

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**YARIŞ ATLARININ KAN ÖRNEKLERİNDE BAZI ANABOLİK STEROİD
(TESTOSTERON) ESTERLERİNİN LC-MS/MS İLE TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LEVENT YATANASLAN

TEZ DANIŞMANI
DR.ÖĞR.ÜYESİ HÜLYA SİLAH

BİLECİK, 2023

10496533

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**YARIŞ ATLARININ KAN ÖRNEKLERİNDE BAZI ANABOLİK STEROİD
(TESTOSTERON) ESTERLERİNİN LC-MS/MS İLE TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LEVENT YATANASLAN

TEZ DANIŞMANI
DR.ÖĞR.ÜYESİ HÜLYA SİLAH

BİLECİK, 2023

10496533

BEYAN

“Yarış Atlarının Kan Örneklerinde Bazı Anabolik Steroid (Testosteron) Esterlerinin LC-MS/MS İle Tespiti” adlı yüksek lisans tezinin hazırlık ve yazım sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.	
DESTEK ALINMIŞTIR	DESTEK ALINMAMIŞTIR X
Destek alındı ise;	
Destekleyen kurum;	
Desteğin Türü	Proje Numarası
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)	
2- TÜBİTAK	
Diğer;.....	
ETİK KURUL onayı var ise;	
ETİK KURUL karar tarih/sayı:	/...../.....

Levent YATANASLAN

Tarih

...../...../.....

İmza

.....

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim döneminde üzerimde emeği bulunan tüm öğretim üyelerine ve tez çalışmam sürecinde manevi desteği ile birlikte çalışmamı sahiplenerek takip eden danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üye. Hülya SİLAH'a değerli katkı ve emekleri için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Literatür tarama yöntemleri, içerik tasnifleme yöntemleri ve her konuda bilgilerini esirgemeyerek yardımda bulunan başta çalışma arkadaşım Dr. Ertuğrul GÜNEŞ, laboratuvar şefim Erol KABİL ve çalışmalarım sürecinde yardımlarını esirgemeyen değerli laboratuvar arkadaşlarıma katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımı destekleyen öncelikle mensubu olduğum Tarım ve Orman Bakanlığı – Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'ne, imkânlarını kullandığım görev yerim İstanbul/Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne ve her konuda manevi desteklerini esirgemeyen kurum yöneticilerine çok teşekkür ederim.

Son olarak bu günlere ulaşmamdaki emekleri ve özverileri adına değerli ailem annem, babam, kardeşim, eşim Melek ve yaptığı şirinliklerle yüzümüzü güldüren her daim şükrettiğimiz ailemizin neşesi kızım Melis'e sonsuz teşekkürler.

Levent YATANASLAN

2023

ÖZET

YARIŞ ATLARININ KAN ÖRNEKLERİNDE BAZI ANABOLİK STEROİD (TESTOSTERON) ESTERLERİNİN LC-MS/MS İLE TESPİTİ

Anabolik steroidlerin kas gücünü arttırarak performansta üstünlük sağlamak amacıyla yarış sporlarında sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir. Bu bağlamda endojen bir madde olan testosteronun etkisini sağlamak amacı ile eksojen olarak testosteron esterleri kullanılmaktadır. Testosteron esterleri kan dolaşımında kan esterazları tarafından enzimatik olarak hidroliz edilirler ve testosteronu dönüşürler. Dolayısıyla kandaki ester miktarları plazma ve serum örneklerinde tespit edilebilmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı yarış atlarının kan örneklerinde farklı sıvı-sıvı ya da katı faz ekstraksiyon teknikleri kullanılarak sıvı kromatografisi - tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) cihazı ile testosteron esterlerinin tespitinin sağlanmasıdır. Farklı çözücüler ve kartuş denemeleriyle uygun ekstraksiyon tekniği belirlendikten sonra geliştirilen metot Avrupa Birliği Yayın Ofisi tarafından yayınlanan 22 Mart 2021 tarihli 2021/808 No'lu direktife uygun olarak valide edildi. Yapılan literatür araştırmalarında bu alanda gerçekleştirilen çalışmaların oldukça az olduğu ve özellikle testosteron esterleri analizlerinde türevlendirme işleminin yapıldığı görüldü. Gerçekleştirdiğimiz tez çalışması ile; türevlendirme işlemi yapılmadan testosteron esterlerinin tespitinin sağlanması ve geliştirilecek yeni metotla literatüre önemli bir katkı sağlanmasının yanı sıra doping laboratuvarlarında eksojen testosteron uygulamasının tespitinde rutin olarak kullanılabilecek bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Anabolik Steroid, Testosteron Esterleri, At Plazması, At Serumu, Sıvı Kromatografisi - Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS), Doping.

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME ANABOLIC STEROID (TESTOSTERONE) ESTERS IN RACE HORSE BLOOD SAMPLES BY LC-MS/MS

It is known that anabolic steroids are frequently used in racing sports to increase muscle strength and provide superiority in performance. In this context, exogenous testosterone esters are used to provide the effect of an endogenous substance, testosterone. Testosterone esters are enzymatically hydrolyzed by blood esterases in the bloodstream and converted to testosterone. Therefore, ester amounts in the blood can be detected in plasma and serum samples.

The aim of this thesis study is to detect testosterone esters in blood samples of race horses by using different liquid-liquid or solid phase extraction techniques by using liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). After determining the appropriate extraction technique with different solvents and cartridge experiments, the developed method was validated in accordance with the directive no 2021/808 dated March 22, 2021 published by the European Union Publication Office. In the literature researches, it was seen that the studies in this field are very few and the derivatization process was carried out especially in the analyzes of testosterone esters. In this thesis study; in addition to making an important contribution to the literature with the new method developed by providing the detection of testosterone esters without derivatization process, it is also aimed to develop a method that can be used routinely in the detection of exogenous testosterone application in doping laboratories.

Keywords: Anabolic Steroid, Testosterone Esters, Horse Plasma, Horse Serum, Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), Doping.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
GRAFİKLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Testosteron.....	3
2.2. Testosteron Esterleri.....	4
2.2.1. Testosteron Propiyonat (TP).....	4
2.2.2. Testosteron Enantat (TE).....	5
2.2.3. Testosteron Sipiyonat (TCy).....	6
2.2.4. Testosteron Dekanoat (TD).....	6
2.3. Sıvı Kromatografi - Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS).....	7
2.4. Validasyon.....	10
2.4.1. Validasyon Parametreleri.....	10
2.4.1.1. Seçicilik / Özgüllük.....	11
2.4.1.2. Algılama Yeteneği (CC β).....	12
2.4.1.3. Sağlamlık (Minör Değişiklikler).....	12
2.4.1.4. Stabilite (Kararlılık).....	12
3. LİTERATÜR ARAŞTIRMALARI.....	15
4. MATERYAL VE METOT.....	18
4.1. Materyal.....	18
4.1.1. Referans Maddeler.....	18
4.1.2. Kimyasal Maddeler.....	19
4.1.3. Cihaz ve Ekipmanlar.....	19
4.2. Metot.....	20
4.2.1. Örneklerin Analize Hazırlanması.....	20
4.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması.....	22
4.2.3. Cihaz Koşulları.....	22

4.2.3.1. HPLC Ünitesi Koşulları	22
4.2.3.2. Kütle Spektrometre Ünitesi Koşulları	23
5. BULGULAR.....	25
5.1. Metot Validasyonu.....	26
5.1.1. Seçicilik / Özgüllük Çalışması.....	26
5.1.2. Algılama Yeteneği (CC β) Çalışması.....	28
5.1.3. Sağlamlık Çalışması.....	30
5.1.3.1. Youden Yaklaşımı.....	30
5.1.3.2. Etki Faktörleri	30
5.1.4. Stabilitate (Kararlılık) Çalışması	33
6. SONUÇ VE TARTIŞMA	34
KAYNAKÇA	36

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Analitik Yöntemlerin Performans Özelliklerine Göre Sınıflandırılması	11
Tablo 2.2. Çözeltideki Analitin Stabilitate Tayin Şeması	13
Tablo 4.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Referans Madde Listesi.....	18
Tablo 4.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Madde Listesi	19
Tablo 4.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihaz ve Ekipman Listesi	19
Tablo 4.4. Pompa Akış Diyagramı	23
Tablo 4.5. Cihaz İyonlaştırma Parametreleri	23
Tablo 4.6. Analitlere Ait Kütle Spektrometresi Parametreleri	24
Tablo 5.1. Sağlamlık Çalışması Minör Faktörler ve Değerler Tablosu.....	30
Tablo 5.2. Sağlamlık Çalışılacak Örnekler ve Etki Faktörü Tablosu	31
Tablo 5.3. Testosteron Propiyonat’a Ait Sağlamlık Çalışması Etki Tablosu	32
Tablo 5.4. Testosteron Enantat’a Ait Sağlamlık Çalışması Etki Tablosu	32
Tablo 5.5. Testosteron Sipiyonat’a Ait Sağlamlık Çalışması Etki Tablosu	32
Tablo 5.6. Testosteron Dekanoat’a Ait Sağlamlık Çalışması Etki Tablosu	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Testosteron Kimyasal Yapısı	3
Şekil 2.2. Testosteron Propiyonat Kimyasal Yapısı	5
Şekil 2.3. Testosteron Enantat Kimyasal Yapısı	5
Şekil 2.4. Testosteron Sipiyanat Kimyasal Yapısı	6
Şekil 2.5. Testosteron Dekanoat Kimyasal Yapısı	6
Şekil 2.6. LC-MS/MS Cihazı	7
Şekil 2.7. Tipik HPLC Kolon Çeşitleri	8
Şekil 2.8. Sabit Faz (Kolon) İçi Dolgu Materyali Yapısı	8
Şekil 2.9. Üçlü Kuadrupol (QQQ) Yapısı ve Özellikleri	9
Şekil 4.1. Örnek Hazırlama Aşaması	21
Şekil 5.1. TD İçin Parçalama Voltajı (fv) ve CE Voltaj Değerleri Karşılaştırması	25
Şekil 5.2. Analitlere Ait Toplam İyon Kromatogramı (TIC)	25
Şekil 5.3. Analitlere Ait Kör ve Yüklü Numunelerin Kromatogram Karşılaştırması	27

GRAFİKLER LİSTESİ

	Sayfa
Grafik 5.1. Analitlere Ait Seçicilik / Özgüllük Çalışması Grafikleri.....	26
Grafik 5.2. Testosteron Propiyonat T ve Fm Gösterim Grafiği	28
Grafik 5.3. Testosteron Enantat T ve Fm Gösterim Grafiği	29
Grafik 5.4. Testosteron Sipiyanat T ve Fm Gösterim Grafiği	29
Grafik 5.5. Testosteron Dekanoat T ve Fm Gösterim Grafiği	29



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AORC	: Resmi Yarış Kimyagerleri Birliği (Association of Official Racing Chemists)
APCI	: Atmosferik Basıncıta Kimyasal İyonizasyon
B_{ort}	: Kör örneklere ait alan verisi ortalaması
CCβ	: Algılama Yeteneği
CE	: Çarpışma Enerjisi
dk	: Dakika
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
F_m	: Kesme Faktörü
f_v	: Parçalama Voltajı
g	: Gram
GC-MS	: Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi
GC-MS/MS	: Gaz Kromatografisi Tandem-Kütle Spektrometresi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IFHA	: Uluslararası At Yarışı Otoriteleri Federasyonu
IS	: İç Standart
L	: Litre
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi Tandem - Kütle Spektrometresi
LLE	: Sıvı – Sıvı Ekstraksiyon
M	: Molar
m/z	: Kütle/Yük Oranı
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
M_{ort}	: Yüklenen örneklerin alan verisi ortalaması
ng	: Nanogram

PC	: Bilgisayar / Veri Kaydedici
Q1	: Kuadropol-1
Q2	: Kuadropol-2
Q3	: Kuadropol-3
QQQ	: Üçlü Kuadropol
RT	: Alıkonma Zamanı
SD	: Yüklenen örneklerin alan verilerine ait standart sapma
SD_b	: Kör örneklerin alan verilerine ait standart sapma
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyon
T	: Eşik Noktası
T / E	: Testosteron / Epitestosteron Oranı
TCy	: Testosteron Sipiyonat
TD	: Testosteron Dekanoat
T-D3 (IS)	: Testosteron D3 (İç Standart)
TE	: Testosteron Enantat
TIC	: Toplam iyon kromatogramı
TP	: Testosteron Propiyonat
UPLC-MS /MS	: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi Tandem-Kütle Spektrometresi
UV	: Morötesi (Ultraviyole)
V	: Volt
v	: Hacim
WADA	: Dünya Anti-Doping Ajansı (World Anti-Doping Agency)

μL : Mikrolitre
 μm : Mikrometre
% : Yüzde
 $^{\circ}\text{C}$: Santigrat Derece
® : Tescillenmiş Marka
 β : Beta



1. GİRİŞ

Genel olarak sportif faaliyetlerde kullanılan ve performans arttıran ilaçlar doping olarak tanımlanır. Bu tür ilaçların performans arttırıcı özelliklerinin yanında ciddi yan etkileri de bulunmakta ve bu yan etkilere 1967 yılında Fransa’da düzenlenen bisiklet turunda doping etkili amfetamin maddesini aldıktan sonra bir İngiliz bisikletçisinin ölümü örnek olarak gösterilebilir (Arblester ve Blackman, 1981).

Anabolik steroid kullanımının da diğer doping etkili maddeler gibi geliştirici etkilerinin yanında fazlaca yan etkisi bulunmaktadır. Bu yan etkilere su tutulumuna bağlı olarak vücutta oluşan ödem, kalbin normalden daha fazla çalışması ve kan basıncının yükselmesi, kan yağlarında artış, yağ bezlerinde ki salgının artışı ve sivilce oluşumu, tendon zedelenmesi, karaciğer fonksiyonlarında bozukluklar, prostat hastalıkları, koagülasyon faktörlerinde bozulma ve troid fonksiyonları bozukluğu örnek olarak gösterilebilir (İçen, 2013: 26).

Bu bağlamda anabolik steroidler kas gücünü arttırarak fiziksel performansta üstünlük sağlamak amacıyla yarış sporlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Testosteron ’da bu özellikte olan bir anabolik steroid olduğundan eksojen olarak kullanımının belirlenmesi kötüye kullanımının engellenmesi açısından oldukça önemlidir. Testosteron etkisini sağlamak amacıyla testosteron esterlerinin (testosteron sipiyonat (TCy), testosteron dekanat (TD), testosteron enantat (TE), testosteron propiyonat (TP) vb) yaygın kullanımı söz konusudur. Dolayısı ile kanda ki doping kontrol analizinde bozulmamış testosteron esterlerinin tespit edilmesi, dışarıdan testosteron etkili madde uygulandığının bir göstergesidir (Guro Forsdahl vd., 2015: 984).

Dünya Anti-Doping Ajansı (WADA) yarış içinde-dışında veya yalnızca yarış içerisinde kullanımı yasaklanan oldukça fazla madde belirlemiş ve bu maddeleri yasaklı ilaç kategorileri, sadece belirli sporlarda yasaklanmış analitik gruplar ve yasaklı metotlar adı altında toplayarak resmi web sayfasında yayınlamıştır (WADA, 2022).

Testosteron ve diğer steroidler, WADA tarafından yayınlanan 2020 yılı istatistiklerine göre, rapor edilen ve en çok suiistimal edilen anabolik ajanlardır (WADA, 2021). Bu sebeplerden ötürü testosteron suiistimallerini önlemek amacı ile kan-plazma örneklerinde testosteron esterlerinin tespiti ile ilgili analizlerin 2018 yılında WADA tarafından yayınlanan teknik dokümana eklenmesi sonucu çeşitli yöntemlerin geliştirilmesi ilgi çekmiştir (de la Torre vd., 2021: 113810).

Doping etkili tıbbi olan ya da olmayan ilaçlar sadece insanlara değil aynı zamanda yarış atlarına da uygulanmaktadır. Ülkemizde at yarışlarında doping, “Bir atın koşudaki sürat, kuvvet ve cesaretini veya bunlardan birini veya tümünü değiştirmek amacıyla, normal gıdalar dışında verilen herhangi bir madde” olarak tanımlanmaktadır (Resmî Gazete, 2011).

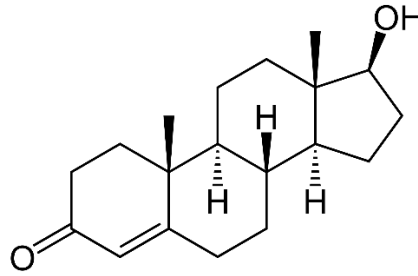
Atlı yapılan sporlarda doping, ilk defa 17.yy da İngiltere’de kayıt altına alınmıştır. At yarışlarında ki bahisler sonucunda artan maddi menfaatler ve yarış sayısının da artması sonucunda doping etkili maddelerin kullanımı da artmaya başlamıştır. Bu sebepten dolayı doping kullanımı ile mücadele etmek daha önemli bir hâl almıştır (Fidan, 2017: 125).

Uzun yıllardır yarış otoriteleri yarış atları ve insanlarda anabolik steroidin yasaklı kullanımı ile mücadele etmektedir (Bonnaire vd., 1995: 175). Bu kapsamda Türkiye’nin de üyesi olarak yer aldığı Uluslararası At Yarışı Otoriteleri Federasyonu (IFHA), uluslararası safkan yarış sporlarının lideri olarak at yarışlarına bir düzen ve koordinasyon getirmek, sporcuların refahını korumak amacı ile Amerika Birleşik Devletleri Jokey Kulübü, İrlanda Çim Kulübü, Büyük Britanya Jokey Kulübü ve Fransa Galop Derneği’nin kurucu ortaklığında 23 Aralık 1993 ‘te kurulmuştur (IFHA, 2021).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testosteron

Testosteron erkeklik hormonu olarak bilinmektedir. Testosteron yetişkin erkeklerde kas protein metabolizmasını, cinsel ve bilişsel işlevleri, eritropoezi, plazma lipid seviyelerini ve kemik metabolizması gibi vücutta meydana gelen birçok fizyolojik süreci düzenler (Saudan, 2006: i21). Gelişim ve fiziksel özelliklerde artış etkisi oluşturduğundan insanlarda ve yarış hayvanlarında doping etkili madde olarak kullanılmaktadır. Testosteron ilk olarak 1935 'te Lacqueur ve çalışma arkadaşları tarafından testislerden kristalin formda izole edilmiştir (Thieme ve Hemmersbach, 2010: 5). Fakat testosteron izole edildikten sonra ağızdan alındığında ince bağırsaklardan emilerek damarlar tarafından karaciğere geçer ve burada hızla metabolize olur. Çoğunlukla inaktif bileşiklere dönüştüğünden dolayı herhangi bir etkiye sahip olmadığı anlaşılmıştır. Bu keşif anabolik steroidlerin sentezine yol açmıştır. Ayrıca anabolik steroidler ortamda bulunan glukortikoidleri reseptörlerinden uzak tutarak protein yıkımını engeller ve kas oluşumunun önünü açar (Saudan, 2006: i21). Tedavi amaçlı olmayan sebeplerle doping etkisi için uzun süreli testosteron kullanımı sonucunda, kardiyomiyopati, hipogonadizm ve dislipidemi gibi olumsuz sağlık sorunları ortaya çıkabilir ve bu nedenle sadece adil sporlarda kullanımı bir tehdit olarak değil, aynı zamanda bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilir (Pope vd., 2014: 361).



Şekil 2.1. Testosteron Kimyasal Yapısı

Testosteron kimyasal olarak sırasıyla 3. ve 17. karbonlarında keton ve hidroksil grubu içeren androstan sınıfından bir steroddur (Şekil 2.1). Molekül ağırlığı 288,42 g/mol 'dür. Testosteronun tespiti genel olarak gaz kromatografisi – kütle spektrometrisi (GC-MS) ile idrardaki steroid madde parametrelerinin değerlendirilmesi ile yapılmaktadır (Ayotte, 2009: 81; Thieme ve Hemmersbach, 2010: 28). Eksojen ve endojen testosteronun ayırt edilebilmesi için idrarda ki ölçülen testosteron/epitestosteron (T/E) oranı, testosteronun eksojen olarak alındığını gösterir. Epitestosteron vücutta doğal olarak bulunduğu için testosteron alımından etkilenmez ve sabit olarak kalır (Törnvall, 2010: 9). WADA 'na göre T/E oranı 4'ün üzerinde

ise şüpheli, 6'nın üzerinde ise doping kullanıldığını gösterir (Jakobsson Schulze, 2007: 41). Bu değerler istatistiksel olarak belirlenmiştir fakat çalışmalar sonucunda idrarda ki T/E oranlarının genetik faktörlere bağlı olarak bireyler arasında değiştiği görülmüştür (Jakobsson Schulze, 2007: 27; Sjöqvist vd., 2008: 1878). Örneğin Japon, Çin ve Kore gibi Doğu Asyalılar, Avrupalılara göre çok daha düşük T/E oranlarına sahip olduklarından yanlış negatiflik göstererek testin doğruluğunu zorlaştırmaktadırlar (Jakobsson Schulze, 2007: 27). İşte bu sebeple plazma da bozulmamış testosteron esterlerinin tespiti, idrarda ki T/E oranı karmaşasını ortadan kaldırmayı sağlayacaktır.

2.2. Testosteron Esterleri

Testosteronun ilaç mahiyetinde kullanılan haline testosteron esteri adı verilmektedir. Bu esterleşme olayı testosteronun 17. karbonuna bağlı hidroksil grubunda gerçekleşmektedir. Halk arasında steroid nedir sorusuna verilen cevap genel olarak sporcuların kullandığı ve aslında sağlığa zararlı olduğu düşünülen ilaçlar olmuştur. Aslında bu ilaçlar bazı tedavilerde kullanılmak için üretilmiş ve sağlıklı bünyelerde kullanımı sakıncalıdır. Fakat bu ilaçlar yani testosteronun ester formları genellikle kasların hacim kazanması ve vücut gelişiminin hızlanması için yasa dışı olarak kullanılmaktadır.

Plazmada tespit edilen esterlerin varlığı, yasa dışı eksojen olarak uygulanmış sentetik ürünler ile vücutta doğal olarak bulunan endojen hormonların ayrımının yapılmasına izin vermektedir. Testosteron etkisini sağlamak amacıyla testosteron esterlerinin (TCy, TD, TE, TP vb) kullanım amacı etken maddenin yarılanma ömrünü uzatarak etkisinin devamlılığını sağlamaktır.

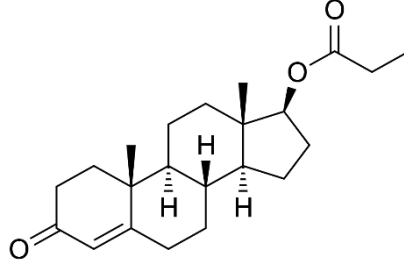
Örnek olarak tek başına oral yolla alınan testosteron ortalama 24 saat yarılanma ömrüne sahip olmakla birlikte 1-2 gün içerisinde vücuttan tamamı ile atılırken, sentetik olan ester halleri ortalama 3 gün ile 15 gün arasında yarılanma ömrüne sahip ve 2 haftadan 3 aya kadar bir süreçte vücuttan tamamı ile atılmaktadır (Anabolik Ansiklopedisi, 2020). Her bir ester kimyasal yapısında ki uzun zincir yapılara bağlı olarak etki süresinin devamlılığı değişmektedir.

2.2.1. Testosteron Propiyonat (TP)

Testosteron propiyonat, 1936 yılında keşfedilmiş ve 1937 yılında tıbbi kullanım amacı ile pazarlanan ilk testosteron türevidir (Behre ve Nieschlag, 2012: 321; Korenchevsky vd., 1937: 475). 1960'lı yıllara kadar tıpta yaygın bir şekilde kullanılmış fakat 1950'li yıllarda

yeni sentezlenen ve daha uzun süre etki gösteren testosteron enantat ve testosteron sipiyonat yavaş yavaş testosteron propiyonat 'ın yerini almıştır (Behre ve Nieschlag, 2012: 316).

Kısa bir yarılanma ömrüne sahip olmakla birlikte vücuttan atılım süresi yaklaşık 1-2 gün arasındadır (Nieschlag vd., 2010: 442). Kimyasal olarak testosteron 'un 17 β pozisyonuna bağlanmış olan propiyonik asit 'ten oluşmuştur (Şekil 2.2). Molekül ağırlığı 344,5 g/mol 'dür.

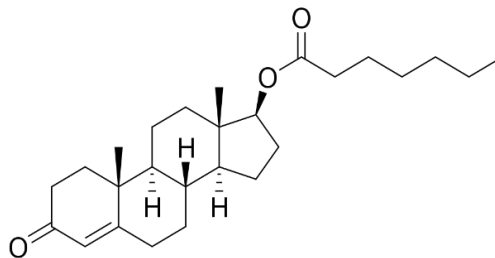


Şekil 2.2. Testosteron Propiyonat Kimyasal Yapısı

2.2.2. Testosteron Enantat (TE)

Testosteron türevleri arasında en bilindik ve yaygın kullanılan anabolik steroiddir. Testosteron propiyonat 'tan sonra 1950'li yılların başında sentezlenen testosteron enantat, uzun ester yapısı sayesinde yavaş ve uzun süreli bir etki oluşturmaktadır. Bu özelliği sayesinde testosteron propiyonat 'ın yerini alarak 1954 yılından itibaren tıpta uzunca bir süre yaygın olarak kullanılmıştır (Behre ve Nieschlag, 2012: 317).

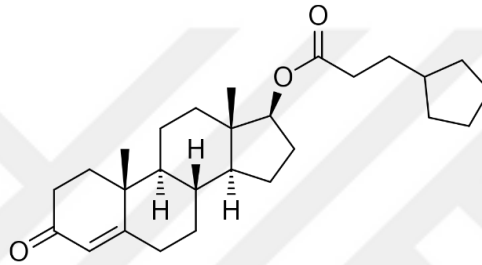
Testosteron ile karşılaştırıldığında çok daha uzun süren bir yarılanma ömrüne sahiptir. Kas içine enjekte edilen testosteron enantat'ın yarılanma ömrünün yaklaşık olarak 4-5 gün ve atılım süresinin ise yaklaşık 8-9 gün arasında olduğu bildirilmiştir (Luetjens vd., 2007: 423; Nguyen vd., 2018: 3). Kimyasal olarak yine testosteron 'un 17 β pozisyonuna enantik asit veya diğer bir adıyla heptanoik asitin bağlanması sonucu oluşmuştur (Şekil 2.3). Molekül ağırlığı 400,6 g/mol 'dür.



Şekil 2.3. Testosteron Enantat Kimyasal Yapısı

2.2.3. Testosteron Sipiyonat (TCy)

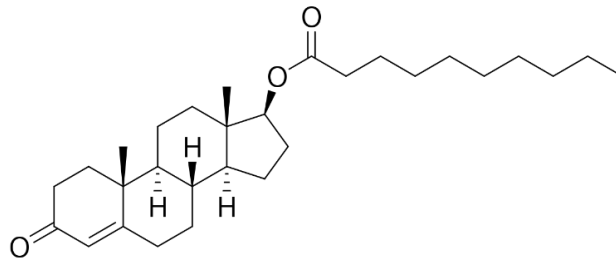
Testosteron enantat ile aynı dönemlerde sentezlenmiş yarılanma ömrü, etki süresi gibi özellikleri bakımından birbirlerine çok benzemektedirler. Tedavi amaçlı olarak tıpta birbirlerinin yerine kullanılabilirler. Tek farkı kimyasal yapısında fazladan bir karbon olduğu için küçüğe olsa yarılanma ömrü testosteron enantat 'tan daha uzundur. Yapı olarak yakın özelliklere sahip oldukları için testosteron sipiyonat 'ta uzun etkili bir anabolik steroiddir (Llewellyn, 2011: 214). Testosteron enantat ile birlikte yaygın kullanılan ve popüler olan iki steroidten biridir. Kimyasal olarak diğer esterler gibi testosteron 'un 17 β pozisyonuna sipiyonik asit veya diğer bir adıyla siklopentilpropiyonik asitin bağlanması sonucu oluşmuştur (Şekil 2.4). Molekül ağırlığı 412,6 g/mol 'dür.



Şekil 2.4. Testosteron Sipiyonat Kimyasal Yapısı

2.2.4. Testosteron Dekanoat (TD)

Diğer esterler gibi yine tıpta tedavi amaçlı üretilmiş olmasına rağmen yarı ömrünün uzun olması tedavi dışında kötüye kullanım açısından da ilgi çekmiştir. Yarılanma ömrü yaklaşık olarak 15 gündür. Bunun sebebi kimyasal olarak testosteron'a 17 β pozisyonunda diğer esterlerden daha uzun bir ester yapısı olan dekanoik asitin bağlı olmasından kaynaklıdır (Şekil 2.5). 1970 'li yıllarda ilk üretim izni alınmıştır. Pazarda tek başına bir süspansiyonu olmamakla birlikte (Sustanon® 250) ilaç içerisinde 3 farklı testosteron esteri ile birlikte yer almaktadır (Behre ve Nieschlag, 2012: 323; Fisher vd., 2009: 170). Molekül ağırlığı 442,7 g/mol 'dür.



Şekil 2.5. Testosteron Dekanoat Kimyasal Yapısı

2.3. Sıvı Kromatografi - Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC) kütle spektrometresi ile kombine edilmesi sonucunda farklı numune matrislerinde bulunan düşük derişimlerde ki analitlerin tayini oldukça hassas bir şekilde yapılabilmektedir. Analitlerin kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmelerinin yanı sıra analitin kimyasal yapısı hakkında da bilgi sahibi olmayı sağlar. Sıvı kromatografi analiz edilecek numunedeki bileşenleri birbirinden ayırırken, kütle spektrometre de bileşen yapısının tanımlanmasında rol almaktadır. Özellikle ilaç bilimi, gıda, kozmetik, tarım kimyasalları, kalıntı analizleri vb. gibi alanlarda yaygın olarak kullanılan en önemli enstrümantal cihazlardan biridir. LC-MS/MS cihazı başlıca, veri kaydedici, HPLC ünitesi ve kütle spektrometresi ünitelerinden oluşmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. LC-MS/MS Cihazı

Kaynak: (Harvard University, 2022)

HPLC cihazı tek başına hareketli (mobil) faz çözelti şişeleri, pompa, örnekleme (enjeksiyon) alanı, kolon, kolon fırını ve UV dedektörden oluşmaktadır. Fakat kütle spektrometresi ile kombine edildiğinde UV dedektör ünitesi cihazdan ayrılır ve kolondan sonra dedektör olarak kütle spektrometresi kullanılır. Hareketli faz, analiz edilecek olan numune bileşenlerinin kimyasal özelliklerine (pKa, polarite vb.) göre hazırlanan çözeltilerden oluşmaktadır. Bu çözeltiler pompanın özelliklerine göre ikili veya dörtlü olarak belirlenen oranlarda karışım halinde kullanılabilir.

Pompa ünitesi, içerisinde bulunan pistonların hareketiyle çözelti halinde hazırlanan hareketli fazı istenilen oranlarda pompalayarak analiz edilecek bileşenlerin kütle spektrometresine kadar ulaşmasında görev alır.

Örnekleme alanı, manuel veya otomatik olarak sistem içerisine örneğin istenilen oranda enjekte edilmesinde görev alır.

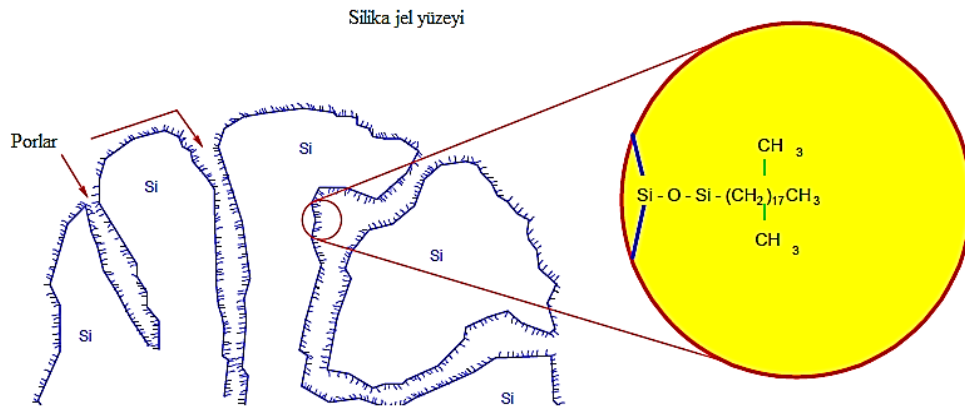
Kolon ve kolon fırını ünitesi; pompa sayesinde hareketli faz ve örnek akış sistemi içerisinde birleşerek belirlenen karışım ve akış hızı ile birlikte kolon içerisinden geçer. Kolonlar genelde paslanmaz çelikten yapılmış, yaklaşık olarak 600 bar basınca kadar dayanabilen, içerisinde çeşitli dolgu materyallerinin (C8, C18 vb.) bulunduğu, farklı boyut ve iç çaplara sahip malzemelerdir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Tipik HPLC Kolon Çeşitleri

Kaynak: (Labmarker, 2022)

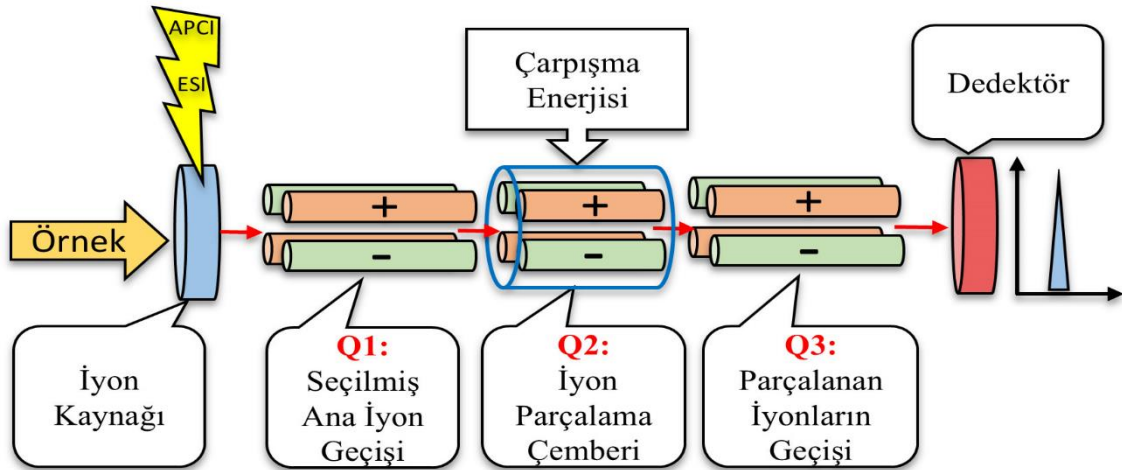
Kolonlarda dolgu materyali (adsorbent) olarak temelde silika kullanılmakta ve bileşenler silika üzerinde bulunan por yüzeylerine tutunmaktadır (Şekil 2.8). Kolonlar ters ya da normal faz olma gibi farklı özelliklere sahip olan sabit fazlardır. Bu özelliklerine göre silikaya bağlanacak olan gruplar da değişiklik göstermektedir. Hareketli fazla birlikte kolondan geçen örnekte bulunan bileşenler özelliklerine göre kolon içerisinde bir süre alıkonulmaktadır. Bu alıkonma zamanı (RT); kullanılan hareketli faz, sabit faz (kolon) ve örnek içerisindeki bileşenlerin yüzeyde tutunma (adsorpsiyon) özelliklerine göre değişmektedir. Bu sayede bileşenlerin dedektöre ulaşma zamanları da değişkenlik göstereceğinden ayrıştırılmaları kolaylaşır. Kolonun sabit bir sıcaklıkta tutulması yapılacak olan çalışmanın kalitesi açısından önem arz etmektedir ve bu amaçla kolon fırını kullanılmaktadır. Kolon fırınlarının blok ya da hava akımlı olan türleri bulunmaktadır.



Şekil 2.8. Sabit Faz (Kolon) İçi Dolgu Materyali Yapısı

Kaynak: (Göktaş, 2019: 28)

Kütle spektrometresi içerisinde farklı ünitelerden oluşan bir cihazdır. Bu cihazın ilk parçası iyon kaynağıdır. Burada analiz edilecek bileşenler pozitif veya negatif iyonlaştırılarak dedektöre gönderilmektedir. İyonlaştırma işlemi ise bileşenlerin özelliklerine göre yaygın olarak Elektrosprey İyonizasyon (ESI) veya Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonizasyon (APCI) teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Burada iyonlaştırılan bileşenler sıralı kütle analizöründen geçerek kütle/yük (m/z) oranlarına göre sıralı kuadrupoller sayesinde ayrıştırılır ve dedektöre gönderilerek analiz edilir. Kuadrupol, dört kutuplu silindir çubuktan oluşmakta ve ikisi negatif ikisi pozitif değişken doğru akım kaynağından beslenmektedir. Çubuklara uygulanan doğru akım sonrasında iyonlar hızlandırılarak belirlenmiş m/z oranı dışında kalan tüm iyonlar yüklerinden arındırılır. Nötr olan iyonlar ortamdaki uzaklaşırken belirlenen m/z oranına sahip iyonlar ilerlemeye devam etmektedir (Göktaş, 2019: 30). Sıralı kuadrupoller ise üç adet dört kutuplu silindir çubuklardan oluşmakta ve Üçlü Kuadrupol (QQQ) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.9). Yapılan bu analiz yüksek duyarlılıkta bileşenleri oluşturan moleküllerin yapı tayini veya bileşenlerin tanımlanması gibi nicel bir analizdir.



Şekil 2.9. Üçlü Kuadrupol (QQQ) Yapısı ve Özellikleri

İyon kaynağında pozitif ya da negatif olarak iyonlaştırılan moleküller kuadrupol-1 (Q1)'e ulaştıktan sonra iyonlar filtrelenerek sadece seçilmiş olan analit iyonlarının geçişine izin verilir. Kuadrupol-2 (Q2)'ye ulaşan ana iyon burada çarpışma enerjisine (argon, azot veya helyum gazları vb. ile) tabii tutularak parçalanma veya ürün iyonları oluşturulur. Parçalanma sonrası fazlaca oluşan iyonlar kuadrupol-3 (Q3)'e gönderilir. Burada sadece nitel ve nicel olarak ana iyonun bir nevi kimliğini oluşturan seçilmiş karakteristik ürün iyonlarının geçişine izin verilerek dedektöre ulaşması sağlanır (Şekil 2.9).

Dedektöre ulaşan ürün iyonlar burada bir sinyal oluştururlar. Dedektörde oluşan sinyal görüntüleri veri kaydedici (PC) tarafından cihaza özel bir yazılım ile kayıt altına alınır.

Böylece analite özel olan RT ve m/z oranları kullanılarak tanımlama veya yorumlama işlemi yapılır. Benzer veya aynı kütle/yük oranlarına sahip oldukça fazla analit bulunmaktadır. Fakat aynı parçalanma veya ürün iyonlarına sahip çok daha az analit vardır (Eser ve Sepici Dinçel, 2018: 55).

2.4. Validasyon

Bir metodun, belirlenen performans kriterlerine uygunluğunun objektif olarak saptanması amacı ile ilgili metod parametrelerinin incelenerek geçerliliğinin yazılı delillerle belgelenme işlemidir. Validasyon tek bir laboratuvar içerisinde yapılacağı gibi birden fazla laboratuvarın katılmasıyla laboratuvarlar arası çalışma ile de yapılabilmektedir. Yapılan bu işlemin amacı seçilmiş olan metodun istenen performans ve kalitede sonuç verebileceğini test etmenin yanında rutin analizlerde kullanıldığında istenen performansı elde etmek için gerekli koşulları sağlamak ve kontrol altında tutmaktır. Bir kalite standardına uygun olarak çalışan laboratuvarların rutinde kullandığı metotları valide etmesi kalite sistemi açısından önem arz etmektedir (TOB-GKGM, 2018: 11). Ayrıca validasyon işlemi, doping laboratuvarlarında hatalı sonuç verme sonrası ortaya çıkabilecek telafisi zor, yüksek maddi ve manevi mağduriyetler ve uzun süren yargı süreçleri gibi sorunlar ile karşılaşılması adına daha önemli hale gelmektedir. Dolayısı ile rutinde kullanılan metotların valide edilmesi analizlerin geçerliliği açısından hem analizi yapan kişiyi hem de sonuçlardan etkilenecek kişi ve makamları koruma altına almaktadır.

2.4.1. Validasyon Parametreleri

Avrupa Birliği'nin 2021/808/EU direktifine göre tarama yapılan bir metod için aşağıda belirtilen kriterlerin hesaplamasının yapılması gerekmektedir. Tez çalışması kapsamında kalitatif validasyon işlemi belirtilen bu kriterler ve Resmi Yarış Kimyagerleri Birliği (AORC) tarafından yayınlanan kriterler temel alınarak yapılmıştır (AORC, 2015; Publications Office of the European Union, 2021).

Tablo 2.1'de gri boyalı belirtilen parametreler kalitatif tarama metotlarında yapılacak validasyon için gerekli olan parametrelerdir. Tez çalışması kapsamında söz konusu parametreler her bir testosteron esteri için ayrı ayrı değerlendirildi.

Tablo 2.1. Analitik Yöntemlerin Performans Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

Metotlar	Doğrulama		Tarama		
	Kalitatif	Kantitatif	Kalitatif	Yarı-Kantitatif	Kantitatif
Maddeler	A	A, B	A, B	A, B	A, B
Tanımlama	x	x			
Karar Limiti (CC α)	x	x			
Algılama Yeteneği (CC β)			x	x	x
Doğruluk		x			x
Kesinlik		x		x	x
Matriks Etkisi / Mutlak Geri Kazanım		x			x
Seçicilik / Özgüllük		x	x	x	x
Stabilite*		x	x	x	x
Sağlamlık		x	x	x	x

A: Yasaklanmış veya yetkisiz maddeler B: İzin verilen maddeler

*: Bir matriks içindeki analitler için stabilite verileri bilimsel literatürden veya başka bir laboratuvarından temin edilebiliyorsa, bu verilerin ilgili laboratuvar tarafından yeniden belirlenmesine gerek yoktur. Ancak mevcut stabilite verileri aynı koşullar uygulandığında geçerlidir.

Kaynak: (Publications Office of the European Union, 2021: L180/96)

2.4.1.1. Seçicilik / Özgüllük

2021/808/EU nolu direktife göre çalışmada tespit edilmek istenen analit ile benzer maddeler arasındaki ayırım olabildiğince iyi ölçüde yapılmalıdır. Endojen maddeler, metabolitler, numune matriksten gelebilecek bileşikler vb. gibi bileşenlerden ortaya çıkabilecek olası bir etkileşim belirlenmeli ve gerekirse bu girişim etkilerinden kaçınmak için yöntem değiştirilmelidir.

Yöntemin özgüllüğünü belirlemek için aşağıdaki yaklaşımlar kullanılmalıdır.

- ❖ Örneklerde bulunabilecek olan benzer yapıdaki kimyasal maddeler veya bileşikler tespit edilmeli ve bunların ilgilenilen analitlerin analizine girişim etkisi gösterip göstermeyeceği doğrulanmalıdır.
- ❖ Çalışmada kullanılacak matriks türünden en az 20 farklı örnek (lot, hayvan türü vb.) analiz edilerek tespit edilmek istenen analitin alıkonulması beklenen bölgede herhangi bir pik veya sinyalin olup olmadığı kontrol edilmelidir.
- ❖ Kullanılacak olan kör numunelere belirlenen derişim seviyesinde analitin tanımlanmasına ve/veya miktarının belirlenmesine girişim etkisi yapabilecek benzer yapıdaki maddelerle yükleme yapılmalı ve yüklenen maddelerin girişim yaparak yanlış bir tanımlama yapıp yapmayacağı, tespit edilmek istenen analitin tanımlanmasına engel olup olmayacağı ve ölçümlere önemli derecede etki edip etmeyeceği araştırılmalıdır (Publications Office of the European Union, 2021: L 180/100).

2.4.1.2. Algılama Yeteneği (CC β)

Tarama metotlarında analiz edilecek maddelerin CC β değeri mutlaka belirlenmelidir. Bu konuda yasaklı/yetkisiz kullanılan ve farmakolojik olarak aktif maddeler söz konusu olduğunda CC β ; numunelerin istatistiksel kesinliği ile birlikte tespit edilebilen veya miktarının belirlenebildiği en düşük derişim olarak tanımlanmaktadır. Bu durumda yapılan validasyon çalışmalarında elde edilen sonuçların uyumsuzluk (β hatası) oranının %5'i geçmemesi gerektiği bildirilmektedir (Publications Office of the European Union, 2021: L180/103).

2.4.1.3. Sağlamlık (Minör Değişiklikler)

Kullanılacak analitik yöntemin, ortaya çıkabilen farklı örnekleme koşulları veya rutin yapılan analizlerde meydana gelebilecek küçük değişiklikleri içeren farklı deneysel koşullar altında sürekli performansı kontrol edilmelidir. Yöntemin sağlamlığını tespit etmek için örnek miktarı, pH, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, basınç, kolon sıcaklığı, farklı parti veya üretim tarihli kimyasallar vb. gibi deneysel parametreler ve şartlar (minör) değiştirilerek inceleme yapılmalıdır. Bu sağlamlık testleri için farklı varyasyon ve yaklaşımlar belirlenmiştir.

2.4.1.4. Stabilitate (Kararlılık)

Saklama veya analiz sırasında gözlenen örnekteki analitin veya matriks bileşeninin kararlılığının yetersiz olması analiz sonuçlarında önemli sapmalara ve hatalara neden olabilir. Saklama koşullarının izlenmesi normal laboratuvar akreditasyon ve kalite kontrol sisteminin

bir parçası olmalıdır. Matriksteki analitler için daha önce yapılmış stabilite verilerine ulaşılabiliriyorsa (örn. literatürlerde yayınlanmış veriler vb.) bu verilerin her bir laboratuvar tarafından belirlenmesine gerek yoktur. Fakat bu durumun kabul görmesi için çözelti ve matriks içindeki analitlerin, daha önce yapılan stabilite çalışmalarında uygulanan koşullar ile laboratuvardaki koşullar aynı ise mevcut verilere atıfta bulunulması gerekmektedir. Gerekli verilere erişilemediği durumlarda çözelti ve matriks içerisindeki analitlerin stabilitesi hakkında çalışma yapılması gerekir (Publications Office of the European Union, 2021: L180/101).

a) Analitin çözeltideki stabilitesi

Analitin veya analitlerin taze stok çözeltileri hazırlanır. Her seçilen derişimden (kendisi için izin verilen limit tesis edilmemiş maddeler için minimum gerekli performans limiti civarında veya diğer maddeler için izin verilen limit civarında) yeterli alıntı elde etmek için (örn. 40 adet) analiz talimatında belirtildiği gibi seyreltilir. Yükleme yapmak için kullanılan ve final analiz çözeltisinde kullanılan her iki analit çözeltisi ve ilgili diğer çözeltiler (yani türetilmiş standartlar gibi) hazırlanır.

Analiz talimatına uygun olarak taze hazırlanmış çözeltinin analit içeriği analiz edilir. Uygun hacimler uygun kaplara dağıtılır, etiketlenir ve Tablo 2.2'ye göre saklanır.

Tablo 2.2. Çözeltideki Analitin Stabilite Tayin Şeması

	- 20 ° C	+ 4 ° C	+ 20 ° C
Karanlık	10 alıntı	10 alıntı	10 alıntı
Aydınlık	-	-	10 alıntı

Kaynak: (Publications Office of the European Union, 2021: L180/101)

- ❖ Saklama süresi bir, iki, üç ve dört hafta gerekirse daha uzun, örneğin tanımlama veya miktar tayini sırasında ilk parçalanma veya bozunma olguları gözlenebilinceye kadar seçilmelidir. Maksimum saklama zamanı ve en uygun saklama koşulları kaydedilmelidir.
- ❖ Her alıntıdaki analitin/analitlerin derişiminin hesaplanması analiz anında taze hazırlanmış analit çözeltisini kullanarak %100 olarak yapılmalıdır.

$$\text{Kalan analit (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{taze}}$$

C_i = belirlenen süre sonundaki derişim

C_{taze} = taze çözeltinin derişimi (C_0 = Başlangıç derişimi)

b) Analitlerin matriks içindeki stabilitesi

- ❖ Mümkün olduğunda, hedef olan matriks kullanılmalıdır. Hedef olan matriks mümkün değilse, analitle yükleme yapılmış matriks kullanılmalıdır.
- ❖ Hedef olan matriks mümkün olduğunda derişimi halâ tazeyken yani ilk hazırlandığı anda belirlenmelidir. Matriks -20°C veya gerekirse daha düşük sıcaklıklarda saklanmalı ve fazla miktarda örnek alınmalıdır. Örnek laboratuvarda tutulduğu sürece analit derişimleri belirlenmelidir.
- ❖ Eğer hedef olan matriks mümkün değilse, bir miktar boş matriks alınarak homojenize edilir. Matriks beş kısma bölünür. Her kısım tercihen küçük miktarlarda sulu çözelti olarak hazırlanmış olması gereken analitle takviye edilir. Ayrılan matriks kısımlarından bir kısmı hemen analiz edilir. Kalan kısımlar en az -20°C’de veya gerekirse daha düşük sıcaklıklarda saklanır ve bunlar kısa, orta-uzun ve uzun süreli saklama sonrası analitik yöntem dikkate alınarak analiz edilir.
- ❖ Maksimum ve en uygun kabul edilebilir saklama koşulları kaydedilmelidir.

Saklanan beş matriks kısmı solüsyonunun ortalama değeri, yeni hazırlanmış beş kısım solüsyonun ortalama değerinden ve yöntemin laboratuvar içi tekrar üretilebilirliğinden daha fazla farklılık göstermemelidir. Yüzde farkının hesaplanmasında yeni hazırlanmış beş çözeltinin ortalama değeri esas alınmalıdır (Publications Office of the European Union, 2021: L180/102).

2021/808/EU direktifine göre belirlenen matriks türü ve içerisindeki analitlerle ilgili daha önce yayınlanmış veya başka bir laboratuvar tarafından yapılan stabilite çalışmasına ait verilere erişilebiliyorsa aynı koşullar altında olmak şartıyla tekrardan stabilite çalışmasına gerek yoktur (Publications Office of the European Union, 2021: L180/96).

3. LİTERATÜR ARAŞTIRMALARI

Literatür araştırmaları sonucunda plazmada testosteron esterlerinin tespitine ait çalışmaların oldukça az olduğu gözlemlendi. Genel olarak idrarda serbest testosteron tespitine yönelik çalışmaların olduğu görüldü. Ayrıca analit tespitlerinde GC-MS cihazı kullanımının daha fazla olduğuna rastlandı. Araştırmalar sonucunda plazma/serum üzerine yapılan bazı örnek çalışmaların metotları karşılaştırılarak değerlendirildi.

De La Torre vd. (1995: 1395), çalışmalarına göre rutin analizlerde uygun türevlendirme işleminin daha iyi olacağı belirtilmiştir. Sebebi ise türevlendirilmemiş testosteron esterlerinin GC-MS cihazında yapılan analizinde esterlerin kolondaki ayrılmadan sonra dedektör tarafından tespit edilmesinin oldukça güç olduğu anlatılmıştır. Düşük çözünürlükten dolayı keskin ve yüksek pik elde edilememektedir. Yapılan çalışmada testosteron esterlerinin analizi sırasında silil ve açıl türevleri denenmiş ve yöntemin eksojen olarak ester uygulamasının saptanmasında yararlı olduğu gösterilmiştir. En iyi türevlendirme işleminin ise trimetilsilil türevi ile olduğunu ve taramalar için GC-MS, daha yüksek hassasiyet için Gaz Kromatografi Tandem-Kütle Spektrometresi (GC-MS/MS) cihazında uygun koşullar sunduğu anlatılmıştır.

Gray vd. (2011: 212), çalışmalarında Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi Tandem-Kütle Spektrometresi (UPLC-MS/MS) için sıvı – sıvı ekstraksiyon (LLE) yöntemi kullanmış ve yine metoksiamin hidroklorür ile türevlendirme yapmışlardır. Geliştirmiş oldukları yöntemi, ilaçların atlara kas içi olarak enjekte edilmesinin ardından kan örneklerini analiz etmek için kullanmışlardır. Enjekte edilen testosteron esterlerinin dördünü, uygulamadan sonra minimum 200 saat boyunca plazmada tespit edebilmişlerdir. Testosteron dekanotatın çalışma süresi boyunca plazmada tespit edilen en uzun süreli ester olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Kaabia vd. (2013: 139), diğer yöntemlere göre farklı olarak daha düşük örnek hacimleriyle çalışmanın yanında glikoprotein-steroid ester bağınyı zayıflatmak amacı ile yüksek ısıda ultrasonik banyo ile bir saatlik ön işlem yapılmıştır. Numune hazırlama aşamasında SPE kullanılmış ve elüsyon çözelti hacimlerinde azaltma ve farklı çözücüler kullanma yoluna gidilmiştir. İki farklı fraksiyon çalışılmış ve ilk fraksiyon türevlendirme aşamasına tabii tutularak türevlendirme yapılmayan ikinci fraksiyon ile birlikte analiz edilmiştir. Kullanılan cihazın yüksek duyarlılığı ve kantitatif yönü sayesinde kan örneklerinde eser miktarda anabolik esterlerinin tespiti sağlanmıştır. Fakat bu yöntemde hem iki aşamalı bir

fraksiyon, hem türevlendirme, hem de ön işlem uygulanması zaman ve ekonomik açıdan dezavantajlı bir yöntem sayılabilmektedir.

G. Forsdahl vd. (2013: 829), tarafından geliştirilen metodun türevlendirme ve ekstraksiyon aşamalarında kullanmış oldukları yöntem oldukça ilgi çekicidir. Farklı yöntemlerde rastlamış oldukları LLE yönteminde kullanılan türevlendirme basamağında metoksiamin hidroklorür yerine hidroksilamin kullanılmıştır. Sebebi ise metoksiamin hidroklorürün kromatogramda çift pik vermesidir. Çift pik sorununun nedenini büyük olasılıkla karbon-azot çift bağı etrafındaki kısıtlı dönüşün neden olduğu E ve Z geometrileri olduğunu belirtmişlerdir. Hidroksilamin kullanarak bu sorunun önüne geçmişlerdir. Ekstraksiyon aşamasında eklenen farklı çözücüler ise diğer yöntemlere göre bu yöntemi öne çıkarmıştır. Polarite farklılıklarından dolayı kısa ve uzun zincirli testosteron esterlerinin ekstraksiyonu kolay olmamaktadır. Testosteron dekanat ve testosteron undekanoatın polar olmayan uzun zincirli yapıları sebebiyle geri kazanımı arttırabilmek için LLE'den önce numuneye metanol eklenmiştir. Esterlerin yüzey tutunmalarını önlemek için ise dimetilsülfoksit eklenmiş ve LC-MS/MS için duyarlı bir yöntem geliştirmişlerdir.

Van Renterghem vd. (2020: 4), çalışmalarında fraksiyon basamağını kullanmış ve GC-MS cihazına temiz bir numune akışını hedeflemişlerdir. Bu fraksiyonun ilk adımı LLE'dir. İkinci adımda ise testosteron ester yapılarına benzer bir özelliğe sahip olan kanda ki lipid yapılarını uzaklaştırmak için HPLC cihazını kullanmışlardır. Kanda fazlaca bulunan bu lipid yapılarının (örn; kolesterol) esterlere girişim yaparak ortaya olumsuz sonuçlar çıkardığını belirtmişlerdir. Fraksiyonun bir diğer avantajı ise temiz bir örnek elde edildiği için cihazın sistem kirliliğini önlemektedir. Örnek hazırlamanın son aşaması olan türevlendirme adımında da, LC-MS/MS cihazında tek ve keskin pik elde eden G. Forsdahl vd. (2013)'nin çalışmasında kullanılan hidroksilamin yerine N-Metil-N-(trimetilsilil)trifloroasetamid (MSTFA) kullanmayı tercih etmişlerdir. Sebebi ise MSTFA'nın GC-MS cihazında esterlerin daha yüksek hassasiyetle tespit edilebilmesini sağlamasıdır. Ayrıca doping kontrol laboratuvarlarının genel olarak idrar analizlerinde kullandığı MSTFA haricinde farklı bir türevlendirme maddesi kullanmadan kan analizlerini de rutin olarak yapabileceklerini ifade etmişlerdir. GC-MS/MS için geliştirdikleri yöntemin LC-MS/MS yöntemine alternatif bir yöntem olduğunu ve yüksek duyarlılığını göz önünde bulundurarak, De La Torre vd. (1995)'nin yöntemine göre daha üstün olduğunu kabul edilebileceğini savunmuşlardır.

Matraszek-Zuchowska vd. (2020: 4)'nin yaptığı çalışmada altı farklı yöntem kullanılmış ve bu yöntemler içerisinde en iyi geri kazanımı basit bir çözelti (n-heptan - etil asetat karışımı) ile LLE ve sonrasında metoksiamin hidroklorür ile türevlendirme yaparak sağlamışlardır. Fakat bu yöntemde daha önce de bahsedildiği gibi kromatogramda türevlendirmeden kaynaklı çift pik görülmüştür. Diğer yöntemlerde ise geri kazanım ve tekrarlanabilirliğin oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Stastny vd. (2020: 2)'nin analiz yönteminde GC-MS tekniğinin biyolojik numunelerde düşük derişimlere inebildiğine değinilmiş fakat maliyetli ve zaman alıcı örnek hazırlama evresi olduğundan da bahsedilmiştir. Bu sebeple numune hazırlama evresi daha ekonomik, hızlı ve türevlendirme basamağı olmayan LC-MS analiz yöntemi tercih edilmiştir. Bununla birlikte LC-MS cihazına eklenen HPLC modülü ile GC-MS'ten daha yüksek hassasiyet elde edildiği de belirtilmiştir.

Testosteron esterleri veya anabolik steroid esterlerinin tespiti çalışmalarında çeşitli metotlar kullanılmış ve çoğunlukla ortak nokta olarak türevlendirme adımı kullanılmıştır. Türevlendirme her ne kadar molekülü büyötmeye ve dedektör tarafından daha iyi tespit edilebilmeyi sağlasa da hem maliyeti hem de analiz süresini arttırmaktadır. Bazı türevlendirme basamaklarında ise kromatogramda kafa karışıklığına sebebiyet veren çift pik sorunu gözlemlenmiştir (Gray vd., 2011: 210; Matraszek-Zuchowska vd., 2020: 7). Rutin analizlerde kullanıldığında artan süre, kromatogram sorunu ve maliyet oldukça önem kazanmaktadır. Ayrıca türevlendirme adımı otomasyon sistemine bağlanamadığı için iş gücü kaybı durumu da önemli bir sorundur.

GC-MS cihazı biyolojik örneklerde nanogram seviyelerinde anabolik steroid düzeylerinin tespitinde kullanılır (Zhang vd., 2009: 1083). Bunun yanı sıra GC-MS yöntemleri steroid analizleri için karışık, uzun süreli ve maliyeti yüksek bir numune türevleme basamağı gerektirir (Stastny vd., 2020: 2). Genel olarak bu türevleme kararsızdır ve analiz esnasında ısı ile bozulabilme olasılığı olduğundan kullanılan yöntemde tekrarlanabilirliği olumsuz yönde etkilemektedir (He vd., 2005: 143). Tüm bunların aksine LC-MS/MS yöntemi hızlı, ekonomik ve numune hazırlama esnasında türevleme işlemine ihtiyaç duymaz (Stastny vd., 2020: 2). Testosteron esterlerinin saptanmasında GC ve LC yöntemleri birbirlerinin alternatifi olarak değerlendirilebilir. Kullanılacak yöntemin belirlenmesi analiz laboratuvarlarının altyapısına bağlı olarak değişmektedir. Dolayısı ile uygunluk kontrolü analiz laboratuvarlarının inisiyatifine bırakılmıştır.

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Materyal

Çalışmada kullanılan referans maddeler, kimyasal maddeler, cihaz ve ekipmanlara ait çeşitli bilgiler aşağıda başlıklar halinde belirtilmiştir.

4.1.1. Referans Maddeler

Çalışmada kullanılacak olan sertifikalı referans maddeler ana stok olarak 1 mg/mL derişimde hazırlandı. Ana stok çözeltiden 40 ng/mL derişimde olacak şekilde çalışma standartı hazırlandı. İç standart (IS); örnekler içerisinde bulunma imkânı olmayan ve tespit edilmek istenen analitlere yapı olarak çok benzeyen fakat aynı etkiyi göstermeyen maddelerdir. Bu sebeple ekstraksiyon aşamalarında oluşan aksaklıklar veya kayıpların kontrolü amacıyla örneklere IS olarak testosteronun döteryumlu hali olan Testosteron-D₃ (T-D₃) eklenmiştir. Çalışmada kullanılan referans maddelerin adı, CAS numarası, saflık derecesi, markası ve saklama koşulları gibi bilgileri Tablo 4.1 'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Referans Madde Listesi

Adı	CAS-No	Saflık (%)	Markası	Saklama (°C)
TP	57-85-2	> 98	Steraloids Inc.	20
TE	315-37-7	> 98	Steraloids Inc.	-20
TCy	58-20-8	> 98	Steraloids Inc.	< 8
TD	5721-91-5	99,1	LGC Standarts	2 - 8
T-D ₃ (IS)	77546-39-5	99,79	HPC Standarts	20

4.1.2. Kimyasal Maddeler

Tez çalışmalarında hazırlanan çözeltilerde ve ekstraksiyonda kullanılan kimyasal maddelere ait bilgiler Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Madde Listesi

Kimyasal Adı	CAS-No	Safılık (%)	Markası
Metanol (MeOH)	67-56-1	99,8	J.T Baker
Asetonitril (ACN)	75-05-8	99,9	J.T Baker
Sodyum Hidroksit	1310-73-2	32	Chemlab
Potasyum Dihidrojen Fosfat	7778-77-0	99,8	Merck
Hidroklorik Asit	7647-01-0	30	Merck
Amonyum Format	540-69-2	99	Honeywell Fluka
Formik Asit	64-18-6	98	Merck

4.1.3. Cihaz ve Ekipmanlar

Tez çalışmalarında kullanılmış olan cihaz ve ekipmanlara ait bilgiler Tablo 4.3’te verilmiştir.

Tablo 4.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihaz ve Ekipman Listesi

Cihaz / Ekipman Adı	Marka	Model
Otomatik Pipet	Eppendorf	20-200 µL
Otomatik Pipet	Vitlab	100-1000 µL
Otomatik Pipet	Socorex	1-10 mL
Otomatik Dilütör	Eppendorf	E3 Multipipet
Hassas Terazî	Sartorius	CPA224S
Ultrasonik Banyo	Vise-Clean	WUC-A03H
Derin Dondurucu	Sanyo	Biomedical-Freezer
Buzdolabı	Sanyo	Biomedical-Medicool

Tablo 4.3. devamı

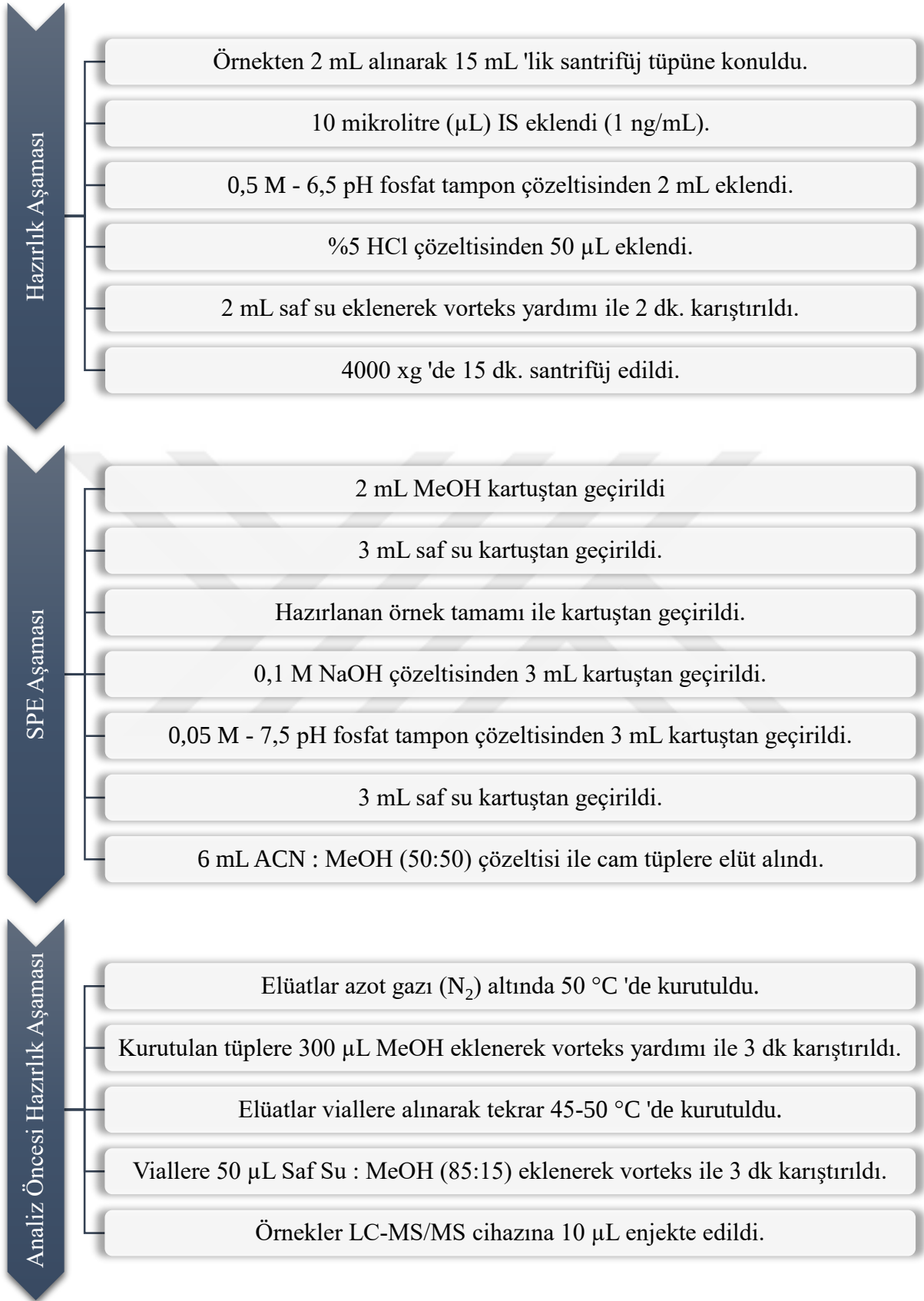
Katı Faz Ekstraksiyon (SPE) Cihazı	Gilson	ASPEC GX-274
pH Metre	VWR	1100L
Kurutma Sistemi	Caliper	TurboVap LV
Tekli Karıştırıcı	Heidolph	Reax-Top
Çoklu Karıştırıcı	Allsheng	MTV-100
Kurutucu Blok	Techne	Dri-Block DB-3D
Soğutmalı Santrifüj	Thermo	Heraeus Cryofuge 5500i
LC-MS/MS	Agilent	6460 Triple Quad LC/MS
Degazör (HPLC)	Agilent	G1379B Degazzer
Pompa (HPLC)	Agilent	G1312B Bin Pump SL
Örnekleme (HPLC)	Agilent	G1367B Hip-ALS-SL+
Kolon Fırını (HPLC)	Agilent	G1316B TCC SL

4.2. Metot

4.2.1. Örneklerin Analize Hazırlanması

Yapılan çalışmada numune olarak BioWest® firması tarafından ticari olarak satışa sunulan S090H-500 kodlu ürün kullanıldı. Örnekler kontaminasyon ve bozulmalara karşı 50 mL'lik santrifüj tüplerine ayrıldı. Ürünün özelliklerinde belirtilen saklama koşullarına uygun olarak -20 °C'de derin dondurucuda saklandı. Her çalışma öncesi yeterli miktarda örnek çözündürülerek kullanıldı.

Denemeler sırasında tez çalışmamızla ilişkili kaynaklarda ki yöntemler değerlendirildi ve farklı çözücü, kolon vs. değişimi yapılarak en iyi sonuç elde edilmeye çalışıldı (de la Torre vd., 2021: 7; Hooijerink vd., 1994: 2619; Kaabia vd., 2013: 128; Matraszek-Zuchowska vd., 2020: 2; Törnvall, 2010: 14). Bu çalışmalar kapsamında yapılan çeşitli modifikasyonlar sonucu ortaya çıkan Şekil 4.1'de belirtilen yöntemin en iyi ve en etkili yöntem olduğuna karar verildi. SPE aşamasında farklı marka kartuşlar denendi ve en iyi performansı gösteren Agilent marka Bond Elut Plexa PAX 60 mg, 3 mL'lik kartuş kullanıldı.



Şekil 4.1. Örnek Hazırlama Aşaması

4.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışmada ekstraksiyon aşaması ve cihazda kullanılan mobil faz çözeltileri aşağıdaki gibi hazırlandı.

0,1 M Sodyum Hidroksit: %32'lik sodyum hidroksit çözeltisinden 9,26 mL alınarak içerisinde az miktarda saf su olan 1,0 litrelik balon jojeye yavaş yavaş eklendi ve hacim saf su ile 1,0 litreye tamamlanarak karıştırıldı.

Hacimce %5'lik Hidroklorik Asit : %30'luk hidroklorik asit çözeltisinden 166,67 mL alınarak içerisinde az miktarda saf su olan 1,0 litrelik balon jojeye yavaş yavaş eklendi ve hacim saf su ile 1,0 litreye tamamlanarak karıştırıldı.

0,5 M - pH 6,5 Fosfat Tampon: Potasyum dihidrojen fosfat katısından hassas terazide 68,05 g tartılarak 1,0 litrelik balon joje içerisine konuldu ve saf su ile hacim 1,0 litreye tamamlanarak karıştırıldı. Daha sonra pH metre yardımı ile pH 6,5 olarak ayarlandı.

0,05 M – pH 7,5 Fosfat Tampon: Daha önce hazırlanan 0,5 M fosfat tampon çözeltisinden 100 mL alınarak 1,0 litrelik balon jojeye konuldu ve hacim saf su ile 1,0 litreye tamamlanarak karıştırıldı. Daha sonra pH 7,5 olarak ayarlandı.

Mobil Faz A (% 0,1 Formik Asitli 1 mM Amonyum Format Çözeltisi): Amonyum format katısından hassas terazide 126,0 mg tartılarak 2,0 litrelik balon jojeye konuldu ve saf su ile hacim 2,0 litreye tamamlandı. Tam çözünme sağlanana kadar karıştırıldıktan sonra çözelti içerisinden 2 mL alınarak atıldı ve yerine 2 mL formik asit ilave edildi. Daha sonra içerisinde bulunabilecek gazları gidermek amacı ile ultrasonik banyoda 10 dk tutuldu ve cihaza bağlandı.

Mobil Faz B (Metanol): 2,5 litrelik metanol şişesi içerisinde bulunabilecek gazları gidermek amacı ile ultrasonik banyoda 10 dk tutuldu ve cihaza bağlandı.

4.2.3. Cihaz Koşulları

Çalışmada kullanılacak olan yönteme ait Agilent 6460 Triple Quad LC-MS/MS cihazının en uygun malzeme ve çalışma koşulları aşağıda ayrı başlıklar halinde anlatılmıştır.

4.2.3.1. HPLC Ünitesi Koşulları

Kolon: İlk olarak çalışmada kullanılacak olan kolon, denemeler sonucunda Waters markasının Acquity UPLC-BEH-C18 1,7µm 2,1mm*100mm özelliğindeki kolonu seçilmiştir.

Kolon Fırını: Kolonun sabit bir sıcaklıkta kalmasını sağlayacak ve blok özelliğe sahip olan kolon fırını 45 °C'ye ayarlanmıştır.

Akış Diyagramı: Çalışmada kullanılan yöntem için farklı akış oranları denenmiş ve en verimli akış diyagramı Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Pompa Akış Diyagramı

<i>Süre (dk)</i>	<i>Mobil Faz A (%)</i>	<i>Mobil Faz B (%)</i>	<i>Akış Hızı (mL)</i>
0,00	85	15	0,3
0,50	85	15	0,3
14,00	2	98	0,3
16,00	2	98	0,3
16,01	85	15	0,3
19,00	85	15	0,3

4.2.3.2. Kütle Spektrometre Ünitesi Koşulları

Cihaz çalışma parametreleri ve taranan maddelere ait ana iyon bilgisi, parçalanma iyonlarına ait bilgiler, alıkonma zamanı (RT), uygulanan voltaj değerleri, çarpışma enerjisi (CE) ve polarite gibi bilgiler sırasıyla Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.5. Cihaz İyonlaştırma Parametreleri

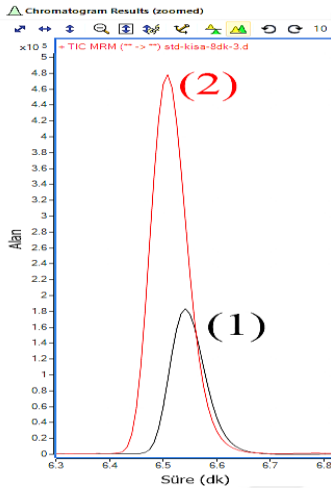
Parametre	Değer (+)	Değer (-)
Gaz Sıcaklığı (°C)	200	200
Gaz Akışı (L/dk)	8	8
Nebulizer (psi)	35	35
Sheath Gaz Sıcaklığı (°C)	300	300
Sheath Gaz Akışı (L/dk)	11	11
Kapiller Voltajı (V)	3000	2500
Şarj Voltajı (V)	1000	1000

Tablo 4.6. Analitlere Ait Kütle Spektrometresi Parametreleri

Analit	Ana İyon (m/z)	Parçalama Voltajı (fv)	Parçalanma İyonu (m/z)	CE (V)	RT (dk)	Polarite
TP	345,2	150	97,1 109,1	20 40	12.451	Pozitif
TE	401,3	150	97,1 109,1	20 40	14.286	Pozitif
TCy	413,3	150	97,1 107,2 109	27 25 27	14.411	Pozitif
TD	443,4	180	97,1 109,1	35 33	15.212	Pozitif
T-D ₃ (IS)	292,2	119	97 109	25 18	9.962	Pozitif

5. BULGULAR

Tablo 4.6’da TD için verilen parçalama ve CE voltaj değerlerinin yüksek olduğu belirtilmiştir. TD için kütüphane ve literatür taramalarında elde edilen optimizasyon verileri cihaz parametrelerine dahil edilmiş fakat metot denemeleri sürecinde yeterli seviyede kazanım elde edilememiştir. Optimizasyon işlemini tekrar ettiğimizde parçalama ve CE voltaj değerlerinin yüksek olduğu durumda daha iyi sonuçlar elde edildi ve yeni parametreler cihaza kaydedilerek analizler bu şartlarda yapıldı (Şekil 5.1).

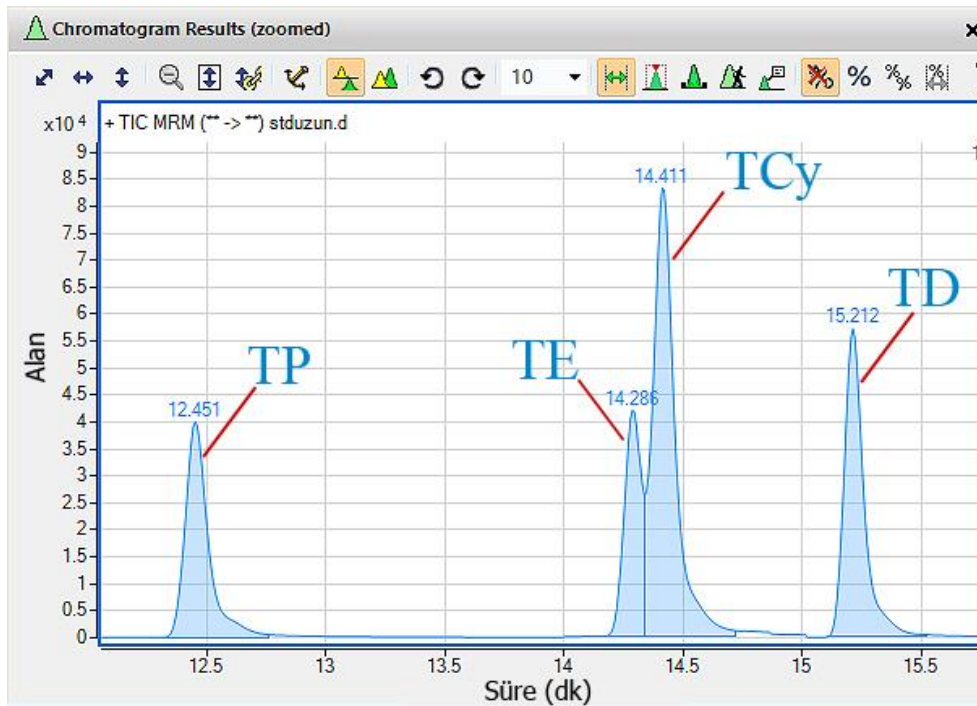


(1) TD için fv: 180, CE: 97,1→15 109,1→15

(2) TD için fv: 180, CE: 97,1→35 109,1→33

Şekil 5.1. TD İçin Parçalama Voltajı (fv) ve CE Voltaj Değerleri Karşılaştırması

Geçerli parametreler girildikten sonra cihazda analiz edilen referans malzeme karışımının toplam iyon kromatogramı (TIC) Şekil 5.2’de gösterilmiştir.

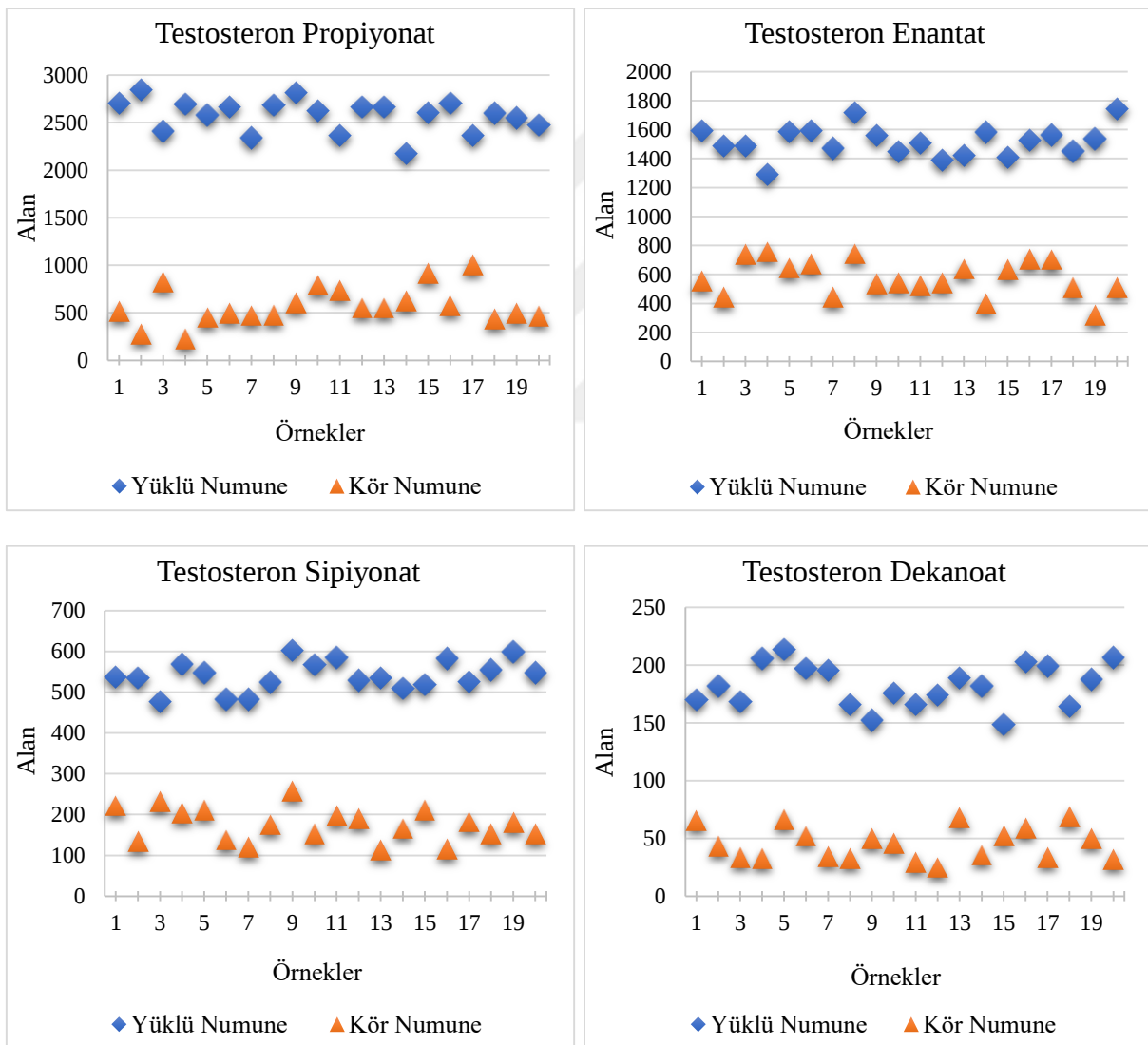


Şekil 5.2. Analitlere Ait Toplam İyon Kromatogramı (TIC)

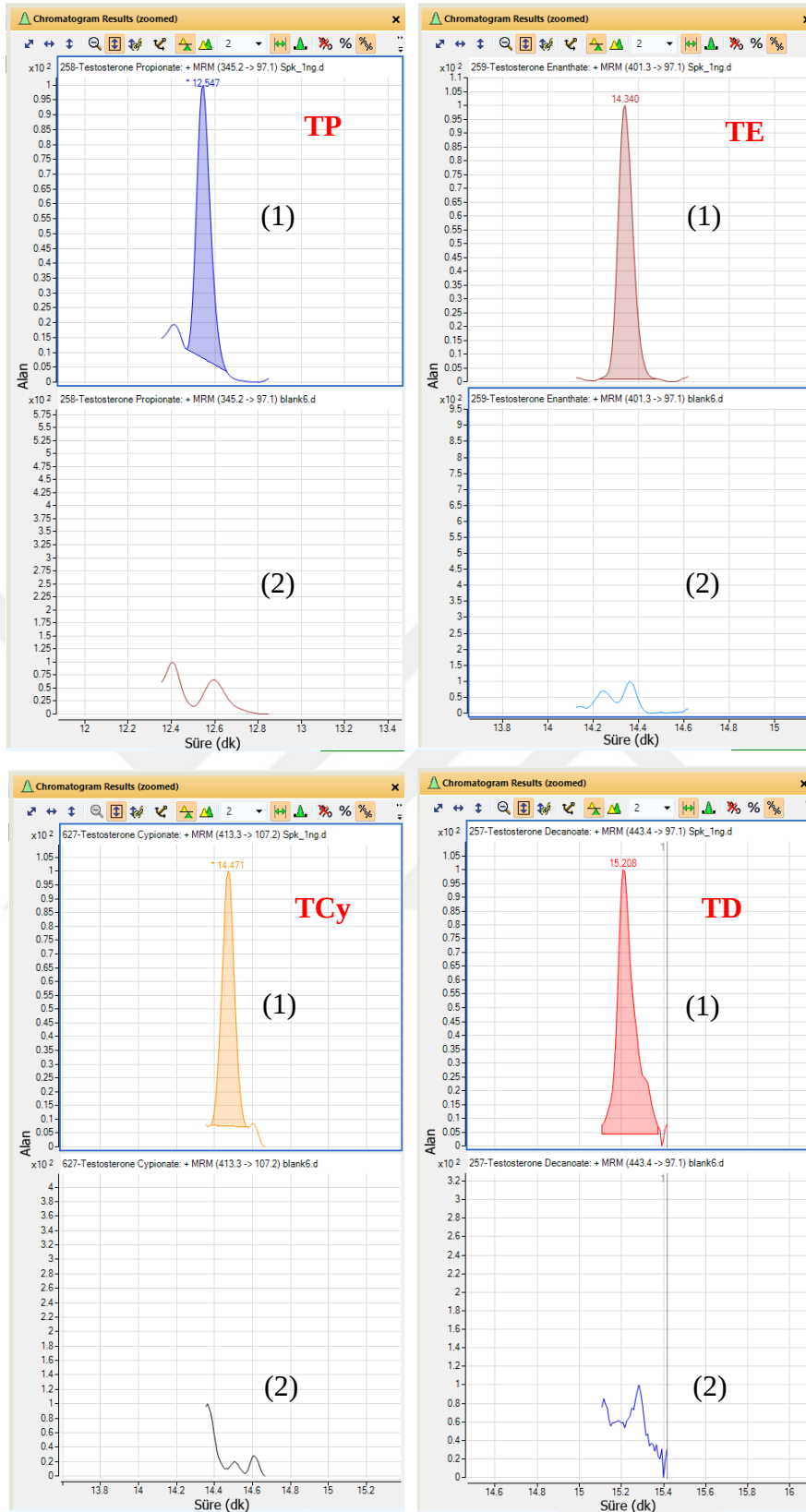
5.1. Metot Validasyonu

5.1.1. Seçicilik / Özgüllük Çalışması

Çalışmada kullanılan analitleri içermediği bilinen 20 farklı parti numaralı kör örnek yükleme yapılmadan ve tespit edilen en düşük derişim düzeyinde (TP: 0,5 ng/ml, TE: 1 ng/ml, TCy: 1 ng/ml, TD: 1 ng/ml) yükleme yapılarak çalışıldı. Her bir analit ayrı ayrı değerlendirildi ve hiçbir analit için alıkonma zamanı bölgesinde kör numuneden gelen sinyal ile yükleme yapılmış seviyeden gelen sinyal birbiri ile örtüşmedi. Analitlerin analiz sonuçlarına ait grafikler Grafik 5.1’de kromatogram karşılaştırmaları ise Şekil 5.3’de verilmiştir.



Grafik 5.1. Analitlere Ait Seçicilik / Özgüllük Çalışması Grafikleri



Şekil 5.3. Analitlere Ait Kör ve Yüklü Numunelerin Kromatogram Karşılaştırması

(1: Yüklü Numune, 2: Kör Numune)

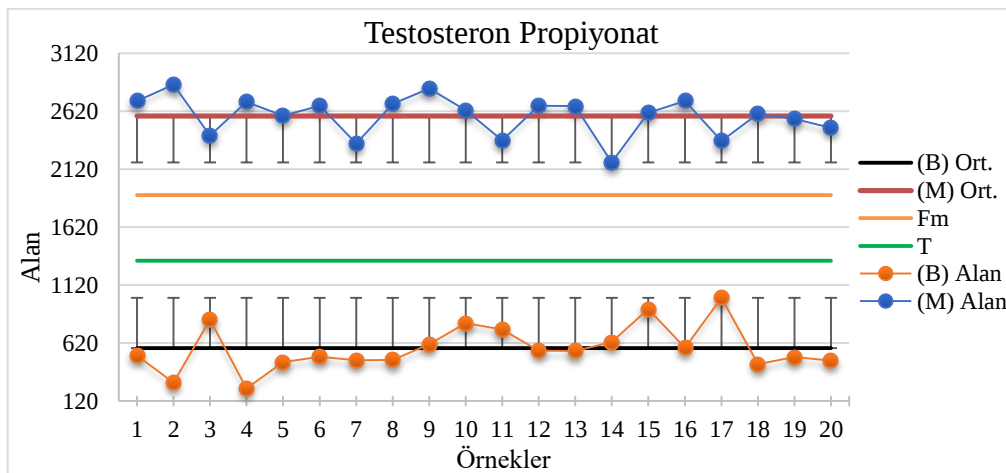
5.1.2. Algılama Yeteneği (CCβ) Çalışması

Avrupa Birliği Yayın Ofisi tarafından yayınlanan 2021/808/EU nolu direktifte CCβ hesabı için üç farklı metot belirlenmiştir. Bu metotlardan çalışma içeriğine uygun olan herhangi birisi hesaplamalarda kullanılabilir. Çalışmamızda belirtilen direktifin önermiş olduğu ikinci metot seçilmiş ve Avrupa Komisyonu tarafından yayınlanan veteriner ilaç kalıntıları için tarama yöntemlerinin validasyonuna ilişkin kılavuzda örnek olarak verilen CCβ hesaplama yöntemi ile sonuçlar ayrıca teyit edilmiştir (European Commission-CRLs, 2010: 15).

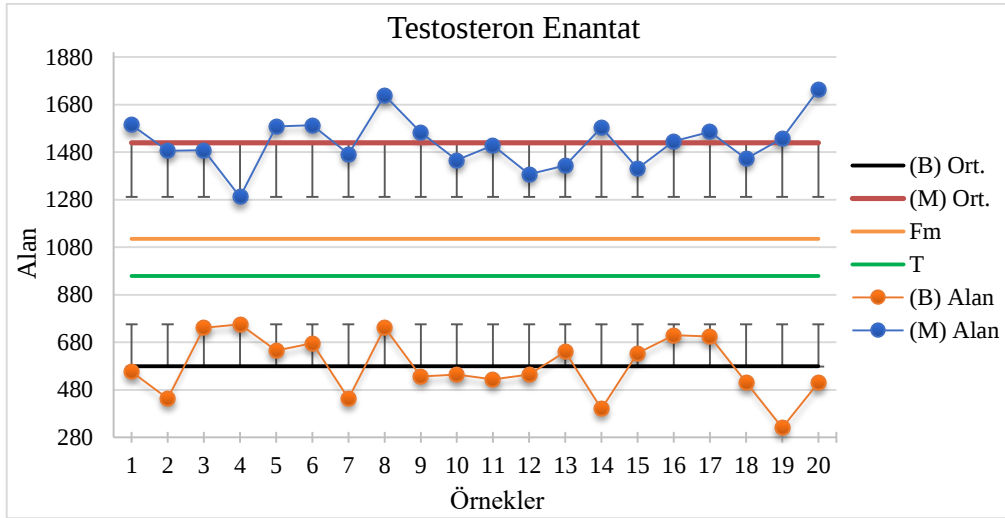
Seçmiş olduğumuz yöntemle göre yapılan analizler sonucu tespit edilebilen en düşük derişim seviyesi üzerinde kör numunelere farklı seviyelerde analit eklenerek 20'şer adet numune analiz edilmiş ve uyumsuz sonuçların %5'i geçmediği derişim seviyesi CCβ olarak değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerde elde edilen verilere göre yüklenmiş örnekler ile kör örnekler ait verilerde örtüşme olmadığından analitlere ait CCβ değeri; TP için $\leq 0,5$ ng/mL, TE için ≤ 1 ng/mL, TCy için ≤ 1 ng/mL ve TD için ≤ 1 ng/mL olarak belirlenmiştir. Daha önce analiz edilen boş ve yüklenmiş 20'şer farklı örneğin alan verileri, teyit edilmek amacıyla yukarıda belirtilen kılavuza göre istatistiksel olarak grafiğe aktarıldı ve değerlendirildi. Elde edilen bu verilerden kör örnekler ait alan verileri ortalaması (B_{ort}) ve standart sapması (SD_b) ile yüklü örneklerin alan verileri ortalaması (M_{ort}) ve standart sapması (SD) belirlendikten sonra kesme faktörü (F_m) ve eşik seviyesi (T) değerleri aşağıdaki formüller yardımıyla her bir analit için ayrı ayrı hesaplandı ve grafikler oluşturuldu (European Commission-CRLs, 2010: 16).

$$\text{Eşik Seviyesi (T)} = B_{ort} + 1,64 \cdot SD_b$$

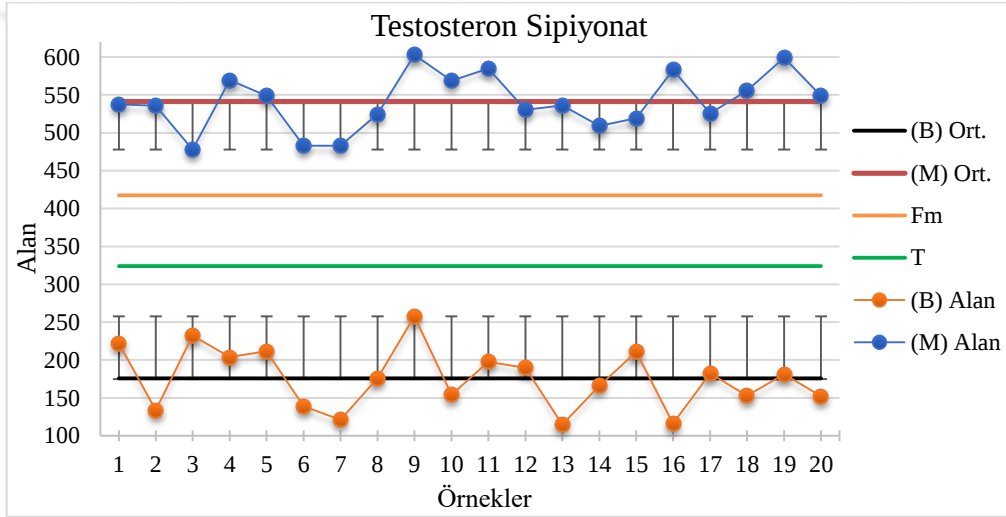
$$\text{Kesme Faktörü (Fm)} = M_{ort} - 1,64 \cdot SD$$



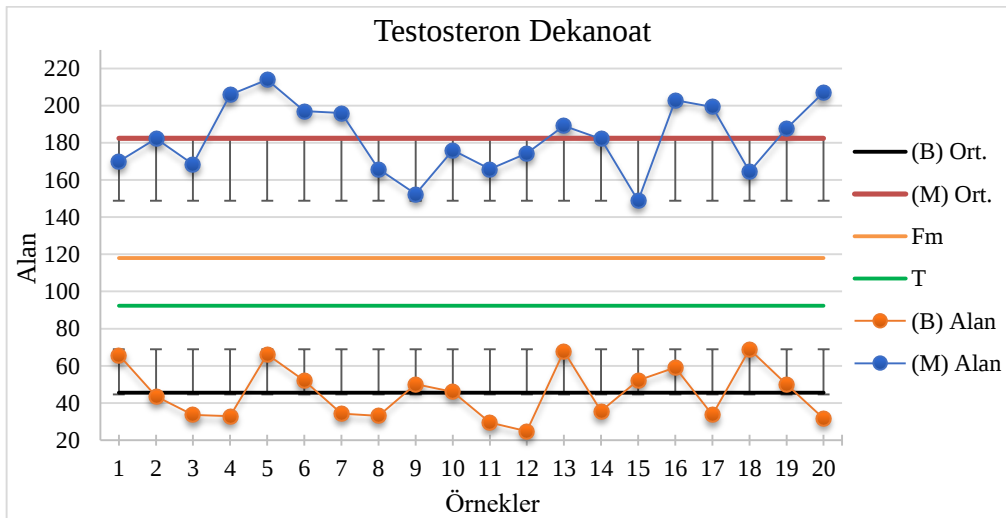
Grafik 5.2. Testosteron Propiyonat T ve Fm Gösterim Grafiği



Grafik 5.3. Testosteron Enantat T ve Fm Gösterim Grafiği



Grafik 5.4. Testosteron Sipiyonat T ve Fm Gösterim Grafiği



Grafik 5.5. Testosteron Dekanoat T ve Fm Gösterim Grafiği

5.1.3. Sağlamlık Çalışması

5.1.3.1. Youden Yaklaşımı

Çalışmamızda uluslararası geçerliliği bulunan, verilerin elde edilmesinde zaman ve enerji bakımından en çok tercih edilen Youden yaklaşımı kullanılarak sağlamlık testi yapılmıştır (Youden ve Steiner, 1997). Numune hazırlama, ekstraksiyon ve analiz basamaklarında ölçüm sonuçlarını etkileyebilecek minör faktör olarak fosfat tampon miktarı, HCl derişimi, bekleme süresi, santrifüj süresi, SPE kartuşta yıkama çözücüsü miktarı, SPE kartuşta elüt çözeltisi oranı ve elüat kurutma sıcaklığı etkisi incelendi. Her faktör için 3'er adet paralel örnek hazırlandı. Yapılan bu çalışma ile etki edebileceği düşünülen faktörlerin metot üzerindeki etkisi t-testi uygulanarak değerlendirildi.

5.1.3.2. Etki Faktörleri

Geliştirmiş olduğumuz yönteme etki edecek faktörler Tablo 5.1'de gösterildiği gibi 7 faktör olarak belirlenmiştir. Tabloda artılar (+) geliştirmiş olduğumuz yönteme ait uygulanan parametreleri, eksiler (-) ise değişiklik yapılan parametreleri göstermektedir.

Tablo 5.1. Sağlamlık Çalışması Minör Faktörler ve Değerler Tablosu

FAKTÖR	+	-
A- Fosfat tampon miktarı	2 mL	3 mL
B- HCl derişimi	%5	%4
C- Bekleme süresi	0	15 dk
D- Santrifüj süresi	15 dk	30 dk
E- Elüt çözeltisi oranı (ACN:MeOH)	50:50 (v/v)	55:45 (v/v)
F- Elüatın N ₂ altında kurutma sıcaklığı	50 °C	60 °C
G- Viale aktarma çözücü miktarı	300 µL	350 µL

Tablo 5.2. Sağlamlık Çalışılacak Örnekler ve Etki Faktörü Tablosu

Örnek No	Faktörler						
	A	B	C	D	E	F	G
1-3	+	+	+	+	+	+	+
4-6	+	+	-	+	-	-	-
7-9	+	-	+	-	+	-	-
10-12	+	-	-	-	-	+	+
13-15	-	+	+	-	-	+	-
16-18	-	+	-	-	+	-	+
19-21	-	-	+	+	-	-	+
22-24	-	-	-	+	+	+	-

İlk olarak tüm faktörler için (A-G) etki hesaplaması aşağıda ki formüllere göre yapılarak her bir analit için ayrı ayrı hesaplandı ve sırasıyla Tablo 5.3, Tablo 5.4, Tablo 5.5 ve Tablo 5.6’da gösterildi.

$$E_i = \frac{(+)_\text{top} - (-)_\text{top}}{\text{Örnek sayısının yarısı}}$$

E_i : Hesaplanan faktör etkilerinin her biri (A-G)

$(+)_\text{top}$: (+) işaretli etkenlerin toplam alan verileri

$(-)_\text{top}$: (-) işaretli etkenlerin toplam alan verileri

S_E : Etki faktörleri sonuçlarından elde edilen alanların standart sapması

n : Toplam faktör sayısı

Önemlilik: t-testi $\left(t = \frac{E_i * \sqrt{n}}{S_E * \sqrt{2}}\right)$ formülüne göre hesaplanmıştır.

Serbestlik derecesi tablosunda her bir gruptaki numune sayısı göz önüne alınarak serbestlik derecesi ($df = n-1$) 6 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen serbestlik derecesi, t-testi tablosunda ilgili sütunda bulunarak %97,5 güven aralığına denk gelen t-kritik değeri 2,447 olarak görülmüştür. Bu durumda hesaplamalar sonucu elde edilen t-değeri = < 2,447 ise ilgili faktör yönünden metot sağlam, aksi durumda hassas olarak değerlendirilmektedir (TOB-GKGM, 2018: 64).

Yapılan sağlamlık çalışmasına ait veriler değerlendirildiğinde riskli olduğu öngörülen ve Tablo 5.1’de belirtilen etki faktörlerinin analitler üzerinde anlamlı herhangi bir etkiye sahip olmadığı görüldü. Analitlere ait hesaplama tabloları aşağıda ayrı ayrı belirtilmiştir.

Tablo 5.3. Testosteron Propiyonat’a Ait Sağlamlık Çalışması Etki Tablosu

FAKTÖR	E _i	t-değeri	Önemlilik
-1- Fosfat tampon miktarı	-696,91	-1,06110	HAYIR
-2- HCl derişimi	-394,03	-0,59994	HAYIR
-3- Bekleme süresi	484,30	0,73738	HAYIR
-4- Santrifüj süresi	835,71	1,27242	HAYIR
-5- Elüt çözeltisi oranı (ACN:MeOH)	8,91	0,01357	HAYIR
-6- Elüatın N ₂ altında kurutma sıcaklığı	-85,22	-0,12975	HAYIR
-7- Viale aktarma çözücü miktarı	1168,97	1,77984	HAYIR

Tablo 5.4. Testosteron Enantat’a Ait Sağlamlık Çalışması Etki Tablosu

FAKTÖR	E _i	t-değeri	Önemlilik
-1- Fosfat tampon miktarı	-121,49	-1,54658	HAYIR
-2- HCl derişimi	-118,49	-1,50840	HAYIR
-3- Bekleme süresi	-13,28	-0,16906	HAYIR
-4- Santrifüj süresi	25,20	0,32085	HAYIR
-5- Elüt çözeltisi oranı (ACN:MeOH)	-101,18	-1,28802	HAYIR
-6- Elüatın N ₂ altında kurutma sıcaklığı	102,08	1,29957	HAYIR
-7- Viale aktarma çözücü miktarı	37,85	0,48191	HAYIR

Tablo 5.5. Testosteron Sipiyonat’a Ait Sağlamlık Çalışması Etki Tablosu

FAKTÖR	E _i	t-değeri	Önemlilik
-1- Fosfat tampon miktarı	-148,31	-1,28610	HAYIR
-2- HCl derişimi	-190,27	-1,64995	HAYIR
-3- Bekleme süresi	80,50	0,69805	HAYIR
-4- Santrifüj süresi	49,53	0,42946	HAYIR
-5- Elüt çözeltisi oranı (ACN:MeOH)	-38,24	-0,33164	HAYIR
-6- Elüatın N ₂ altında kurutma sıcaklığı	-53,27	-0,46192	HAYIR
-7- Viale aktarma çözücü miktarı	-143,89	-1,24771	HAYIR

Tablo 5.6. Testosteron Dekanoat'a Ait Sağlamlık Çalışması Etki Tablosu

FAKTÖR	E _i	t-değeri	Önemlilik
-1- Fosfat tampon miktarı	-2,40	-0,05397	HAYIR
-2- HCl derişimi	-12,72	-0,28643	HAYIR
-3- Bekleme süresi	4,89	0,11015	HAYIR
-4- Santrifüj süresi	51,94	1,17005	HAYIR
-5- Elüt çözeltisi oranı (ACN:MeOH)	-26,57	-0,59846	HAYIR
-6- Elüatın N ₂ altında kurutma sıcaklığı	39,33	0,88598	HAYIR
-7- Viale aktarma çözücü miktarı	22,05	0,49657	HAYIR

5.1.4. Stabilite (Kararlılık) Çalışması

2021/808/EU nolu direktifte aynı koşul ve matriks üzerinde daha önce stabilite çalışması yapılmış ise tekrardan yapılmasına gerek görülmediğı belirtilmiştir. Daha önce Y.You ve ark. (2011: 3989) ile G.Forsdahl ve ark. (2013: 830) tarafından yapılan çalışmalar sonucunda testosteron esterlerinin belirlenen koşullarda stabilite çalışması yapılmış ve anlamlı bir değışikliğe uğramadığı tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Giriş bölümünde de üzerinde durulduğu gibi at yarışlarında doping kullanımı uzun yıllardır süregelen illegal bir uygulamadır. Doping etkili olan maddelerin metabolizma üzerinde olumlu etki göstermesinin yanında ciddi yan etkilerinin bulunması yine de yasaklı kullanımın önüne geçememiştir. Bu uygulamaların önüne geçilmesi amacıyla çeşitli adımlar atılmış, kontrol mekanizmaları kurulmuş fakat her geçen gün farklı uygulama yöntemleri ortaya çıkmıştır. Bu sebeple yaygın bir şekilde uygulanan yöntemlerle dışarıdan testosteron uygulamasının kesin olarak saptanması zaman içerisinde zorlaşmıştır. Kötü niyetli uygulama yöntemleri farklılaşıp arttıkça doping laboratuvarları tarafından bu uygulamaların tespiti için kullanılan yöntemlerinde geliştirilmesi hâsıl olmuştur. Her ne kadar dışarıdan testosteron uygulaması T/E oranına bakılarak tespit edilmeye çalışılsa da bölgesel farklılıklardan dolayı yanlış sonuçlar ortaya çıkmıştır (Jakobsson Schulze, 2007: 27; Sjöqvist vd., 2008: 1878). Buradan yola çıkarak aslında dışarıdan uygulanan testosteronu fizyolojik testosterondan ayırt edebilmenin oldukça zor bir işlem olduğu görülmüştür. Bunun yanında dışarıdan testosteron uygulaması kısa süreli bir doping etkisi gösterdiğinden uygulama işlemi de oldukça azalmıştır.

Yukarıda belirtilen durum sonucunda kötü niyetli uygulamalarda testosteronun kendisi yerine tedavi amaçlı üretilmiş ve ticari olarak pazarlanan ester formları kullanılmaya başlanmıştır. Testosteronun ester formları uzun zincirli yapıları sebebiyle vücutta yavaş salınım yaparak uzun süreli testosteron etkisi gösterdiğinden kötüye kullanımı çok daha fazla ilgi görmüştür. Dışarıdan uygulanan testosteron esterleri kanda çok düşük seviyelerde olduğundan plazmada ki esterlerin LC-MS/MS ile belirlenmesi kesin bir sonuca götürebilmektedir. Uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinde düşük seviyelerde olan ester formlarını tespit edebilmek için yaygın olarak türevlendirme işlemi kullanılmaktadır. Bu türevlendirme işlemi hem likit kromatografide kullanılan kolonlarda yüksek oranda kirlilik yaratmakta hem de analiz maliyetini arttırmaktadır.

Araştırmalarımız sonucu ulaşabildiğimiz yöntemlerde çoğunlukla türevlendirme adımı kullanıldığından ve bizimde amacımız türevlendirme adımı olmadan plazma örneklerinde testosteron esterlerinin varlığını tespit edebilmek olduğu için bu yöntemlerin çalışmamıza uygun olmadığı görülmüştür. Literatür taramalarında uygun olduğunu düşündüğümüz metotlar laboratuvarımız şartlarına göre uygulanmaya çalışılmış fakat istenilen seviyede kazanım elde edilememiştir. Bu sebeple farklı çözücü, kartuş, ekstraksiyon yöntemi denenmiş

ve karşılaştırma yapılarak en iyi performans veren yöntem seçilerek ilgili metot üzerinde çeşitli modifikasyonlar uygulanmıştır.

Geliştirmiş olduğumuz yöntem yukarıda belirtilen türevlendirme adımını ortadan kaldırarak testosteron esterlerinin katı faz ekstraksiyonu ile likit kromatografi de tespit edilebilmesini sağlamıştır. WADA tarafından 2020 yılında en çok suiistimal edilen anabolik ajanlardan olan ve yasaklı madde olarak bildirilen testosteronun ester formları kanda çok düşük seviyelerde tespit edilebilmektedir. Bu bilinçle yöntemi geliştirirken tespit edebildiğimiz en düşük seviyelerde analiz gerçekleştirilerek basit, etkili ve rutin olarak kullanılacak bir yöntem olması konusunda azami önem gösterildi.

Yöntemimiz 2021/808/EU direktifine göre tarama metodu olarak valide edilmiş ve sonuçlar bulgular kısmında detaylıca paylaşılmıştır. Sonuç olarak doping kontrol laboratuvarları tarafından şu anda ilaç pazarında bulunan testosteron esterlerinin tespiti için kullanılabilecek bir yöntem geliştirilmiştir.

KAYNAKÇA

- Anabolik Ansiklopedisi.** (2020). Steroidlerin Algılanma ve Yarılanma Ömürleri Nedir ? [Erişim: 29.09.2022, <http://anabolikansiklopedisi.blogspot.com/2017/06/steroidlerin-algılanma-ve-yarılanma.html>]
- AORC.** (2015). AORC Ms Criteria (Modified 23.08.2016). *Association of Official Racing Chemists*. [Erişim: 02.10.2022, <https://www.aorc-online.org/documents/aorc-ms-criteria-modified-23-aug-16/aorc-ms-criteria-accepted-5-jan-2015-modified-23-aug-2016-final.pdf>]
- Arblester, C. I. & Blackman, G. L.** (1981). Drugs in sport. the extent of the problem, toxic effects, and control. *Australian family physician*, 10, 145-148.
- Ayotte, C.** (2009). Detecting the Administration of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids. D. Thieme ve P. Hemmersbach (Ed.), *Doping in Sports* içinde , Handbook of Experimental Pharmacology (C. 195, ss. 77-98). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4_4
- Behre, H. M. & Nieschlag, E.** (2012). Testosterone preparations for clinical use in males. E. Nieschlag, H. M. Behre ve S. Nieschlag (Ed.), *Testosterone* içinde (4. bs., ss. 309-335). Cambridge University Press. doi: <https://doi.org/10.1017/CBO9781139003353.016>
- Bonnaire, Y., Dehennin, L., Plou, P. & Toutain, P. L.** (1995). Testosterone Administration to Mares: Criteria for Detection of Testosterone Abuse by Analysis of Metabolites in Plasma and Urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 19(3), 175-181. doi: <https://doi.org/10.1093/jat/19.3.175>
- de la Torre, X., Iannone, M. & Botrè, F.** (2021). Improving the detection of anabolic steroid esters in human serum by LC–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 194, 113807. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113807>
- De La Torre, X., Segura, J., Polettini, A. & Montagna, M.** (1995). Detection of testosterone esters in human plasma. *Journal of Mass Spectrometry*, 30(10), 1393-1404. doi: <https://doi.org/10.1002/jms.1190301004>
- Eser, B. & Sepici Dinçel, A.** (2018). Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *Journal of Health Services and Education*, 2(2), 51-57. doi: <https://doi.org/10.26567/JOHSE.2018250150>
- European Commission-CRLs.** (2010). Guidelines For The Validation Of Screening Methods For Residues Of Veterinary Medicines. *Residues of veterinary medicinal products*.

Website. [Erişim: 19.11.2021, https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf]

Fidan, A. F. (2017). Bölüm 7: Doping. *SPOR ATLARI Genel Bilgi, Davranışlar, Egzersiz Fizyolojisi, Termoregülasyon, Antrenman, Besleme, Besin Katkıları, İlk Yardım ve Kurtarma, Doping içinde* (1. bs., ss. 122-125). Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti. <https://books.google.com.tr/books?id=jKoBDgAAQBAJ> adresinden erişildi.

Fisher, B. A. J., Tilstone, W. J. & Woytowicz, C. (2009). *Introduction to criminalistics: the foundation of forensic science*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press.

Forsdahl, G., Vatne, H. K., Geisendorfer, T. & Gmeiner, G. (2013). Screening of testosterone esters in human plasma: Screening of testosterone esters. *Drug Testing and Analysis*, 5(11-12), 826-833. doi: <https://doi.org/10.1002/dta.1560>

Forsdahl, Guro, Erceg, D., Geisendorfer, T., Turkalj, M., Plavec, D., Thevis, M., ... Gmeiner, G. (2015). Detection of testosterone esters in blood: Detection of testosterone esters in blood. *Drug Testing and Analysis*, 7(11-12), 983-989. doi: <https://doi.org/10.1002/dta.1914>

Göktaş, E. F. (2019). *Yarış Atlarının İdrar Örneklerinde Bazı İlaç Etkin Maddelerinin Eşzamanlı Analizleri İçin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ve/veya Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi İle Metot Geliştirilmesi ve Analitik Metot Validasyonu*. (Yayınlanmamış Doktora Tezi). Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Gray, B. P., Teale, P. & Pearce, C. M. (2011). Analysis of methyloxime derivatives of intact esters of testosterone and boldenone in equine plasma using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 3(4), 206-213. doi: <https://doi.org/10.1002/dta.237>

Harvard University. (2022). Harvard Center for Mass Spectrometry - Instrument Details. *Instrument Details*. [Erişim: 10.05.2022, <https://massspec.fas.harvard.edu/pages/instrumentss>]

He, C., Li, S., Liu, H., Li, K. & Liu, F. (2005). Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. *Journal of Chromatography A*, 1082(2), 143-149. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.065>

Hooijerink, D., Schilt, R., Bennekom, E. van & Brouwer, B. (1994). Determination of anabolic esters in oily formulations and plasma in husbandry using high-performance liquid

chromatography and gas chromatography–mass selective detection. *The Analyst*, 119(12), 2617-2622. doi: <https://doi.org/10.1039/AN9941902617>

İçen, A. (2013). *Doping ve doping analiz yöntemleri*. (Yayınlanmamış Bitirme Tezi). Erciyes Üniversitesi - Eczacılık Fakültesi, Kayseri.

IFHA. (2021). About IFHA. *International Federation of Horseracing Authorities (IFHA)*. [Erişim: 16.11.2022, <https://www.ifhaonline.org/default.asp?section=About%20IFHA&area=3>]

Jakobsson Schulze, J. (2007). *Genetics of androgen disposition: implications for doping tests*. Karolinska institutet, Stockholm.

Kaabia, Z., Dervilly-Pinel, G., Hanganu, F., Cesbron, N., Bichon, E., Popot, M. A., ... Le Bizec, B. (2013). Ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry based identification of steroid esters in serum and plasma: An efficient strategy to detect natural steroids abuse in breeding and racing animals. *Journal of Chromatography A*, 1284, 126-140. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.010>

Korenchevsky, V., Dennison, M. & Eldridge, M. (1937). Lxv. The prolonged treatment of castrated and ovariectomized rats with testosterone propionate. *Lister Institute, London*, 475-485.

Labmarker. (2022). HPLC Kolonlar. *Labmarker*. [Erişim: 10.05.2022, <https://labmarker.com/hplc-kolonlar/>]

Llewellyn, W. (2011). Esters and Injectable Compounds. *Anabolics* içinde (ss. 212-216).

Luetjens, C. M., Wistuba, J., Weinbauer, G. & Nieschlag, E. (2007). Exogenous Testosterone Alone. *The Leydig Cell as a Target for Male Contraception* içinde (ss. 415-442). New Jersey: Humana Press Inc.

Matraszek-Zuchowska, I., Wozniak, B., Sielska, K. & Posyniak, A. (2020). Determination of selected testosterone esters in blood serum of slaughter animals by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Steroids*, 163, 108723. doi: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108723>

Nguyen, B. T., Swerdloff, R., Wu, F. C. W. & Wang, C. (2018). Male Hormonal Contraception. *Encyclopedia of Endocrine Diseases* içinde (ss. 741-750). Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95922-1>

Nieschlag, E., Behre, H. M. & Nieschlag, S. (2010). Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction* içinde , Testosterone Therapy (ss. 441-446). Springer Science & Business Media.

Pope, H. G., Wood, R. I., Rogol, A., Nyberg, F., Bowers, L. & Bhasin, S. (2014). Adverse Health Consequences of Performance-Enhancing Drugs: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 35(3), 341-375. doi: <https://doi.org/10.1210/er.2013-1058>

Publications Office of the European Union. (2021). Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC (Text with EEA relevance), C/2021/1772. Website, Publications Office of the European Union. [Erişim: 20.11.2022, <http://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/3dc2b06b-b9cf-11eb-8aca-01aa75ed71a1/language-en>]

Resmî Gazete. (2011). 19 Nisan 2011 Tarihli ve 27910 Sayılı Resmî Gazete. *Başbakanlık Mevzuatı Geliřtirme ve Yayın Genel Müdürlüğü*. [Erişim: 19.11.2022, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110419-6.htm>]

Saudan, C. (2006). Testosterone and doping control. *British Journal of Sports Medicine*, 40(Supplement 1), i21-i24. doi: <https://doi.org/10.1136/bjism.2006.027482>

Sjöqvist, F., Garle, M. & Rane, A. (2008). Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. *The Lancet*, 371(9627), 1872-1882. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60801-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60801-6)

Stastny, K., Puteцова, K., Leva, L., Franek, M., Dvorak, P. & Faldyna, M. (2020). Profiling of Metabolomic Changes in Plasma and Urine of Pigs Caused by Illegal Administration of Testosterone Esters. *Metabolites*, 10(8), 307. doi: <https://doi.org/10.3390/metabo10080307>

Thieme, D. & Hemmersbach, P. (Ed.). (2010). *Doping in Sports*. Handbook of Experimental Pharmacology (C. 195). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4>

TOB-GKGM. (2018). Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi. *Tarım ve Orman Bakanlığı - Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü*. [Erişim: 20.01.2021,

https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehberi.pdf

Törnvall, E. (2010). *Determination of testosterone esters in serum by liquid chromatography – tandem mass spectrometry*. (Yayınlanmamış Bitirme Tezi). Linköping University, Institute of Technology, Sweden.

Van Renterghem, P., Viaene, W., Van Gansbeke, W., Barrabin, J., Iannone, M., Polet, M., ... Van Eenoo, P. (2020). Validation of an ultra-sensitive detection method for steroid esters in plasma for doping analysis using positive chemical ionization GC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 1141, 122026. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122026>

WADA. (2021). Anti-Doping Testing Figures Report. *World Anti-Doping Agency (WADA)*. [Erişim: 02.10.2022, https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_en.pdf]

WADA. (2022). The Prohibited List. *World Anti-Doping Agency (WADA)*. [Erişim: 22.11.2022, https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2022list_final_en_0.pdf]

You, Y., Uboh, C. E., Soma, L. R., Guan, F., Li, X., Liu, Y., ... Tsang, D. (2011). Simultaneous separation and determination of 16 testosterone and nandrolone esters in equine plasma using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for doping control. *Journal of Chromatography A*, 1218(26), 3982-3993. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.087>

Youden, W. J. & Steiner, E. H. (1997). *Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists* (8. printing.). Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.

Zhang, Z., Duan, H., Zhang, L., Chen, X., Liu, W. & Chen, G. (2009). Direct determination of anabolic steroids in pig urine by a new SPME–GC–MS method. *Talanta*, 78(3), 1083-1089. doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.01.022>