azalma görülürken, hastaların %15'i antidepresan ilaca hiç yanıt vermemekte; %25-30'i ise yetersiz yanıt vermektedir (Grace, 2018). Depresyon tedavisinde klinik yanıtın alınması için 2-8 hafta gerekmektedir. Bu da umutsuz ve karamsar hasta için çok zor olmakla birlikte akrabaları için doktora olan güven kaybı demektir. VOR çift etkiye sahip bir antidepresan olduğundan MDB tedavisinde kullanımı oldukça avantajlıdır (Estela vd., 2018; Atul, Paula and Yinzhong, 2013).

2.1.3. Farmakokinetik özellikleri

Serotoninin hem modülatörü hem de stimülatörü olan VOR, oral uygulama ile yavaş emilmektedir (Estela vd., 2018). İlaç kullanımının başlangıç dozu olarak 10 mg/gün uygulanmaktadır. Bir haftalık tedaviden sonra dozu 20 mg/gün'e kadar artırmak veya 5 mg/gün'e kadar azaltmak mümkündür (Enric, Victor, and Francesc, 2014).

Yoğun ekstrasvasküler dağılım göstererek 5 mg/gün, 10mg/gün, 20 mg/gün için dağılım hacmi 2500-3400 L arasında değişmektedir. Plazma proteinlerine bağlanma oranı plazma derişimlerinden bağımsız olup, %98-99 değerindedir (Filippo and Guido, 2013; Sanil and James, 2017).

2.1.4. Farmakodinamik özellikleri

Multimodal antidepresan olan VOR, geniş profilli klinik etkiye sahip bir ilaç olarak yalnız MDB tedavisinde değil, idrak disfonksiyonlarında da kullanılmaktadır. VOR bağlanması sıçan ve insan beyninde aynıdır (Enric, Victor, and Francesc, 2014).

5HT1B'nin reseptör agonisti gibi otreseptörleri bloke ederek dopamin (DA), noradrenalin (NA), asetilkolin (Ach), histamin (HA) salınımını 5HT1A reseptör agonisti gibi presinaptik otreseptörleri uyararak duyarsızlaşmasını sağlamaktadır ve gerialımı kesmektedir. DA, NA, HA ve serotonin salınımını artırmaktadır. Serotonin inhibitörü gibi SERT'i bloke ederek 5HT artışına neden olmaktadır (Bang-Andersen vd., 2011). Güçlü serotonin gerialım inhibitörü olan VOR sıçanlarda DA, NA, serotonin seviyelerini artırmaktadır. NA ve DA taşıyıcılarına düşük afiniteli, serotonin taşıyıcısına yüksek afiniteli bağlanan VOR atipik bir antidepresandır. 6-8 hafta boyunca iyi tolere edilir fakat gün içinde 15-20 mg VOR kullanan hastaların aniden tedaviyi kesmesi durumunda kas

gerginliği ve ani öfke patlaması gibi semptomlar yaşanmaktadır (Mork vd., 2013; Hvenegaard vd., 2012).

2.2. Vortiksetin Tayini ile İlgili Çalışmalar

Kall, Rohde and Jørgensen (2015) plazmada antidepresan VOR ve başlıca insan metabolitinin tayini için C8-SPE numune ekstraktlarının kullanıldığı bir izokratik katyon değişim HPLC-MS/MS yöntemi ve gradient elüsyonlu UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. HPLC yönteminde %80 asetonitril ve %20 amonyum asetat (20 mM, pH 3) (h/h) dan oluşan bir hareketli faz karışımı kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 µL ve akış hızı 0,3 mL/dak olarak ayarlanmıştır. VOR`in alıkonma zamanı 4 dakika olarak gözlenmiştir. UPLC yönteminde ise A Waters BEH C18 (2.1 mm, 50 mm, 1.7 µm) kolonu kullanılmıştır. Hareketli faz olarak, A (%0,01 formik asit / asetonitril) ve B (%0,01 formik asit [h/h] / asetonitril [5/95]) içeren doğrusal bir gradient kullanılarak, enjeksiyon hacmi 4 µL olacak şekilde 60 °C'de ve 0,60 mL/dak akış hızında çalışılmıştır. Yöntemlerin doğrusallığı HPLC-MS/MS için 0,400–100 ng/mL, UPLC-MS/MS için 0,200–50,0 ng/mL aralığında olup; yöntemlerin tayin sınırları HPLC-MS/MS için 0,400 ng/mL, UPLC-MS/MS için 0,200 ng/mL olarak bulunmuştur.

Diğer bir çalışmada Qin vd., (2018) sıçan plazmasında deuvortiksetin, VOR ve karboksilik asit metabolitinin eşzamanlı tayini için Waters Xterra C18 (2,1 mm, 150 mm, 5 µm) kolonunun kullanıldığı bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Metanol ve su içinde %0,1 formik asit ve 10 mmol/L amonyum format karışımından oluşan hareketli faz kullanılmıştır. Akış hızı 0,2 mL/dak olarak ayarlanmıştır. VOR`in alıkonma zamanı 3,57 dakika olarak gözlenmiştir. Yöntem 5-1000 ng/mL aralığında doğrusaldır.

Huang vd., (2016) UPLC–MS/MS yöntemi ile sıçan plazmasında VOR, karvedilol ve aktif metaboliti 4-hidroksifenil karvedilolün eşzamanlı miktar tayini için hızlı ve hassas bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışma sırasında Acquity UPLC BEH C18 kolonu ile hareketli faz olarak; asetonitril, su ve %0,1 formik asit karışımı gradient elüsyon şeklinde kullanılarak yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Akış hızının 0,4 mL/dak olarak ayarlandığı çalışmada VOR alıkonma zamanı 1,61 dakika olarak bulunmuştur. Geliştirilen bu yöntem VOR için 0,5-100 ng/mL aralığında doğrusaldır.

Gu vd., (2015) sıçan plazmasında VOR tayini için UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Tayin, Acquity UPLC BEH C18 kolon kullanılarak, su ve asetonitril içinde % 0,1 formik asit içeren bir hareketli faz ile yapılmıştır. Yöntem, 0,05-20 ng/mL

aralığında mükemmel bir doğrusallığa sahiptir. Ekstraksiyon geri kazanımı VOR için % 78,3-88,4 ve karbamazepin için %80,3 aralığında olmuştur.

Wróblewski vd., (2017) insan tükürüğü ve serumunda VOR'in hızlı miktar tayini için diyot dizi detektörü (HPLC-DAD) ile hassas ve seçici bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. %70 metanol, %30 asetat tamponu (pH 3,5), içeren hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilmiş metodla %100,22- 104,73 oranında geri kazanım elde edilmiştir.

Chen vd., (2019) çalışmasında iç standart (IS) olarak dapoksetin kullanarak tavşan plazma örneklerinde VOR'in belirlenmesi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Numune hazırlama, etil asetat ile tek aşamalı sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile yapılmış ve kromatografik ayırma, 35°C'de bir Agilent ZORBAX SB-C18 (4,6 mm x 125 mm, 5 µm) kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen HPLC yöntemi ile VOR'in alıkonma süresi 6,08 dakika olarak bulunmuştur.

2.3. Örnek Hazırlama

2.3.1. Plazma proteinlerini çöktürme işlemi

Biyoanalizlerde küçük moleküller, metabolik yan ürünler, tuzlar ve aynı zamanda bir miktar protein içeren matrisler kullanılmaktadır. Proteinler sisteme enjekte edilmeden önce matrisden uzaklaştırılması gerekmektedir. Analiz öncesi bu bileşiklerin uzaklaştırılması gibi ön işlem yapılmadığı zaman kromatografik sistem içine enjekte edilen proteinler hareketli fazlarda kullanılan organik çözücüler ve tampon tuzları ile temas ederek kolon ömrünün kısılmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda sistem basıncının artmasına neden olacak şekilde kolon girişinde birikmektedir (Wells, 2003).

Örnekten proteinin uzaklaştırılması için uygulanan en yaygın yöntem proteinlerin çöktürülmesi işlemidir. Bunun için organik çözücüler, iyonik tuzlar ve inorganik asitler kullanılmaktadır. Çöken kütle, santrifüjle veya filtrasyon ile ayrılır. Daha sonra süzüntü kullanılarak analizi yapılmaktadır.

2.3.2. Kullanılan çöktürücü ajanlar

Proteinlerin, trikloroasetik asit (TCA; %10, a/h), perklorik asit (%6, a/h) ve metafosforik asit (%5, a/a) gibi güçlü asitlere maruz kaldıklarında çöktükleri bilinmektedir. Ve bu asitler belirtilen derişimlerde protein üzerindeki temel bölgeleri protonlu hale getirir ve daha sonra izoelektrik noktalarının altında bir pH'da çözünmez

tuzlar oluşturur. İzoelektrik nokta protein molekülünün yüksüz olduğu pH'dır. İzoelektrik noktasından daha yüksek bir pH değerinde, protein bir baz olarak; izoelektrik noktasından daha düşük bir pH değerinde, bir asit olarak işlev görmektedir. Bir proteinin izoelektrik noktasında minimum viskozitesi vardır ve bu değerde proteinler daha kolay topaklaşabilir. Fakat trikloroasetik, perklorik ve metafosforik asitler bazı dayanıksız moleküller için çok sert olarak bilinmektedir. Aynı zamanda düşük hacim oranlarındaki büyük verimlilik, özellikle TCA'nın çok yaygın tercih edilme nedenidir.

Aynı zamanda proteinlerin asitlerden daha az etkili metanol, etanol, asetonitril ve aseton gibi organik çözücülerle çöktürülmesi ve bu çözücülerin dielektrik sabitini düşürdüğü, protein-protein etkileşimlerini arttırdığı bilinmektedir. Bu organik çözücüler ayrıca LC hareketli fazlarla daha uyumludur ve doğrudan enjekte edilebilmektedir. Karıştırma işleminden sonra, tüpün üst fazı doğrudan enjeksiyon için uygundur (Wells, 2003).

2.3.3. Çöktürücü maddelerin miktarları

Çöktürücü madde miktarının numune matriksine (örn., Plazma) oranı, proteinlerin verimli bir şekilde uzaklaştırılması için önemlidir. Çizelge 2.1'de görüldüğü gibi asitler organik çözücülerden daha etkili çöktürücü ajanlardır. Proteinlerin çöktürülmesi için, 1 hacim plazma ile 0,6 hacim %10 HClO₄ veya %5 HPO₄ kullanıldığında %98'den daha yüksek verim sağlanmaktadır. Çöktürme işlemi organik çözücülerle yapıldığında daha yüksek hacimler gerektirir. 1 hacim plazmaya karşı 3 hacim asetonitril ile %99,8; 3 hacim metanol kullanıldığında ise %98.9 düzeyinde verim elde etmek mümkündür. Maksimum verim elde etmek için 1 hacim plazmaya karşı 3 hacim asetonitril veya 4 hacim metanol kullanılması gerekmektedir (Wells, 2003).

Çizelge 2.1. Çöktürücü ajanların, çöktürülen plazma proteini oranında % bağıl etkinlikleri (Wells, 2003)

Çöktürücü	Süzüntünün pH'sı	0,6 hacim	1 hacim	2 hacim	3 hacim	4 hacim
Asetonitril	8,5-9,5	45,8	97,2	99,7	99,8	99,8
Aseton	9,0-10	33,6	96,2	99,4	99,2	99,1
Metanol	8,5-9,5	32,2	73,4	98,7	98,9	99,2
Etanol	9,0-10	41,7	91,4	98,3	99,1	99,3
%10 TCA	1,4-2,0	99,6	99,5	99,8	99,8	99,8
%10 HClO ₄	<1,5	98,9	99,1	99,1	99,1	99,0
%5 HPO ₄	1,6-2,7	98,1	98,3	98,4	98,2	98,1

2.3.4. Avantajları ve dezavantajları

Protein çöktürme en yaygın kullanılan örnek hazırlama yönteminden biridir, çünkü plazmadaki küçük ilaç molekülleri için basit ve neredeyse evrensel bir prosedürdür. Diğer tekniklerde olduğu gibi pH modifikasyonu yoktur, bu nedenle analitin iyonize olması, veya olmaması yöntemin sonucu için önemli değildir. Hızı gerçek bir avantajdır ve yöntem validasyonuna geçmeden önce zaman israfını önlemektedir. Numune hazırlamaya yönelik bu yaklaşım maddi olarak ucuzdur ve analite hiçbir şekilde zarar vermez. Protein bağlanma derecesi %99'u aşıya bile yüksek oranda analit geri kazanımı (>%95) elde edilebilir. Çoğu zaman, protein çökmesi başka bir teknik için bir ön-muamele basamağı olarak gerçekleştirilir ve prosedüre çok az çaba ile kolayca eklenebilir. Çok küçük numune hacimleri (örn., 20-50 µL plazma) kullanılarak proteini etkin bir şekilde elimine edilebilir, çünkü bu çöktürme tekniği minimum numune transfer ve izolasyon adımlarına sahiptir.

Bu hızlı numune hazırlama yaklaşımıyla tatmin edici sonuçlar elde edilmektedir, ancak birkaç dezavantajı vardır. Protein çökeltmesi tipik olarak numuneyi üç veya daha fazla oranda seyreltir. Bu nedenle, sadece analit derişimi yüksek olduğunda (1-10 ng/mL) ve saptama sınırları yeterli miktar tayinine izin verdiğinde faydalı bir tekniktir. Bununla birlikte, bu seyreltme etkisini önlemek için süzütünün azot ve ısı kullanılarak buharlaştırılması mümkündür. Analizlerde bu yöntem kullanılmasıyla protein uzaklaştırılması yeterince iyi sonuç vermediği durumlarda diğer örnek hazırlama yöntemlerine başvurulmaktadır. Buradan da anlaşıldığı gibi çöktürücü ajan seçimi çok önemlidir ve bu çalışmada organik çöktürücü olan asetonitril kullanılmıştır.

3.GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Maddeler

Vortiooksetin	: Santa Cruz Biotechnology, ABD
Klorpromazin	: Sigma Aldrich, Çin
Su	: Sartorius Stedim Biotech, Almanya
Asetonitril	: Merck, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	: Merck, Almanya
Fosforik asit	: Merck, Almanya

3.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler

HPLC	: Agilent 1290 Infinity binary (ikili pompa, degazör, otosampler ve termostatlı kolon bölümlerinden oluşan) LC Sistemi, Almanya
HPLC kolonu	: Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 mm, 5,0 mm, 3,5 mm)
Santrifüj cihazı	: Eppendorf, Centrifuge 5810 R, Almanya
Ultra saf su cihazı	: Millipore Ultrapure Water System, Fransa
Vorteks karıştırıcı	: Jeio Tech, VM 96 B, Kore
Ultrasonik banyo	: Bandelin Electronic, RK510 H, Almanya
Su banyosu	: Memmert, WNB 14, Almanya

pH metre	: Mettler Toledo, Seven Compact pH/ion meter S220, İsviçre
Hassas terazi	: Mettler Toledo, XP205, İsviçre
Buzdolabı	: Arçelik, No Frost & Electronic, Türkiye

3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

1 mg/mL derişimdeki VOR stok çözeltisi, VOR standart maddesi metanolde çözölerek hazırlanmıştır. Bu stok VOR çözeltisinden metanol ile gerekli seyreltmeler yapılarak, çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. İç standart olarak klorpromazin (CLP) standart maddesi kullanılmıştır. CLP'nin stok çözeltisi 1 mg/mL derişimde metanol içerisinde hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler metanol ile yapılmış ve analiz edilen bütün çözelti 10 µg/mL CLP içerecek şekilde eklemeler yapılmıştır.

3.4. Numune Çözeltilerinin Hazırlanması

100 µL VOR, 100 µL CLP ve 100 µL plazma vorteks cihazı ile karıştırılmış, daha sonra 200 µL ACN eklenerek yeniden vorteksle karıştırılmıştır. Ve ardından 15 dakika 25°C'de 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra berrak süpernatant ayrılmış ve analizden önce süzölmüştür.

3.5. Kromatografik Koşullar

Çalışmada Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 mm x 50 mm; 3,5 µm) kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 30 mM fosfat tamponu ve ACN (65:35, h/h) karışımı kullanılmış; akış hızı 0,9 mL/dak, enjeksiyon hacmi 5 µL ve kolon sıcaklığı 35°C'ye ayarlanmıştır. 230 nm dalga boyunda saptama yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Yöntem Optimizasyon Çalışmaları

Optimizasyon çalışması için, Box-Behnken tasarımı kullanılmıştır. Her biri üç seviyede değişen üç faktör (bağımsız değişkenler), yapılan ön deneylerin yanıtları sonucunda seçilmiştir. Bu faktörler tampon derişimi (x_1), asetonitril içeriği (x_2) ve akış hızı (x_3) olarak ayarlanmış, faktör ve seviyeleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Optimizasyonda kullanılan faktörler ve seviyeleri

Faktörler	Seviyeler		
	-1	0	+1
Tampon derişimi, mM (x_1)	10	20	30
Asetonitril içeriği, % (x_2)	30	35	40
Akış hızı, mL/dk (x_3)	0,8	0,9	1

Hareketli fazın pH’ı ve kolon sıcaklığı öngörülebilir olduğu için çalışma sırasında optimize edilmiştir. Optimizasyon sırasında iç standart olarak CLP ve karbamazepin denenmiş, sonuç olarak CLP, uygun pik şekli ve alıkonma zamanının VOR’e daha yakın olmasından dolayı tercih edilmiştir. VOR ve CLP alıkonma faktörü yanıt olarak tanımlanmıştır. 20 µg/mL VOR ve 20 µg/mL CLP içeren çözelti kullanılarak Box-Behnken tasarımına göre 15 analiz rastgele sırada yapılmıştır. Deneysel tasarımın planı ve gözlenen yanıtlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Deneysel tasarımın planı ve gözlenen yanıtlar.

Deney no	Faktör seviyeleri			Yanıtlar		
	x_1	x_2	x_3	T_{CLP}	k_{VOR}	R
1	-1	-1	0	1,53	24,45	5,80
2	1	-1	0	1,24	25,93	5,92
3	-1	1	0	1,66	3,78	2,66
4	1	1	0	1,39	3,89	2,68
5	-1	0	-1	1,63	9,24	4,33
6	1	0	-1	1,31	9,40	4,40
7	-1	0	1	1,65	8,30	4,12
8	1	0	1	1,32	9,04	4,32
9	0	-1	-1	1,30	28,43	5,96
10	0	1	-1	1,46	3,94	2,76
11	0	-1	1	1,33	25,53	6,02

Çizelge 4.2. Deneyisel tasarımın planı ve gözlenen yanıtlar (devam)

12	0	1	1	1,46	3,64	2,57
13	0	0	0	1,41	8,86	4,33
14	0	0	0	1,41	9,04	4,35
15	0	0	0	1,40	9,09	4,37

x_1 : tampon derişimi; x_2 : asetonitril içeriği; x_3 : akış hızı; T_{CLP} : CLP'nin kuyruklanma faktörü; k_{VOR} : VOR'in alıkonma faktörü; R: rezolüsyon.

Her koşul için 3 tekrarlı analizler yapılarak veriler toplanmış ve Eşitlik 1'deki gibi ikinci dereceden yanıt modelleri oluşturulmuştur:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (1)$$

burada Y yanıt; x_1 , x_2 , x_3 faktör; b ise katsayılarıdır. Yanıtların hesaplanan katsayıları ve p değeri Çizelge 4.3'de verilmiştir. p değerinin 0,05 den küçük olması faktörün yanıt ile anlamlı şekilde etkileşime girdiğini gösterir. Katsayının pozitif bir sayı olması, faktörün değerinin artması ile yanıtın da arttığını, negatif bir sayı olması ise faktörün değerinin artması ile yanıtın azaldığını ifade eder. Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi üç faktör de yanıtlar üzerinde etkili bulunmuştur. Ancak faktörlerin birden çok yanıt üzerindeki farklı etkilerinin olması tüm yanıtların eş zamanlı olarak optimizasyonunu zorlaştırmıştır.

Çizelge 4.3. Modelin hesaplanan katsayıları ve onların p değerleri.

Sabitler	T_{CLP}	p	k_{VOR}	p	R	p	D	p
b0	1,407	0,000*	8,995	0,000*	4,347	0,000*	0,750	0,001*
b1	-0,153	0,000*	0,313	0,242	0,052	0,046*	0,180	0,031*
b2	0,072	0,000*	-11,136	0,000*	-1,630	0,000*	-0,012	0,848
b3	0,006	0,312	-0,563	0,063	-0,052	0,046*	-0,034	0,598
b11	0,068	0,000*	-0,435	0,266	-0,058	0,102	-0,029	0,754
b22	-0,021	0,039*	5,953	0,000*	-0,025	0,424	-0,539	0,002*
b33	0,003	0,746	0,435	0,266	0,004	0,902	-0,158	0,136
b12	0,004	0,627	-0,342	0,353	-0,024	0,434	0,040	0,658
b13	0,000	0,975	0,145	0,682	0,031	0,316	0,015	0,865
b23	-0,006	0,429	0,651	0,109	-0,064	0,069	-0,053	0,561
R^2_D	0,9960		0,9980		0,9933		0,9312	
Adj, R^2_D	0,9988		0,9945		0,9980		0,074	

k_{CLP} : CLP'in alıkonma faktörü; T_{CLP} : CLP'in kuyruklanma faktörü; k_{VOR} : VOR'in alıkonma faktörü; T_{VOR} : VOR'in kuyruklanma faktörü; R: Rezolüsyon; D: Genel isteklilik; R^2_D : Tayin katsayısı; Adj, R^2_D : Düzeltilmiş tayin katsayısı.

R^2_D değerlerinin yüksek olması kurulan modellerin denkleme iyi uyduğu anlamına gelmektedir. İlk başta k_{CLP} , T_{CLP} , k_{VOR} , T_{VOR} , R ve D değerlerinin hepsi değerlendirilmiş; fakat R^2_D değerinin düşük olması kurulan denklemin modeli iyi yansıtmadığı anlamına gelmiştir. T_{VOR} , iki maddenin tutunma özelliklerinin birbirine benzediği için yani hem k_{CLP} hem de k_{VOR} değerine gerek duyulmadığı için k_{CLP} değeri elenmiştir.

Birden fazla yanıtı optimize etmek için yaygın olan bir yöntem, isteklilik fonksiyonu yaklaşımı olduğundan bu çalışmada Derringer'in isteklilik işlevi, aynı anda dört yanıtı optimize etmek için kullanılmıştır. İlgili denklemler (Denklem 1-3) kullanılarak her bir bireysel yanıt, bir bireysel isteklilik fonksiyonuna (d_i) dönüştürülmüştür. İsteklilik fonksiyonu (d_i), tamamen istenmeyen değer için 0, tamamen istenen değer için 1 değerine sahiptir. İsteklilik fonksiyonu hesaplanırken yanıtın en yüksek değerini alması isteniyorsa Eşitlik 1, en düşük değerini alması isteniyorsa Eşitlik 2, düşük ve yüksek değer arasında bir hedef değerde olması isteniyorsa Eşitlik 3 kullanılır.

$$d = \begin{cases} 0 & Y_i \leq L_i \\ \left[\frac{Y_i - L_i}{T_i - L_i} \right]^s & L_i < Y_i \leq T_i \\ 0 & Y_i \geq T_i = U_i \end{cases} \quad (1)$$

$$d = \begin{cases} 1 & Y_i \leq T_i = L_i \\ \left[\frac{Y_i - U_i}{T_i - U_i} \right]^s & U_i < Y_i \leq T_i \\ 0 & Y_i \geq U_i \end{cases} \quad (2)$$

$$d = \begin{cases} \left[\frac{Y_i - L_i}{T_i - L_i} \right]^s & L_i \leq Y_i \leq T_i \\ \left[\frac{Y_i - U_i}{T_i - U_i} \right]^s & T_i < Y_i < U_i \\ 0 & Y_i < L_i \quad Y_i > U_i \end{cases} \quad (3)$$

Denklemden L_i , en düşük değer; U_i , en yüksek değer ve T_i , Y_i yanıtı için istenen hedef değerdir. s ve t ağırlık olup, istenen işlevin doğrusallığı için s ve t 'nin 1'e eşit olması gerekir ve bu değerler 1'den fazla hedef değer olduğunda seçilebilir. Yanıtlar ve alt, üst hedef değerler Çizelge 4.4'de verilmiştir. Genel istekliliği hesaplamak için, ayrı ayrı isteklilik fonksiyonlarının (Denklem 4) geometrik ortalaması hesaplanmaktadır.

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{1/n} \quad (4)$$

Her koşul için hesaplanan yanıtların bireysel isteklilik değerleri ve genel isteklilik değerleri, Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Optimizasyondaki her bir yanıt için alt, üst ve hedef değerler.

Yanıt	L_i değeri	T_i değeri	U_i değeri	s	t
k_{VOR}	3,64	8,5	28,43	1	1
T_{CLP}	1,24	1,24	1,66	1	1
R	2,57	4,0	6,02	1	1

k_{VOR} : VOR'in alıkonma faktörü; T_{CLP} : CLP'in kuyruklanma faktörü; L_i : en küçük değer; T_i : hedef değer; U_i : en yüksek değer; s ve t: ağırlık.

Çizelge 4.5. Bireysel ve genel isteklilik fonksiyonları.

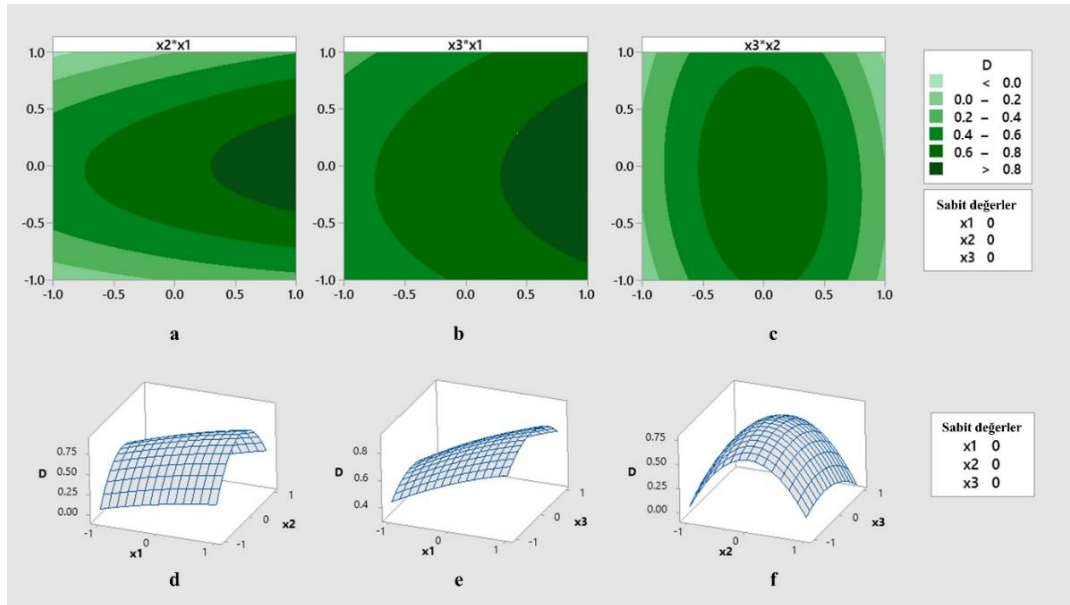
Deney no	d (T_{CLP})	d (k_{VOR})	d (R)	D
1	0,32	0,20	0,11	0,24
2	1,00	0,13	0,05	0,28
3	0,00	0,03	0,06	0,00
4	0,65	0,05	0,08	0,21
5	0,07	0,96	0,84	0,30
6	0,84	0,95	0,80	0,86
7	0,04	0,96	0,94	0,24
8	0,81	0,97	0,84	0,86
9	0,85	0,00	0,03	0,00
10	0,47	0,06	0,13	0,21
11	0,80	0,15	0,00	0,00
12	0,48	0,00	0,00	0,00
13	0,60	0,98	0,84	0,75
14	0,60	0,97	0,83	0,75
15	0,62	0,97	0,82	0,75

d (T_{CLP}): CLP'nin kuyruklanma faktörü için bireysel isteklilik fonksiyonu; d (k_{VOR}): VOR'in alıkonma faktörü için bireysel isteklilik fonksiyonu; d (R): Rezolüsyon için isteklilik fonksiyonu; D: Genel isteklilik

İkinci dereceden genel isteklilik (D) denklemi, Minitab 17 yanıt optimize edici kullanılarak çözülmüş, çözüm yüzey ve kontur grafikleri ile tutarlı bulunmuştur. En yüksek D değerine (0,86) sahip olan optimum koşullar fosfat tamponu (pH:3, 30 mM) ve asetonitril karışımı (65:35, h:h) olup, akış hızı 0,9 mL/dk dır. Optimum çalışma koşulları Çizelge 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. *Optimum çalışma koşulları*

Sabit faz:	Zorbax Eclipse Plus-C18 (4.6 mm×50 mm, 3.5 µm)
Hareketli faz:	30 mM fosfat tamponu (pH: 3) : ACN (65:35, h/h)
Kolon sıcaklığı:	35°C
Akış hızı:	0,9 mL/dk
Çalışma dalga boyu:	230 nm
Enjeksiyon hacmi:	5 µL
İç standart:	CLP



Şekil 4.1. *Kontur ve yüzey grafikleri*

Kontur ve yüzey grafikleri: (a ve d), D (isteklilik) = f [tampon derişimi (x_2), hareketli fazın pH'ı (x_1)]; (b ve e) (D isteklilik) = f (asetonitrilin ilk yüzdesi (x_3), hareketli fazın pH'ı (x_1)) (c ve f) (D isteklilik) = f [(asetonitrilin ilk yüzdesi (x_3), tampon derişimi (x_2))]

Optimum çalışma koşullarında analizler yapılmış ve bulunan sistem uygunluk testi sonuçları Çizelge 4.7'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Sistem uygunluk parametreleri

Parametre (n=7, 10 µg/mL)	Gözlenen değer	Önerilen değer (ICH, 2005)
Alıkonma zamanı (dakika)	4,60	-
Kapasite faktörü (k')	7,30	2-10
Kuyruklanma faktörü (T)	1,16	≤2
Rezolüsyon (R)	4,57	>2
Teorik tabaka sayısı (N)	6103	>2000
Alıkonma zamanının % BSS'si	0,60	<1

4.2. Yöntem Validasyonu

VOR için geliştirilen HPLC yöntemi, Uluslararası Uyumluluk Konferansı'na göre kesinlik, doğrusalılık, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ), özgünlük, sağlamlık, stabilite parametreleri araştırılarak valide edilmiştir (ICH, 2005). Deneylerde standartların ve iç standardın pik normalizasyon oranları (PNO; $PNO = \frac{PN\ Std}{PN\ IS}$, $PN = \frac{\text{pik alanı}}{\text{pik alıkonma zamanı}}$) kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. İstatistiksel hesaplamalar Microsoft Excel programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. Kesinlik

Yöntemin kesinliği, günler içi ve günler arası tekraredilebilirlik ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla 0,6; 4 ve 9 µg/mL derişimlerde çözeltiler hazırlanmış, 3 gün ve 7'şer kez (n=7) enjeksiyonları yapılmıştır. Kesinlik, yüzde bağıl standart sapma (%BSS) ile verilmiştir. Kesinlik ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir. Çizelge 4.8 incelendiğinde gün içi ve günler arası deneylerden elde edilen %BSS değerlerinin %1,07'den küçük olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.8. Plazmaya eklenen VOR`in 0,6; 4 ve 9 µg/mL derişimlerinde doğruluk ve kesinlik sonuçları (n=7)

Parametre (0,6 µg/mL)	Gün İçi			Günler Arası
	I Gün (n=7)	II Gün (n=7)	III Gün (n=7)	(n=21)
Bulunan VOR derişimi	0,6236±	0,6195±	0,6268±	0,6233±
(ortalama±standart sapma) (µg/mL)	0,0032	0,0016	0,0017	0,0038
%BSS	0,5178	0,2508	0,2763	0,6068
%Geri Kazanım	103,94	103,24	101,52	103,88
%Hata	3,94	3,24	4,47	3,88

Parametre (4 µg/mL)	Gün İçi			Günler Arası
	I Gün (n=7)	II Gün (n=7)	III Gün (n=7)	(n=21)
Bulunan VOR derişimi	4,0026±	4,0140±	4,0143±	4,0101±
(ortalama+standart sapma) (µg/mL)	0,0426	0,0018	0,0025	0,0240
%BSS	1,0636	0,0447	0,0619	0,5989
%Geri Kazanım	100,07	100,34	103,36	100,25
%Hata	0,07	0,34	0,36	0,25

Parametre (9 µg/mL)	Gün İçi			Günler Arası
	I Gün (n=7)	II Gün (n=7)	III Gün (n=7)	(n=21)
Bulunan VOR derişimi	9,1173±	9,1345±	9,1180±	9,1233±
(ortalama+standart sapma) (µg/mL)	0,0150	0,0257	0,0570	0,0361
%BSS	0,1641	0,0256	0,6247	0,3957
%Geri Kazanım	101,30	101,49	101,31	101,37
%Hata	1,30	1,49	1,31	1,37

4.2.2. Doğrusallık

Yöntemin doğrusalılığı, 7 nokta içeren 3 kalibrasyon setinin analizi ile gösterilmiştir. 0,05-10 µg/mL derişim aralığındaki VOR çözeltilerinin üç ayrı günde ve 7’şer kez enjeksiyonları yapılmıştır. Doğrusallık sonuçları Çizelge 4.9’da belirtilmiştir.

Çizelge 4.9. Plazmaya eklenen VOR`ın 0,05-10 µg/mL derişim aralığında doğrusallık sonuçları (n=7)

Parametre	Gün İçi			Günler Arası
(0,05-10 µg/mL)	1.Gün (n=7)	2.Gün (n=7)	3.Gün (n=7)	Tüm günler (n=21)
Eğim+standart sapma	0,3589±0,0022	0,3477±0,0013	0,3509±0,0008	0,3525±0,0014
Kesim+standart sapma	-0,0005±0,0095	0,0230±0,0032	0,0094±0,0060	0,0106±0,0062
Tayin katsayısı (r ²)	0,9994	0,9990	0,9994	0,9994
LOD (µg/mL)			0,004	
LOQ (µg/mL)			0,013	

4.2.3. Saptama sınırı ve tayin sınırı

Yöntemin saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) aşağıda verilen eşitlikler ile hesaplanmıştır.

$$LOD = 3,3 \times \text{standart sapma (ss)}/\text{eğim (m)}$$

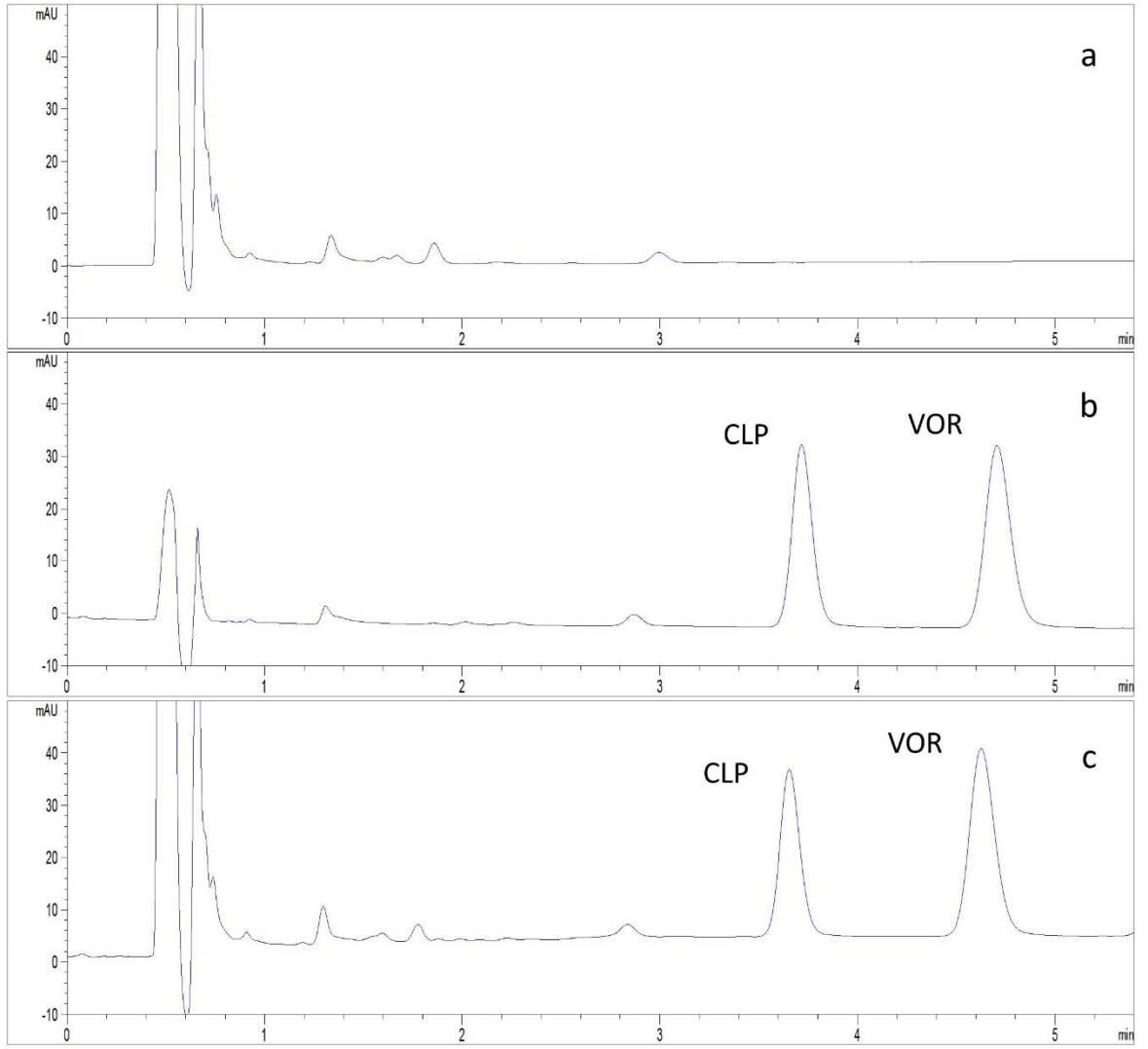
$$LOQ = 10 \times \text{standart sapma (ss)}/\text{eğim (m)}$$

Bu formüllerde yer alan SS= düşük derişimdeki madde çözeltisinin standart sapma değeri ve m= kalibrasyon eşitliğinin eğim değeridir. Geliştirilen yöntemle VOR tayini için LOD değeri 0,004 µg/mL, LOQ değeri ise 0,013 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.2.4. Özgünlük

Yöntemin özgünlüğü, boş plazma ve plazmaya eklenen VOR çözeltilerinin kromatogramları karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve boş plazma kromatogramında analitlerin tutulma süresinde herhangi bir girişim gözlenmemiştir.

Boş plazma, standart çözelti ve kalite kontrol çözeltisi kromatogramları Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Boş plazma (a), standart çözelti (9 µg/mL VOR ve 10 µg/mL CLP içeren) (b), kalite kontrol çözeltisi (9 µg/mL VOR ve 10 µg/mL CLP içeren) kromatogramları (c).

4.2.5. Sağlamlık

Geliştirilen yöntem parametrelerinde küçük değişiklikler yapılmış; VOR alıkonma zamanı, %geri kazanımı, sistem uygunluk parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar normal koşullarda elde edilen parametrelerle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırılan sonuçların birbirine yakınlığı belirtilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. *Plazmaya eklenen VOR`in sağlamlık sonuçları*

Parametre	% Geri Kazanım	Alıkonma faktörü	Teorik tabaka sayısı	Kuyruklanma faktörü	Rezolüsyon
Hareketli faz					
pH değeri					
2,9	101,79±0,09	7,66±0,05	6356±201,49	1,13±0,00	4,67±0,02
3,1	101,75±0,09	7,92±0,04	6221±77,26	1,13±0,00	4,72±0,02
Organik faz					
yüzdesi (%)					
33	99,44±0,21	10,45±0,13	6003±69,95	1,13±0,00	5,15±0,01
37	101,57±0,38	5,27±0,02	5870±99,23	1,16±0,01	3,83±0,02
Tampon					
derişimi (mM)					
28	99,74±0,59	7,59±0,03	6054±105,72	1,15±0,00	4,55±0,01
32	101,69±0,09	7,52±0,08	6352±40,27	1,13±0,01	4,63±0,02
Dedektör					
dalga boyu (nm)					
228	101,16±0,03	7,33±0,01	6108±77,31	1,14±0,01	4,51±0,01
232	100,49±0,48	7,34±0,00	5935±29,69	1,15±0,00	4,55±0,01
Akış hızı					
(mL/dk)					
0,8	98,16±0,11	7,18±0,01	6131±89,09	1,14±0,01	4,44±0,00
1	101,24±0,24	7,29±0,03	5904±42,78	1,14±0,00	4,41±0,00
Kolon					
sıcaklığı					
33	99,93±0,90	7,37±0,01	5991±80,85	1,14±0,01	4,37±0,02
37	100,80±0,01	7,18±0,00	6044±81,98	1,15±0,00	4,56±0,02

4.2.6. Stabilité

Geliştirilen yöntemin stabilitesini hesaplamak için 3 farklı koşulda (kısa dönem için oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek, uzun dönem için -20°C ısıda 2 hafta bekletilerek ve üç döngülü dondurma-eritme işleminden sonra) analiz yapılmış, %geri kazanım ve %BSS değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.11’de sunulmuştur. %Geri kazanım değerinin %100-102 aralığında bulunması, VOR stabilitesinin her 3 koşulda da uygun olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.11. *Plazmaya eklenen VOR`in üç farklı koşulda stabilite sonuçları*

Teorik derişim (µg/mL)	Kısa dönem kararlılığı (24 saat, oda sıcaklığında)		Uzun dönem kararlılığı (2 hafta,-20 °C)		Dondurma-eritme kararlılığı (üç döngü)	
	% Geri Kazanım (ort.+ss)	BSS (%)	% Geri Kazanım (ort.+ss)	BSS (%)	% Geri Kazanım (ort.+ss)	BSS (%)
0,6	101,13±0,0002	0,08	101,43±0,0004	0,18	101,62±0,005	0,25
4	100,88±0,0042	0,29	101,63±0,0052	0,36	100,88±0,0027	0,19
9	100,92±0,0080	0,25	101,63±0,0011	0,03	101,34±0,0013	0,04

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

VOR, depresyon tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu kapsamda VOR'in insan plazmasındaki tayini için kemometrik olarak optimize edilmiş yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem; kesinlik, doğrusallık, LOD, LOQ, özgünlük, sağlamlık, stabilite parametreleri ile değerlendirilerek ICH (2005)'e göre valide edilmiştir.

Deneysel tasarım yaklaşımının kullanımı geçerli ve güvenilir verilerin kazanılması; kaynak, zaman ve emek tasarrufu gibi avantajlar sağlamıştır. Box-Behnken tasarımı ile, normal teknikten az çalışma yapılarak kesinliği daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Genel olarak, ürünü veya süreci etkileyen bağımsız değişkenler veya faktörler tanımlanmış ve daha sonra bunların bağımlı bir değişken veya yanıt üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Literatürde genellikle biyolojik örneklerde VOR tayini için HPLC-MS/MS veya UPLC-MS/MS gibi yöntemler kullanılmıştır (Kall, Rohde and Jørgensen, 2015; Qin vd., 2018; Huang vd., 2016; Gu vd., 2015). Fakat aralarında HPLC-DAD ile yapılan çalışmalar da bulunmaktadır (Wróblewski vd., 2017; Chen vd., 2019). Bu yöntemlerle düşük derişimlerde tayin mümkündür. Wróblewski vd., (2017) ve Chen vd., (2019) tarafından geliştirilen yöntemler sırasıyla 10-60 ng/mL ve 2–200 ng/mL derişim aralıklarında doğrusallık göstermektedir (Çizelge 5.1).

Kall, Rohde and Jørgensen (2015) tarafından yapılan çalışmada 0,400–100 ng/mL, Huang vd., (2016), ve Gu vd., (2015) nın yaptıkları çalışmalarda ise sırasıyla 0,5–100 ng/mL ve 0,05–20 ng/mL aralıkları VOR'in çok düşük derişimlerde tayinine olanak sağlamaktadır. Ayrıca LOQ değerleri sırası ile 0,400 ng/mL; 0,5 ng/mL ve 0,05 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Qin vd., (2018), Huang vd., (2016) ve Gu vd., (2015) nın geliştirdiği yöntemlerle sırasıyla 3,57 dakika, 1,61 dakika, 1,31 dakika gibi kısa sürede VOR tayini yapılmıştır. Wróblewski vd., (2017) ve Chen vd., (2019) nın çalışmalarında ise bu süre 7 dakika ve 6,1 dakikadır.

Wróblewski vd., (2017) örnek hazırlamak için katı faz ekstraksiyon, Chen vd., (2019) sıvı-sıvı ekstraksiyon kullanmıştır. Yeni yöntem sırasında ise örnek hazırlama metodu olarak zaman tasarrufu sağlayan, maddi taraftan ucuz ve daha basit bir işlem olan

protein çöktürme gerçekleştirilmiştir. Wróblewski vd., (2017) ve Chen vd., (2019) yaptıkları çalışmalarda VOR alıkonma zamanı mevcut yöntemdeki değere kıyasla daha yüksektir. LOQ değeri Wróblewski vd., (2017) çalışması ile karşılaştırılabilir düzeyde olmasına rağmen Chen vd., (2019) çalışmasındaki değer daha düşüktür. Bu çalışmalar klasik yöntemler kullanılarak optimize edilmiştir.

Sonuç olarak, tez kapsamında, plazmada VOR tayinine yönelik geliştirilmiş olan HPLC yönteminin literatüre katkı sağlayacağı söylenebilir.

Çizelge 5.1. *Biyolojik numunelerde VOR miktarının belirlenmesi için geliştirilen HPLC yöntemlerinin karşılaştırılması*

Kaynak	Analit	Matriks	VOR alıkonma zamanı (dk)	Analiz süresi (dk)	Analiz methodu	Doğrusallık	LOQ
Kall, Rohde and Jørgensen, 2015	VOR ve metaboliti	Plazma örnekleri ve insan idrarı	-	4,0	HPLC-MS/MS	0,400–100 ng/mL	0,400 ng/mL
			-	2,5	UPLC-MS/MS	0,200–50,0 ng/mL	0,200 ng/mL
Qin vd., 2018	Deuvortioxetine, VOR ve metaboliti	Sıçan plazması	3,57	5,5	HPLC-MS/MS	5–1000 ng/mL	5 ng/mL
Huang vd., 2016	VOR, carvedilol ve metaboliti	Sıçan plazması	1,61	3,0	UPLC-MS/MS	0,5–100 ng/mL	0,5 ng/mL
Gu vd., 2015	VOR	Sıçan plazması	1,31	3,0	UPLC-MS/MS	0,05–20 ng/mL	0,05 ng/mL
Wróblewski vd., 2017	VOR	İnsan serumu ve tükürük örnekleri	7,0	10	HPLC-DAD	10-60 ng/mL	15,06 ng/mL
Chen vd., 2019	VOR	Tavşan plazması	6,1	-	HPLC-DAD	2,0-200 ng/mL	2,0 ng/mL
Mevcut yöntem	VOR	Spike edilmiş insan plazma örnekleri	4,6	6,0	HPLC-DAD	5–10000 ng/mL	13 ng/mL

KAYNAKÇA

Andrew, D., Clayton, D. And Jose, A. (2015). Vortioxetine (Brintellix): A New Serotonergic Antidepressant. *Pharmacy and Therapeutics*, 40 (1), 36-40.

Andrew, G. and Emma, D.D. (2014). Vortioxetine: First Global Approval. *Drugs*, 74, 135–145.

Atul, R.M., Paula, L.J. and Yinzhong, C. (2013). A randomized, double-blind trial of 2.5 mg and 5 mg vortioxetine (Lu AA21004) versus placebo for 8 weeks in adults with major depressive disorder. *Current Medical Research and Opinion*, 29 (3), 217-226.

Bang-Andersen, B., Ruhland, T., Jorgensen, M., Smith, G., Frederiksen, K., Jensen, KG., Zhong, H., Nielsen, SM., Hogg, S., Mork A. and Stensbol, TB. (2011). Discovery of 1-[2-(2,4-dimethylphenylsulfanyl)phenyl]piperazine (Lu AA21004): a novel multimodal compound for the treatment of major depressive disorder. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54 (9), 3206-3221.

Chen, Y., Zhu, YL., Qiu, CZ., Pan, QM., Liu, WY. and Qiu, XJ. (2019). A Simple HPLC Method for the Determination of Vortioxetine in Rabbit Plasma and its Application to a Pharmacokinetic Study. *Latin American Journal of Pharmacy*, 38 (6), 1111-1115.

Enric, A., Victor, P. and Francesc, A. (2014). Pharmacology and clinical potential of vortioxetine in the treatment of major depressive disorder. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 10, 1297–1307

Estela, S., Iria G, Brisa, S., Jose, S. And Eduard, V. (2018). Vortioxetine: A new alternative for the treatment of major depressive disorder. *Revista de Psiquiatria y Salud Mental*, 11 (1), 48-59.

Filippo, C. and Guido, D. (2013). Multi-modality as a new pharmacological approach for treatment of depression: The role of vortioxetine. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16 (6), 1433–1442.

Grace C., Ronald, L., Astrid-Maria, H., Jeppe, K.B., Michael, S. and Zhen, Z. (2013). Pharmacokinetic Drug Interactions Involving Vortioxetine (Lu AA21004), a Multimodal Antidepressant. *Clinical Drug Investigation*, 33, 727–736.

Grace, C., Astrid-Maria, H., Johan, A. and George, N. (2018). Vortioxetine: Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions. *Clinical Pharmacokinetics*, 57, 673–686.

Grace, C., Wencan, Z., and Michael, S. (2015). Lack of Effect of Multiple Doses of Vortioxetine on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Aspirin and Warfarin. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 55 (6), 671–679.

Gu, EM., Huang, C., Liang, B., Yuan, L., Lan, T., Hu, G. and Zhou, HY. (2015). An UPLC–MS/MS Method for the Quantitation of Vortioxetine in Rat Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 997, 70-74.

Huang, Y., Zheng, S., Pan, Y., Li, T., Xu, ZS. and Shao, MM. (2016). Simultaneous Quantification of Vortioxetine, Carvedilol and Its Active Metabolite 4-hydroxyphenyl Carvedilol in Rat Plasma by UPLC–MS/MS: Application to Their Pharmacokinetic Interaction Study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128, 184-190.

Hvenegaard, MG., Bang-Andersen, B., Pedersen, H., Jorgensen, M., Puschl, A. and Dalgaard, L. (2012) Identification of the cytochrome P450 and other enzymes involved in the in vitro oxidative metabolism of a novel antidepressant, Lu AA21004. *Drug Metabolism and Disposition*, 40 (7), 1357-1365.

ICH (International Conference on Harmonization) topic Q2B. (2005). Validation of analytical procedures: Methodology. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH, Geneva, Switzerland, CPMP/ICH/281/95.

Kall, M.A., Rohde, M. and Jørgensen, M. (2015). Quantitative Determination of the Antidepressant Vortioxetine and Its Major Human Metabolite in Plasma. *Bioanalysis*, 7 (22), 2881-2894.

Mork, A., Montezinho, LP., Miller, S., Trippodi-Murphy, C., Plath, N., Li, Y., Gulinello, M. and Sanchez, C. (2013). Vortioxetine (Lu AA21004), a novel multimodal

antidepressant, enhances memory in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 105, 41-50.

Neven, H., Atul, R.M., Paula, J., Yinzhong, C. and Michael, E.M. (2012). A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled 8-week Trial of the Efficacy and Tolerability of Multiple Doses of Lu AA21004 in Adults With Major Depressive Disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 73 (7), 953–959.

Qin, M., Qiao, HQ., Yuan, YJ and Shao, Q. (2018). A Quantitative LC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of Deuvortioxetine, Vortioxetine and Their Carboxylic Acid Metabolite in Rat Plasma and Its Application to a Toxicokinetic Study. *Analytical Methods*, 10 (9), 1023-1031.

Sanil, R. and James, G. (2017). A Focus on Vortioxetine – Mechanism of Action and Efficacy. *Psych Scenehub*, <https://psychscenehub.com/psychinsights/vortioxetine-mechanism-of-action-2/> (06.03.2020)

Wells, DA. (2003). Protein Precipitation: High Throughput Techniques and Strategies for Method Development. *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation Methods and Automation Strategies*. p-199

Wróblewski, K., Petruczynik, A., Buszewski, B., Szultka-Młyńska, M., Karakuła-Juchnowicz, H. and Waksmundzka-Hajnos, M. (2017). Determination of Vortioxetine in Human Serum and Saliva Samples by HPLC–DAD and HPLC–MS. *Acta Chromatographica*, 29 (3), 325-344.