

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREEKLAMPSİ HASTALIĞININ ERKEN TANISINA YÖNELİK
HEDEFLENMİŞ METABOLOMİK ÇALIŞMALAR İÇİN GC-MS
YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

Ecz. Ayşe KUŞ KALE

Analitik Kimya Programı

Yüksek Lisans Tezi

ANKARA

2022

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREEKLAMPSİ HASTALIĞININ ERKEN TANISINA YÖNELİK HEDEFLENMİŞ
METABOLOMİK ÇALIŞMALAR İÇİN GC-MS YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

Ecz. Ayşe KUŞ KALE

Analitik Kimya Programı

Yüksek Lisans Tezi

TEZ DANILMANI

Prof. Dr. Sedef KIR

ANKARA

2022

ONAY SAYFASI

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

**Preeklampsi Hastalığının Erken Tanısına Yönelik Hedeflenmiş Metabolomik
Çalışmalar için GC-MS Yöntemi Geliştirilmesi**
Ecz. Ayşe KUŞ KALE

Bu çalışma 28/01/2022 tarihinde, jürimiz tarafından "Analitik Kimya Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Nursabah BAŞÇI AKDUMAN*
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Sedef KIR*
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: *Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER*
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: *Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ*
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: *Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU*
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

24 Şubat 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır. Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim. Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.

(1) o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir.

(2) o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

24 /02/2022

Ayşe KUŞ KALE

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü tezle ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanının Prof. Dr. Sedef KIR danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Ayşe KUŞ KALE

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam kapsamında bilgi ve birikimiyle yanımda olan, çalışmamın her aşamasını dikkatle takip edip yol gösteren, yalnızca öğrencisi olarak görmeyip her anlamda benimle ilgilenen Sayın Prof. Dr. Sedef KIR'a,

Çalışmalarım boyunca yol gösterici nitelikte bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya,

Tereddüte düştüğüm her anda yanımda olan, bütün tecrübelerini benimle paylaşan ve benim için sadece yüksek lisans döneminde değil her anlamda çok değerli olan Sevgili Ece ÖZKAN'a,

İşimle birlikte yüksek lisans sürecini yürütmeme destek olan Sevgili Emine VURAL, Ceren KILINÇ ve Ali YAPRAK'a,

Her zaman destekleri arkamda olan ve beni koşulsuz seven annem Sebihe KUŞ, babam Mahmut KUŞ, ablam Huriye METİN, kardeşim Raziye ALTUNBİLEK'e ve çok sevdiğim hayat arkadaşım, eşim Fatih KALE'ye ,

Tez çalışmalarım Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen 18586 no'lu proje desteği ile gerçekleştirilmiştir. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Gökçe ve Çağana,

ÖZET

Kuş Kale, A., Preeklampsi Hastalığının Erken Tanısına Yönelik Hedeflenmiş Metabolomik Çalışmalar için GC-MS Yöntemi Geliştirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Preeklampsi, insan gebeliğine özgü, nedeni bilinmeyen çok sistemli bir hastalıktır. Artan sistemik vasküler rezistans, artmış trombosit agregasyonu, pıhtılaşma sisteminin aktivasyonu ve endotelial disfonksiyon ile ilişkili yerleşime anormal vasküler tepki ile karakterizedir. Metabolomik, biyolojik bir sistemdeki tüm metabolitlerin geniş çaplı analizi olup sistemdeki daha düşük moleküler ağırlıklı analitlerin (<1800 Da) nicel değerlendirmesini ortaya koyduğundan transkriptomik ve proteomik analizlerini tamamlayıcı niteliktedir. Tez çalışmasında preeklampsi hastalığının erken tanısında ayırıcı olduğu düşünülen 2-hidroksi bütirik asit, piroglutamik asit, glutamik asit, 4-hidroksi glutamik asit, N-asetil L-glutamik asit ve N-karbamil L-glutamik asit seçilmiştir. Söz konusu metabolitlerin analizleri %5 difenil %95 dimetilpolisiloksan (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm) kapiler kolon ile 60°C (1 dk), 10° C/dk ile 200°C sonra 30°C/dk ile 320°C (5 dk) fırın sıcaklık programında, hareketli faz olarak helyum ve akış hızı 0,99 mL/dk ve iç standart olarak miristik asit-d27 kullanılarak GC-MS yöntemi ile yapılmıştır. Geliştirilen yöntem, özgünlük, doğrusalılık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık, kararlılık ve sistem uygunluk parametreleri değerlendirilerek valide edilmiştir. Geliştirilen ve valide edilen yöntem boş plazmaya uygulanarak ortalama geri kazanım değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Preeklampsi metabolitleri, Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi, Metabolomiks

ABSTRACT

Kus Kale., Development of GC-MS Method for Targeted Metabolomic Studies for Early Diagnosis of Preeclampsia Disease. Hacettepe University Graduate School Health Sciences, Analytical Chemistry Program, Master's Thesis, Ankara, 2022.

Preeclampsia is a multisystem disease specific to human pregnancy with an unknown cause. It is characterized by increased systemic vascular resistance, increased platelet aggregation, activation of the coagulation system, and abnormal vascular response to localization associated with endothelial dysfunction. Metabolomics is the broad analysis of all metabolites in a biological system and is complementary to transcriptomic and proteomic analyzes as it provides a quantitative assessment of lower molecular weight analytes (<1800 Da) in the system. In the thesis study, 2-hydroxy butyric acid, pyroglutamic acid, glutamic acid, 4-hydroxy glutamic acid, N-acetyl L-glutamic acid and N-carbamyl L-glutmic acid, which are thought to be differential in the early diagnosis of preeclampsia, were selected. The analyzes of these metabolites are 5% diphenyl 95% dimethylpolysiloxane (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) with capillary column at 60 °C (1 min), at 10 °C/min at 200 °C after 30 °C/min at 320 It was made by GC-MS method using helium as mobile phase, flow rate of 0.99 mL/min and myristic acid-d27 as internal standard, in the oven temperature program at oC (5 min). Developed method was validated by parameters of stability, selectivity, linearity, sensitivity, accuracy, precision, robustness and system suitability. The mean recovery was evaluated by applying the developed and validated method to blank plasma.

Keywords: Preeclampsia metabolites, Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Metabolomics

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xviii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.Preeklampsi	2
2.2. Metabolomik Analizler	5
2.3. Metabolitler	8
2.3.1. 2-hidroksi bütirik asit (2-HB)	8
2.3.2. Piroglutamik asit (PGA)	8
2.3.3. Glutamik asit (GA)	9
2.3.4. 4-hidroksi glutamik asit (4-OHGA)	11
2.3.5. N-asetil L-glutamik asit (NAGA)	11

2.3.6. N-karbamil L-glutamik asit (NCGA)	11
2.4. Seçilen Metabolitlerin Gaz Kromatografisi ile Analizleri	13
2.5. Kromatografi	17
2.5.1. Kromatografi Türleri	17
2.5.2. Kromatografik Parametreler	18
2.6. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS)	24
2.6.1. Gaz Kromatografisi	25
2.6.2. Kütle Spektroskopisi	35
2.6.3. Türevlendirme Teknikleri	40
2.6.4. Sistem Uygunluk Testi (SUT)	44
2.6.5. Analitik Yöntem Validasyonu	44
3. DENEYSEL KISIM	49
3.1. Kullanılan Cihazlar	49
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	49
3.3. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler	50
3.4. Stok Çözeltilerin Hazırlanması	50
3.5. Analiz Yöntemi	52
3.5.1 Türevlendirme	52
3.5.2. Kromatografik Koşullar	52
3.6. Sistem Uygunluk Testi (SUT)	53
3.7. Yöntem Validasyonu	53
3.7.1. Kararlılık	53

3.7.2. Özgünlük (Seçicilik)	54
3.7.3. Doğrusallık	54
3.7.4. Duyarlılık (Gözlenebilme ve Tayin Alt Sınırı)	54
3.7.5. Doğruluk	54
3.7.6. Kesinlik	55
3.7.7. Sağlamlık	55
3.7.8 Taşınma	55
3.7.9. Geri kazanım	56
4. BULGULAR	57
4.1. Analiz Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları	57
4.1.1. Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu	58
4.1.2. Kromatografik Yöntem Koşullarının Optimizasyonu	62
4.2. Sistem Uygunluk Testi	65
4.3. Analiz Yönteminin Validasyonu	66
5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	89
7. KAYNAKLAR	91
8. EKLER	
EK 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
EK 2.Orjinallik Ekran Çıktısı	
EK 3. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

2-HB	2-hidroksi bütirik asit
α	Seçicilik
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit reseptörü
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifloroasetamid
4-OHGA	4-hidroksi glutamik asit
BH	Bağlı hata
BSS	Bağlı standart sapma
CE	Kapiler elektroforez
CI	Kimyasal iyonizasyon
C_M	Hareketli fazdaki madde derişimi
C_s	Sabit faz derişimi
DB-5MS	%5 difenil çapraz bağlı %95 dimetilpolisiloksan
DC	Doğru akım
ECD	Elektron yakalama dedektörü
EI	Elektron iyonizasyon
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
F	Akış hızı
FID	Alev iyonizasyon dedektörü
FPD	Alev fotometrik dedektörü
FT-ICR MS	İyon siklotron rezonans

İTK	İnce tabaka kromatografisi
GA	Glutamik asit
GC	Gaz kromatografisi
GLC	Gaz-sıvı kromatografisi
GSC	Gaz-katı kromatografisi
H	Tabaka yüksekliği
H₂	Hidrojen
He	Helyum
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
K	Dağılım katsayısı
k'	Kapasite faktörü
L	Kolon uzunluğu
LC	Sıvı kromatografisi
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOG P	Partisyon katsayısı
LLOQ	Tayin alt sınırı
MBTFA	N-metilbis(trifluoroasetamit)
MeOX	Metoksiamin hidroklorür
MS	Kütle spektroskopisi
MSA	Magnetik sektör analizörü
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifloroasetamit
MBSTFA	N- metil -N-tert-bütilldimetilsililtrifloroasetamit

N	Teorik tabaka sayısı
N₂	Azot
NAGA	N-asetil L-glutamik asit
NCGA	N-karbamil L-glutamik asit
NMDA	N-metil-D-aspartik asit
NMR	Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
NPD	Nitrojen fosfor dedektörü
PAO	Pik asimetri oranı
PFTBA	Perfluorotribütil amin
PFPA	Pentafluoropropiyonik anhidrit
PGA	Piroglutamik asit
PID	Fotoiyonizasyon dedektörü
PLOT	Gözenekli katmanlı açık kapiler
RF	Radyo frekans
Rs	Ayırıcılık
S/G	Sinyal/Gürültü
SCOT	Destek kaplı açık kapiler
SS	Standart sapma
TFA	Trifluoroasetik asit anhidriti
TMCS	Trimetilsilil klorür
TMS	Trimetilsilil
V_M	Hareketli faz hacmi

V_S	Sabit faz hacmi
V_R	Alkonma hacmi
t_R	Alıkonma zamanı
t₀	Ölü zaman
TCD	Termal iletkenlik dedektörü
TOF	Uçuş zamanlı
u	Çizgisel hız
US FDA	Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu
w	Pik yüksekliğinin % 10'undaki pik taban genişliği
w_{1/2}	Pik yüksekliğinin yarısındaki pik taban genişliği
WCOT	Çeperi kaplı açık kapiler kolon
Q	Kuadrupol analizör
QSTAR	İyon Kapanı Kütle Analizörü
\bar{x}	Ortalama

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1	Genomdan proteoma hücre içerisinde ilgili moleküllerin sayıları	6
2.2.	N-terminal glutaminden piroglutamik asit oluşumu.	9
2.3.	Glutamik asit biyosentezi.	10
2.4.	Glutamik asit dehidrojenaz tepkimesi.	10
2.5.	Tek bir maddeye ait ölü zaman(t_0) ve alıkonma zamanı (t_R).	18
2.6.	Van Deemter eğrisi.	21
2.7.	Kromatografik ayırıcılık.	21
2.8.	Seçiciliğin ve kapasite faktörünün ayırıcılığa etkisi.	22
2.9.	Elüsyon izotermeleri ve pik şekilleri.	23
2.10.	Pik asimetri oranının hesaplanması.	23
2.11.	Gaz kromatografisi cihazının temel kısımları.	26
2.12.	Taşıyıcı gazların Van Deemter eğrileri.	27
2.13.	Bölmeli enjeksiyon bloğu.	28
2.14.	Bölmesiz enjeksiyon bloğu.	29
2.15.	Destek kaplı açık tübüler kolon.	31
2.16.	Çeperi kaplı açık kapiler kolon.	32
2.17.	Gözenekli katmanlı açık kapiler kolon.	32
2.18.	Kütle spektrometresinin temel kısımları.	35
2.19.	Elektron iyonizasyon (EI) kaynağı şematik gösterimi.	37
2.20.	Kuadrupol analizörünün şematik gösterimi.	39
4.1.	Otomatik ayar çıktı örneği.	57

4.2.	Metabolitler ve iç standardın trimetilsilil türevlerine ait kütle spektrumları.	60
4.3.	MSTFA + %1 TMCS hacminin pik alanı oranına etkisi.	61
4.4.	Metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisinin türevlendirmeye etkisi.	62
4.5.	Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile analizine ait kromatogram.	68
4.6.	Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri.	69
4.7.	Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile elde edilen doğrusallık kontrol grafikleri.	70

TABLULAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Metabolitlerin moleküler özellikleri.	12
2.2.	Seçilen metabolitlere ait kaynaklarda yer alan GC ile yapılan analiz yöntemleri.	14
2.3.	Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.	17
2.4.	GC'de kullanılan kolon türleri: Dolgu kolonlar ve kapiler kolonlar.	30
2.5.	Kütle analizörlerinin özellikleri.	38
2.6.	PFTBA molekülünün parçalanması ile oluşan iyonlarının bağlı bollukları.	40
2.7.	Türevlendirme reaktifleri.	43
2.8.	SUT için geçerli parametreler ve sınır değerleri.	44
4.1.	Türevlendirilmiş metabolitlere ait bilgiler (m/z) (n=10).	58
4.2.	MSTFA + %1 TMCS ile türevlendirmede sıcaklık ve sürenin optimizasyonu.	59
4.3.	Fırın sıcaklık programlarının koşulları.	63
4.4.	Farklı fırın sıcaklık programlarında sistem uygunluk parametreleri.	64
4.5.	Akış hızı değişikliklerindeki teorik tabaka sayısı (N) ve teorik tabaka yüksekliği (H) değerleri.	65
4.6.	Sistem uygunluk testi bulguları.	66
4.7.	Kararlılık testi sonuçları (n=3).	67
4.8.	Metabolitlerin GC-MS yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrileri.	71
4.9.	Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile elde edilen doğrusallık kontrol grafikleri.	72
4.10.	Duyarlılık testi sonuçları (n=6).	73

4.11.	Gün içi kesinlik ve doğruluk verileri (n=6).	74
4.12.	Günler arası kesinlik ve doğruluk verileri (n=6).	75
4.13.	Enjeksiyon tekrarlanabilirliği verileri (40 µg/mL) (n=10).	76
4.14.	Tutarlılık çalışmalarına ait bulgular (10 µg/mL).	77
4.15.	Tutarlılık çalışmalarına ait bulgular (60 µg/mL) (n=6).	78
4.16.	Sağlamlık çalışmalarına ait bulgular (n=3).	80
4.17.	Ortalama geri kazanım değerleri (n=3).	81

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Gebelik, kadınlar için fizyolojik olayların yaşandığı doğal bir süreç olsa da gebelik komplikasyonlarının gelişmesi, zamanında ve uygun müdahale edilememesine bağlı olarak birçok gebe hayatını kaybetmektedir. Preeklampsi artan sistemik vasküler rezistans, artmış trombosit agregasyonu, pıhtılaşma sisteminin aktivasyonu ve endotelial disfonksiyon ile ilişkili yerleşime anormal vasküler tepki ile karakterize olup nedeni bilinmeyen çok sistemli bir hastalıktır. Preeklampsinin klinik bulguları maternal veya fetal sendrom şeklinde kendini gösterebilir. Dünya çapında anne ölümleri nedenleri arasında ilk üç sırada yer alan preeklampsi, ülkemizde ise ikinci sırada yer almaktadır. Ancak hastalığın uygun yönetiminin sağlanması ile maternal morbidite ve mortalite oranları azaltılabilmektedir.

Metabolomik; dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda ortaya çıkan metabolom içindeki metabolitlerin miktar ve değişimlerinin yüksek verimli teknolojilerle eş zamanlı, kapsamlı ve sistematik olarak belirlenmesidir. Omik analizlerin en yenisi olan metabolomik analizler sayesinde hastalıkların erken teşhisi yapılarak kişiye özgü tedavi planlanabilmektedir.

Tez çalışmasında, kaynak araştırmalarında preeklampsi hastalığının erken teşhisinde ayırıcı olabileceği düşünülen 2-hidroksi bütirik asit, piroglutamik asit, glutamik asit, 4-hidroksi glutamik asit, N-asetil L-glutamik asit ve N-karbamil L-glutamik asit metabolitleri seçilerek hedeflenmiş metabolomik çalışmaların gerçekleştirilebilmesine yönelik olarak bu metabolitlerin bir arada analizlerinin sağlanabilmesi için GC-MS yönteminin geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin plazma numunelerine uygulanmak amacıyla valide edilmesi planlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.PREEKLAMPSİ

Kadınlar için gebelik, fizyolojik olayların yaşandığı doğal bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Fakat birçok gebe, gebelik komplikasyonlarının gelişmesine, zamanında ve uygun müdahale edilememesine bağlı olarak hayatını kaybetmektedir (1-2). Preeklampsi, insan gebeliğine özgü, nedeni bilinmeyen çok sistemli bir hastalıktır. Artan sistemik vasküler rezistans, artmış trombosit agregasyonu, pıhtılaşma sisteminin aktivasyonu ve endotelial disfonksiyon ile ilişkili yerleşime anormal vasküler tepki ile karakterizedir. Preeklampsinin klinik bulguları maternal sendrom (diğer multisistem anomalileri olan veya olmayan hipertansiyon ve proteinüri) veya fetal sendrom (fetal büyüme kısıtlaması, azaltılmış amniyotik sıvı ve anormal oksijenasyon) şeklinde kendini gösterebilir (3-4). Gebelikte hipertansif hastalıklar arasında yer alan preeklampsi, dünya çapında anne ölümleri nedenleri arasında ilk üç sırada yer alırken ülkemizde ise ikinci sıradadır (5-6) . Fakat preeklampsinin uygun yönetimi ile maternal morbidite ve mortalite oranları önlenmektedir (1,7,8).

Gebelikte Hipertansif Hastalıkların Sınıflandırılması

Amerikan Kadın Doğum Uzmanları ve Jinekologlar Komitesi tarafından benimsenen sınıflama aşağıda verilmiştir:

1. Kronik Hipertansiyon: Gebelikten önce kan basıncının 140/90 mmHg'nın üzerinde olması, gebeliğin yirminci haftasından sonra tansiyonun bu değerlerin üzerine çıkması ve durumun doğumdan altı hafta sonrasına kadar devam etmesidir (9).

2. Kronik Hipertansiyona Preeklampsi Eklenmesi: Kronik hipertansiyon tanısı konmuş bir gebede yirminci gebelik haftasından sonra kan basıncının yükselmesi ve aynı anda proteinürinin gözlemlenmesidir (9).

3. Gebeliğin Neden Olduğu Hipertansiyon: Gebeliğin yirminci haftasından sonra 6 saat aralarla yapılan ölçümlerde kan basıncının en az iki kez 140/90 mmHg' ya eşit ya da bu değerden yüksek olması ve yirmi dört saatlik idrarda proteinürinin 300 mg'ın altında olmasıdır (10).

Gestasyonel hipertansiyon gebelikteki hipertansiyonun en yaygın nedenidir. Gestasyonel hipertansiyon preeklampsi ve eklampsi olarak iki aşamalı olarak görülmektedir.

4. Preeklampsi-Eklampsi: Preeklampsi daha önceden normotansif olan kadınlarda yirminci gebelik haftasından sonra gelişen hipertansiyon ve proteinüri ile görülen tablodur (11). Eklampsi, gebeliğin akut ve yaşamı tehdit edici komplikasyonlarından biridir. Nöbet genellikle şiddetli eklampsi tablosunda tonik klonik kasılmalarla aniden ortaya çıkar; arkasından koma görülebilir. Ayrıca hipertansiyon öyküsü olmaksızın aniden eklampsi krizine giren gebeler de bildirilmiştir.

Preeklampsi ve eklampsi gebeliğin yirminci haftasından sonra görülebildiği gibi doğumdan sonraki dört hafta içinde de karşımıza çıkabilir. En riskli dönem doğumu takip eden ilk 15 gündür. Eklamptik nöbetlerin %38'i gebelikte, %18'i doğum esnasında ve %44'ü doğumdan sonra ortaya çıkmaktadır (12,13).

Preeklampsi ve Eklampsinin Klinik Sınıflaması ve Klinik Tanısı

Gebeliğin yirminci haftasından sonra ortaya çıkan, hipertansiyon, ödem ve proteinüri ile karakterize olan preeklampsinin klinik sınıflamasında başlıca üç durum bulunmaktadır.

- **Hafif Preeklampsi:** Kan basıncının sistolik 140 mmHg'nin üzerinde ve diastolik kan basıncının 90 mmHg'nin üzerinde bulunması söz konusudur. Hastalığın tanısı altı saat aralıkla iki ölçümde aynı değerlerin elde edilmesi ile konulur. Böbreklerdeki patolojik değişikliklere bağlı olarak proteinüri vardır, idrar miktarında azalmayla birlikte klinik olarak ödem başlamış ve hasta fazla kilo almıştır.

• **Şiddetli Preeklampsi:** Kan basıncı değerleri sistolik 160 mmHg'nın, diastolik 110 mmHg'nın üzerindedir. Masif proteinüri ve yaygın ödem vardır. Artan ödem nedeniyle hasta, aşırı kilo aldığını, yüzüklerini çıkaramadığını, ayakkabılarını giyemediğini anlatır. Hasta bilinç bulanıklığından söz edebilir, bazen genel durum bozukluğu, konfüzyon hastanın yakınları tarafından anlaşılır. Tabloya bulantı ve kusmalar da eşlik edebilir. Klinik durumun ağırlaşması sonucu eklampitik nöbetler ortaya çıkar (12).

Preeklampsi erken devrede saptanıp tedavi edilmediği takdirde ilerler. Preeklampsinin ilerlediğini gösteren belirtiler merkezi sinir sistemi ile ilişkili olup bunlar baş dönmesi, baş ağrısı, huzursuzluk, endişe, bulantı, kusma ve görme bozukluklarıdır. Eklampside ise konvüzyon ve koma görülür (14).

Preeklampside tanı kriterleri: Preeklampsi hafif preeklampside eklampsiye doğru ilerleyen bir süreçtir.

A. Hafif Preeklampside Tanı Kriterleri

- Sistolik kan basıncının 140 mmHg ve üzeri, diastolik kan basıncının 90 mmHg ve üzeri değerlerde olması ve ortalama arteriyel basıncında 20 mmHg artış olması.
- 24 saatlik idrarda proteinürinin 0.3 g'dan fazla olması.
- Ödem olması.
- Geici ya da hafif şiddette baş ağrısı görülmesi.
- Geçici irritabilite.

B. Şiddetli Preeklampsi Tanı Kriterleri

- İstirahat halinde en az altı saat arayla iki kez ölçülen kan basıncı değerinin sistolik 160 mmHg veya diastolik kan basıncının 110 mmHg olması.
- 24 saatlik idrarda 5 g'dan fazla proteinürü olması.
- 24 saatlik idrar çıkışının 400 mL'den az olması veya serum kreatinin seviyesinin 1- 2 mg/dL'den yüksek olması (oligüri).
- Baş ağrısının sürekli ve ciddi olması.

- Bulanık/ fotofobi gibi görme problemlerinin olması.
- Epigastrik veya sağ üst kadranda ağrı olması.
- Karaciğer fonksiyonlarında bozulma.
- Trombositopeni olması (15).

Preeklampsinin Önlenmesi ve Yönetimi: Günümüzde, gebeliğin erken döneminde riskleri güvenilir şekilde saptayabilecek tarama testlerinin ve preeklampsiyi önlemeye yönelik kanıta dayalı kesin stratejilerin bulunmaması etkin preeklampsi yönetimini kısıtlamaktadır (16).

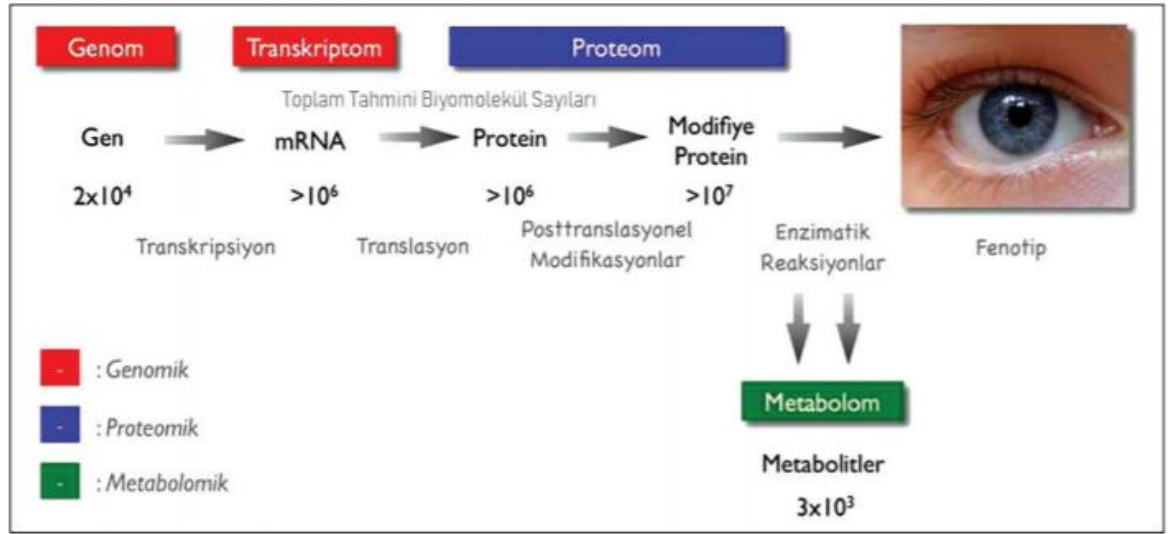
Preeklampside Tedavi Seçenekleri: Preeklampsinin fizyopatolojisi tam olarak bilinmediğinden etkili bir tedavi yöntemi bulunmamakta olup kesin tedavi yöntemi doğumdur. Öncelikli hedef gebenin güvenliğinin sağlanmasıdır (17,18).

Preeklampside tedavi yaklaşımları; aktivitelerin kısıtlanması, yeterli diyetin sağlanması, fetüs hareketlerinin kontrolü ve magnezyum sülfat tedavisini içermektedir (19).

2.2. Metabolomik Analizler

Günümüz teknolojileri ile genomik, proteomik, transkriptomik ve metabolomik (omiks) analizlerle hastalıkların mekanizması açıklanabilir, erken tanısını konulur, hastalıkların etiyolojik süreçleri hakkında bilgi edinilebilir ve kişiye özgü tedaviler uygulanabilmektedir. Bu yöntemler spesifik bozuklukların önemli biyolojik proseslerinin de belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Şekil 2.1) (20,21).

Omik teknolojilerin en yenisi metabolomik analizlerdir. Metabolomik, biyolojik bir sistemdeki tüm metabolitlerin geniş çaplı analizi olduğundan sistemdeki daha düşük moleküler ağırlıklı analitlerin (<1800 Da) nicel değerlendirmesini ortaya koyduğundan transkriptomik ve proteomik analizleri tamamlayıcı niteliktedir. Bir hastalık oluşum mekanizmasının aydınlatılmasında genom veya proteom çalışmalarının yeterli olmadığı, metabolomik çalışmaları da içeren değerlendirmelerin daha doğru sonuçlar verdiği görülmüştür (22).



Şekil 2.1. Genomdan proteoma hücre içerisinde ilgili moleküllerin sayıları (20).

Aşağıda omik çalışmalarda kullanılan bazı kavramlara yer verilmiştir:

Genom: Bir organizmanın kromozomlarında bulunan genetik bilginin bütünüdür. Genomik; bir canlının bütün yapısal ve işlevsel fonksiyonlarını kodlayan tüm genlerini birer birer tanımlayarak söz konusu genlerin etkileşimlerini ve çevre ile iletişimlerini, zaman, yer ve miktar olarak üretim ve aktivasyonlarının kontrolünü bütünsel olarak inceleyen bir bilim dalıdır (23).

Transkriptom: Belli bir zamanda bir hücre veya dokudaki gen transkriptlerinin (RNA) tümünü ifade eder. Transkriptomik; hücre genomundan transkripsiyonla oluşan mRNA transkriptlerinin eş zamanlı incelenmesidir (24).

Proteom: Bir organizmanın sahip olduğu tüm proteinlerdir. Proteomik; bu proteinlerin yapılarını, miktarlarını, çevrim sonrası değişimleri, doku ve hücrelerdeki işlevlerini, diğer proteinlerle ve makro moleküllerle olan etkileşimini aydınlatır (25).

Metabolom: Bir hücre veya canlı içerisindeki küçük moleküllü metabolitlerin tamamını ifade eder.

Metabolit: Biyokimyasal reaksiyonlarda ara ürün olarak yer alan ve hücre içerisinde gerçekleşen birçok metabolik yolda bulunan ya da ortaya çıkabilen

kimyasal moleküllerdir. Molekül ağırlıkları 50-1500 Dalton arasındaki bu küçük moleküllerden bazıları, peptitler, oligonükleotidler, nükleozitler, ketonlar, aminler, aldehitler, amino asitler, lipitler, karbonhidratlar, organik asitler, steroidler ve alkaloidlerdir (26).

Metabolomik: Dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda ortaya çıkan metabolitlerin miktar ve değişimlerinin analitik yöntemlerle eş zamanlı, kapsamlı ve sistematik olarak belirlenmesidir.

Metabolomik profileme: Bir biyokimyasal süreçteki metabolitlerin hepsi ya da bir grubunun nicel analizini olarak tanımlanmaktadır. Bu analiz sınırlı sayıda metabolitlerin analizini içerir.

Metabolik parmak izi: Belirli bir numune içindeki metabolit grubunun toplam analizidir ve bireysel bilgiler içeren bu analiz sonrası oluşan tablonun adına denir.

Metabolik ayak izi: Hücreler tarafından metabolit atılımı veya alımının bir yansıması olarak hücre kültür ortamında, hücre dışı metabolitlerin 'metabolik ayak izi analizi' şeklinde tanımlanmıştır (27-29).

Metabolik analiz, hedeflenmemiş ve hedeflenmiş olarak sınıflandırılır. Hedeflenen yaklaşım, bir enzimin substratları, bir proteinin doğrudan ürünleri, belirli bir bileşik sınıfı gibi seçilmiş metabolitlerin (veya metabolit sınıflarının) tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesine odaklanır. Hedeflenmemiş analizde ise miktar tayini yapılmaksızın numunede yer alan bütün metabolit analizlerin ölçümü gerçekleştirilebilir (30).

Metabolitlerin hedeflenen analizleri için gaz ve sıvı kromatografisi gibi kromatografik yöntemler ile diğer ayırma tekniklerinden kapiler elektroforezin kütle spektrometrisi ile birlikte kullanıldığı kombine sistemler kullanılabilirken hedeflenmemiş analizler için nükleer manyetik rezonans spektroskopisinin de kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (31).

Metabolitler ile yapılan araştırmalar ile kişiye ya da hastalığa özgü tedavi yöntemleri belirlenebilmektedir. Son yıllarda metabolomik analizler ile özellikle çeşitli

kanser hastalıklarının tanısı ve tedavisi amacıyla farklılaşan metabolitlerin belirlendiği; belirlenen metabolitlerin biyobelirteç olarak önerildiği ve klinikte kullanılmakta olduğu görülmektedir. Biyobelirteçler vücut sıvılarında belirlenen spesifik bir süreci veya hastalığı belirten maddeler olduğundan; bu çalışmaların insan sağlığına katkıları büyük önem taşımaktadır (32-33).

2.3. Metabolitler

Bu tez çalışmasında, preeklampsinin erken teşhisinde kaynaklarda rastlanan ve önerilmesi planlanan 2-hidroksi bütirik asit, piroglutamik asit, glutamik asit, 4-hidroksi L-glutamik asit, N-asetil L- glutamik asit ve N- karbamil L-glutamik asit metabolitleri hedeflenmiştir.

2.3.1. 2-hidroksi bütirik asit (2-HB)

2-HB, α -ketobütirattan türetilen bir organik asittir. 2-HB'nin IUPAC tarafından yapılan adlandırılması, molekül formülü ve yapısı, molekül ağırlığı ve bazı fiziksel özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

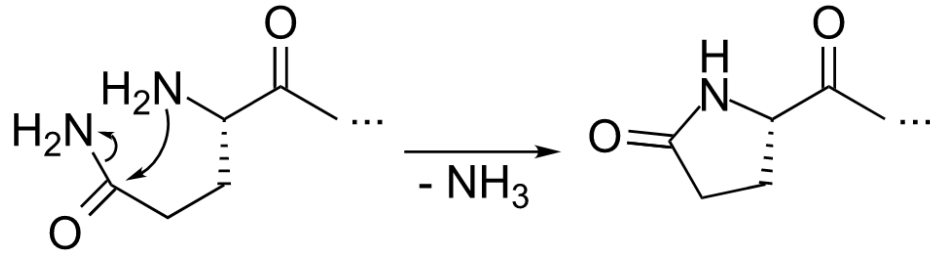
2-HB, treonin katabolize eden veya glutatyon sentezleyen memeli karaciğer dokuları içinde oluşur. Oksidatif strese ya da detoksifikasyona uğrayan karaciğerdeki ksenobiyotikler, glutatyon sentezininin ciddi derecede artmasına neden olabilir. İnsülin direnci, oksidatif stres nedeniyle ortaya çıkan bozulmuş glukoz toleransı ve lipid oksidasyonunun arttığı durumlar için 2-HB erken bir biyobelirteçtir. Laktik asidozu ve keto asidozu olan hastalarının idrarında görülür. Enerji metabolizmasının yetersiz olduğu durumlarda vücuttaki derişimi artar (34).

2.3.2. Piroglutamik asit (PGA)

PGA, L-glutamik asidin halkalı bir türevidir. Glutamik asidin serbest amino grubunun bir laktam oluşturmak üzere siklize olduğu nadir bir amino asit türevidir. Glutamat, glutamin ve gama-glutamilenmiş peptitlerden enzimatik olmayan bir şekilde oluşturulur, ancak gama-glutamil siklotransferazın bir L-amino asit üzerindeki etkisiyle de üretilebilir. Şekil 2.2'de N-terminal glutaminden piroglutamik asit

oluşumu gösterilmektedir. PGA'nın yüksek kan seviyeleri, glutamin veya glutatyon metabolizması sorunları ile ilişkili olabilir (35).

PGA'nın IUPAC tarafından yapılan adlandırılması, molekül formülü ve yapısı, molekül ağırlığı ve bazı fiziksel özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

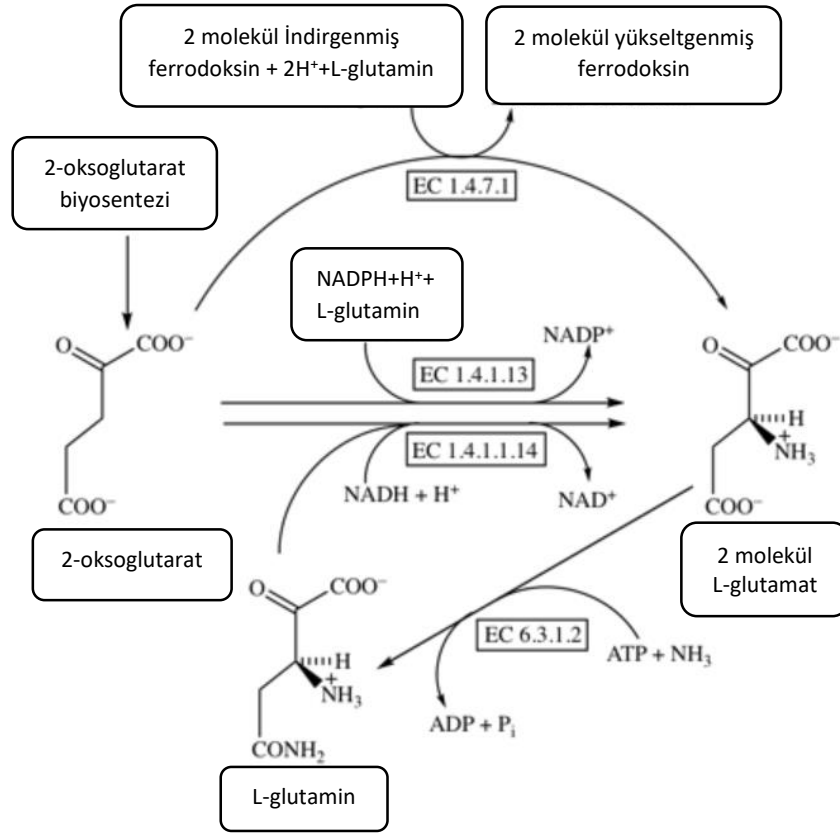


Şekil 2.2. N-terminal glutaminden piroglutamik asit oluşumu.

2.3.3. Glutamik asit (GA)

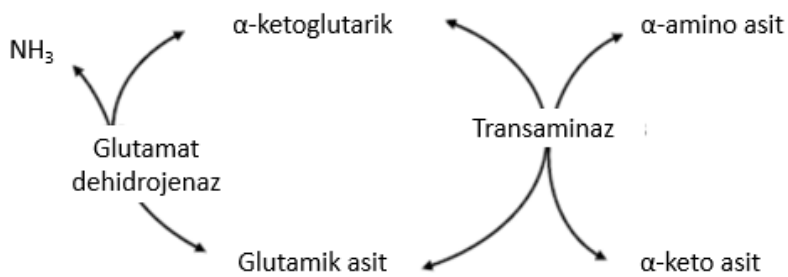
Glutamat, glutamik asidin anyonudur ve nörotransmitter olarak tüm uyarıcı fonksiyonlarda görev alır (36). Sinaptik plastisitedeki rolü sebebiyle glutamat öğrenme ve hafıza gibi bilişsel işlevlerde de görev alır. Şekil 2.3'de glutamat biyosentezine yer verilmiştir (37).

GA'nın IUPAC tarafından yapılan adlandırılması, molekül formülü ve yapısı, molekül ağırlığı ve bazı fiziksel özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Glutamik asit biyosentezi (37).

Aminoasitlerden transaminasyon reaksiyonu ile azotun uzaklaştırılması döngüsünde, glutamat dehidrojenaz reaksiyonu yer almaktadır (Şekil 2.4). Amin grubunun tek bir aminoaside yönlendirilmesi transaminasyon reaksiyonu ile gerçekleşir. Çift substratlı ve çift yönlü olan bu reaksiyona bir aminoasit ve α -keto asit katılmasıyla aminoaside ait amin grubu α -keto aside aktarılır böylece GA ile bir α -keto asit oluşur. Transaminasyon GA oluşumu ile sonlanır (38).



Şekil 2.4. Glutamik asit dehidrojenaz tepkimesi (38).

2.3.4. 4-hidroksi L- glutamik asit (4-OHGA)

4-OHGA, GA ve türevleri olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. GA ve türevleri, amino grubu veya karboksi grubundaki GA reaksiyonundan veya glisinin herhangi bir hidrojeninin bir heteroatom ile yer değiştirmesinden oluşmaktadır (39).

İnsanlarda 4-OHGA, arginin, glisin amidinotransferaz eksikliği (agat eksikliği) yolu adı verilen metabolik bozuklukta rol oynar. 4-OHGA, birincil bir metabolittir. Birincil metabolitler, metabolik veya fizyolojik olarak gerekli metabolitlerdir. Bir organizmanın büyümesine, gelişmesine veya üremesine doğrudan katılırlar (35).

4-OHGA'nın IUPAC tarafından yapılan adlandırılması, molekül formülü ve yapısı, molekül ağırlığı ve bazı fiziksel özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

2.3.5. N-asetil-L-glutamik asit (NAGA)

NAGA, N-açıl-alfa amino asitler olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. N-açıl-alfa amino asitler, terminal nitrojen atomunda bir açıl grubu taşıyan bir alfa amino asit içeren bileşiklerdir. NAGA, proteinojenik alfa amino asit L-glutaminin biyolojik olarak temin edilebilen N-terminal başlıklı bir şeklidir. N-asetil amino asitler, spesifik N-asetil transferazların doğrudan sentezi yoluyla veya N-asetillenmiş proteinlerin spesifik hidrolazlar tarafından proteolitik bozunması yoluyla üretilebilir (40).

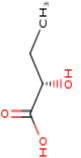
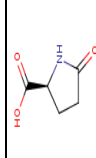

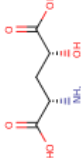
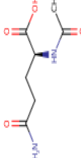
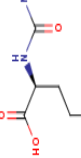
NAGA'nın IUPAC tarafından yapılan adlandırılması, molekül formülü ve yapısı, molekül ağırlığı ve bazı fiziksel özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

2.3.6. N-karbamil-L-glutamik asit (NCGA)

NCGA, karglumik asit olarak da adlandırılır, GA ve türevleri olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Günlük NCGA dozu 100 ila 250 mg/kg arasında olup bu miktar plazma amonyak seviyelerini korumaktadır. Bu enzim, kanda nörotoksik amonyum birikmesini önlemek için üre döngüsünün önemli bir bileşenidir (35,41).

NCGA'nın IUPAC tarafından yapılan adlandırılması, molekül formülü ve yapısı, molekül ağırlığı ve bazı fiziksel özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Metabolitlerin moleküler özellikleri.

Maddeler	IUPAC adı	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı (g mol ⁻¹)	pKa	Log P (g/L)	Polarizasyon değeri (A ³)	Sudaki çözünürlüğü (mg/mL)	Erime noktası (°C)	Molekül yapısı
2-HB	(S)-2-Hydroxybutanoic acid	C ₄ H ₈ O ₃	104,10	3,99	0,05	9,98	484,00	44,20	
PGA	(-)-2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid	C ₅ H ₇ NO ₃	129,11	3,61	10 ⁽⁻¹⁾	11,56	151	-	
GA	(S)-2-Aminopentanedioic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	147,13	2,15	10 ^(-3;2)	13,87	97,8	185	
4-OHGA	(2S,4R)-2-Amino-4-hydroxypentanedioic acid	C ₅ H ₉ NO ₅	163,13	1,68	10 ^(-4;2)	14,01	565	-	
NAGA	(2S)-2-Acetamido-5-oxopentanoic acid	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₄	188,18	3,76	10 ^(-2;2)	17,44	21,9	197	
NCGA	(2S)-2-(Carbamoylamino)pentanedioic acid	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₅	190,154	3,36	10 ^(-1;4)	16,79	19,1	-	

2.4. Seçilen Metabolitlerin Gaz Kromatografisi (GC) ile Analizleri

Tez kapsamında preeklampsinin tanısı için kaynaklarda önerilmekte olan metabolitlerden seçilmiş olan altı metabolitin GC ile yapılan analizleri incelenmiştir(Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Seçilen metabolitlere ait kaynaklarda yer alan GC ile yapılan analiz yöntemleri.

Metabolit	Analitik Kolon	Hareketli Faz/Akış Hızı (mL/dk)	Türevlendirme	Fırın Sıcaklık Programı	Enjeksiyon Türü ve Oranı	Detektör ve İyonizasyon Türü	Nitel-Nicel	Kaynak
2-HB	Kapiler kolon (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	He/1.0	MeOX / piridin (50 µL, 60 dk, 70°C) BSTFA (100 µL, 60 dk, 70°C)	70°C (4 dk) 8°C/dk 300°C (3 dk)	Bölmesiz	MS-EI	Nitel	(42)
2-HB	Kapiler kolon (60 m x 0.2 mm x 0.25 µm)	He/1.0	MeOX / piridin (100 µL) MSTFA + %1 TMCS (200 µL, 120 dk, 80°C)	→ 95°C (2°C/dk) 10 dk → 295°C (20 dk)	-	MS	Nicel	(43)
PGA	Kapiler kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	He/1.0	MeOX / piridin (30 µL, 90 dk, 37°C) MSTFA/ACN (1:2) (45 µL, 70 dk 50°C)	70°C (2 dk) → 155°C (4°C/dk) 2 dk → 170°C (4°C/dk) 2 dk → 220°C (4°C/dk) 2 dk	Bölmeli (1:11)	MS-EI	Nicel	(44)

PGA	Silika kapiler kolon (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	He/1.0	MeOX / piridin (30 µL, 90 dk, 37°C) BSTFA/ %1TMCMS (45 µL, 90 dk, 90°C)	80° C (2 dk) → 320° C (10°C /dk) 6 dk	Bölmesiz	MS	Nicel	(45)
GA	Kapiler kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	He/1.5	MeOX / piridin (20 µL, 20 dk, 80°C) MSTFA (91 µL, 20 dk, 80°C)	70°C (4 dk) → 300°C (20°C/dk) 5 dk	Bölmesiz	MS	Nicel	(46)
GA	Kapiler kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	He/2.8	MeOX / piridin (20 µL, 90 dk, 30°C) MSTFA + %1 TMCS (60 µL, 25 dk, 60°C)	60°C (1 dk) → 200°C (10°C/dk) → 320°C (30°C/dk) 6 dk	Bölmeli (1:10)	MS	Nicel	(47)
GA	Kapiler kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	He/2.0	MeOX / piridin (40 µL, 120 dk, 37°C) MSTFA (70 µL, 30 dk, 37°C)	80° C (2 dk) → 320°C (15°C/dk) 6 dk	Bölmeli (1:50)/ Bölmesiz	MS-EI	Nicel	(48)
4-OHGA	Kapiler kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	He/1.0	MeOX / piridin (20 µL, 60 dk, 65°C) BSTFA+% 1TMCS (80 µL, 30 dk, 80°C)	80°C (1 dk) → 320°C (8°C/dk)	Bölmesiz	MS	Nitel	(49)

4-OHGA			MeOX+100 µL MSTFA				MS	Nitel	(50)
NAGA	Kapiler kolon	He/0.3	BSTFA+%1 TMCS (20 dk, 60°C)		Bölmesiz		MS	Nitel	(51)
NAGA	Kapiler kolon (25 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	He	50 µL ACN 100 µL BSTFA+%1 TMCS (60 dk, 80°C)		Bölmesiz	100° C (2 dk) → 215°C (15°C/dk) → 290°C (4° C/dk)	MS	Nitel	(52)
NCGA	Kapiler kolon	He	MSTFA, TMS				MS	Nitel	(53)

2.5. Kromatografi (54-58)

Kromatografi ilk olarak 1906'da Rus botanikçisi Mikhail Tswett tarafından bitki pigmentlerinin (klorofil) ayırımında kullanılmasından bu yana biyokimyasal moleküllerin tanımlanmasında ve ölçümünde güçlü bir teknik olarak kullanılmaktadır.

Kromatografi, bir karışımdaki bileşenlerin sabit fazda, sabit fazın arasından ve üzerinden geçmekte olan hareketli faz ile farklı hızlarda sürüklenmeleri sonucunda birbirlerinden ayrılmasıdır. Kullanılan kromatografik tekniğe bağlı olarak maddeler sabit faz ile kimyasal veya fiziksel özelliklerine göre daha fazla veya daha az etkileşirler. Aradaki bu fark sayesinde maddeler birbirleri ile ayrıştırılır ve analiz edilir.

2.5.1. Kromatografi Türleri

Kromatografi, faz tiplerine ve ayrılma mekanizmasına ve uygulama biçimine göre sınıflandırılabilir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.

<u>Faz tiplerine göre</u>	<u>Ayrılma mekanizmasına göre</u>	<u>Uygulama biçimine göre</u>
<ul style="list-style-type: none"> *Sıvı *Gaz *Süper Kritik Akışkan 	<ul style="list-style-type: none"> *Adsorpsiyon *Dağılma (Partisyon) *İyon değişimi *İyon çifti oluşumu *Moleküler eleme *Affinite 	<ul style="list-style-type: none"> *Düzlemsel *Kolon

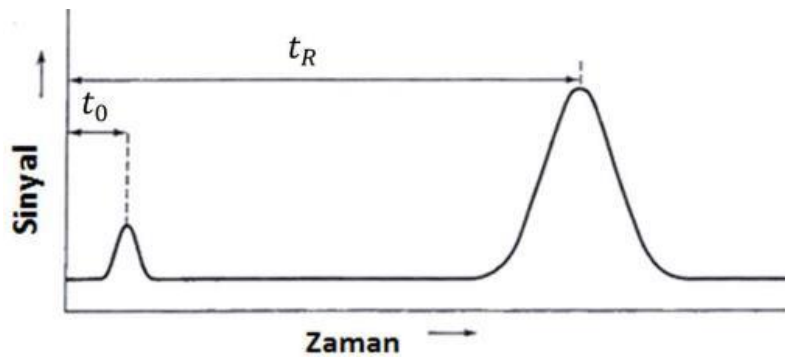
Kromatogram

Kromatografik sistemde ayrılan maddeyi algılayan uygun bir dedektör cevabının zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile kromatogram oluşturulur (Şekil 2.5). Kromatogramda her bir madde için farklı bir pik elde edilir. Elde edilen pikin oluşma zamanı ile nitel analiz yani maddenin ne olduğu bulunurken, pik alanının hesaplanması ile de nicel analiz yani madde miktarı bulunur.

2.5.2. Kromatografik Parametreler

Alıkonma Zamanı

Hareketli faz içerisinde süreklenen, analite ait bileşenlerin sabit faz ile etkileşime girmesi, belirli oranda tutulması, yavaşlatılması ve bu sayede kolonu daha geç terk etmesi olayıdır. Belirli analitik koşullar altında, alıkonma zamanı (t_R) her kimyasal madde için parmak izi niteliği taşımaktadır. Alıkonma zamanı, maddenin kolon ile etkileşimi sonucunda belirlenir ve kullanılan yöntemle paralel olarak maddenin kimyasal özellikleriyle ilgilidir. Hareketli fazın alıkonma zamanına ise ölü zaman (t_0) denir.



Şekil 2.5. Tek bir maddeye ait ölü zaman (t_0) ve alıkonma zamanı (t_R).

Alıkonma Hacmi

Bir maddenin enjeksiyonunu takiben sabit fazdan ayrılmasında gerekli olan hareketli fazın hacmi, alıkonma hacmi (V_R) olarak adlandırılır. Alıkonma hacmi hacimsel akış hızı (F) ve alıkonma zamanı kullanılarak hesaplanabilir (Eşitlik 2.1).

$$V_R = t_R F \quad (\text{Eşitlik 2.1})$$

Dağılım katsayısı (K) ile V_R arasındaki ilişki; kolondaki hareketli faz hacmi (V_M) ve sabit faz hacmi (V_S) olmak üzere Eşitlik 2.2 ile gösterilir.

$$V_R = V_M + K V_S \quad (\text{Eşitlik 2.2})$$

K değeri ise Eşitlik 2.3 ile hesaplanır.

$$K = \text{sabit fazdaki madde derişimi (} C_S \text{) / hareketli fazdaki madde derişimi (} C_M \text{)} \quad (\text{Eşitlik 2.3})$$

Kapasite Faktörü

Denge esnasında analitin sabit ve hareketli faz arasındaki dağılımını ifade eden orana kapasite faktörü (k') denir. Kapasite faktörü sabit veya hareketli fazın bileşimlerinin değişmesi ile değişir. Kapasite faktörü aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (\text{Eşitlik 2.4})$$

Ayrıca k' , Eşitlik 2.5 ile de tanımlanabilir.

$$k' = K \times V_S / V_M \quad (\text{Eşitlik 2.5})$$

Kapasite faktörü her madde için özgün bir değer olduğundan nitel analizde kullanılan önemli bir parametredir. Bu değer 1'den küçük olduğunda madde kolonu hızla terk eder ve alıkonma zamanı azalırken; 10'dan büyük olduğunda madde kolonda uzun süre kalmaktadır. Bir analizde kapasite faktörünün 1 ila 5 aralığında olması istenir. Kapasite faktörünü istenen aralığa getirmek için hareketli fazın bileşenleri değiştirilebilir. $k' = 0$ olduğunda ise kromatografik bir ayırımdan bahsedilemez.

Seçicilik

Seçicilik (α), kromatografik ayırımdaki maddelerin kapasite faktörlerinin oranı olarak ifade edilir. Aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0) \quad (\text{Eşitlik 2.6})$$

α değeri 1'e eşit olduğu durumda iki maddenin ayırımı gerçekleşemez. Kromatografik bir ayırımın sağlanabilmesi için α değeri 1'den büyük olmalıdır.

Kolon Etkinliği

Kolon etkinliği, eşdeğer teorik tabaka sayısı (N) ile tanımlanır ve Eşitlik 2.7 veya 2.8 ile hesaplanır (w: pik yüksekliğinin % 10'undaki pik taban genişliği, $w_{1/2}$: pik yüksekliğinin yarısındaki pik taban genişliği).

$$N = 16 (t_R / w)^2 \quad (\text{Eşitlik 2.7})$$

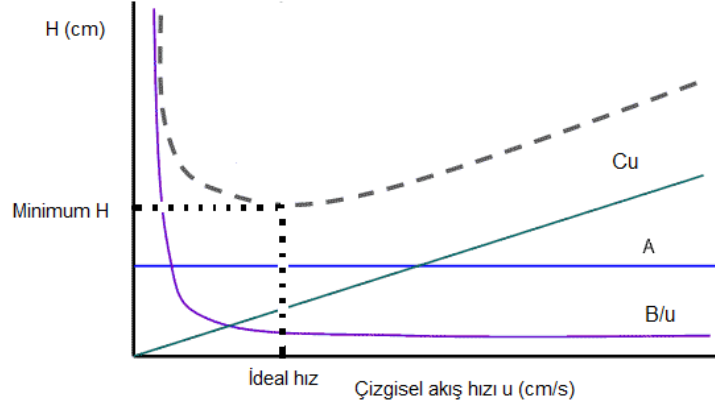
$$N = 5,54 (t_R / w_{1/2})^2 \quad (\text{Eşitlik 2.8})$$

Kolon etkinliği, kolon uzunluğunun (L) eşdeğer tabaka yüksekliğine (H) bölünmesi ile de hesaplanabilir.

$$N = L/H \quad (\text{Eşitlik 2.9})$$

Kromatografik kolonda ayırım, Van Deemter Eşitliği ile ifade edilmektedir. (Eşitlik 2.10). Bu eşitlikte H; teorik tabaka yüksekliğini (cm), A; çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonunu, B; boyuna difüzyonu, C; fazlar arasındaki kütle aktarımını ve u; çizgisel hızı göstermektedir. Şekil 2.6'da yer alan Van Deemter eğrisinden H ne kadar küçük olursa kolon veriminin o kadar yüksek olduğu görülmektedir.

$$H = A + B/u + C u \quad (\text{Eşitlik 2.10})$$

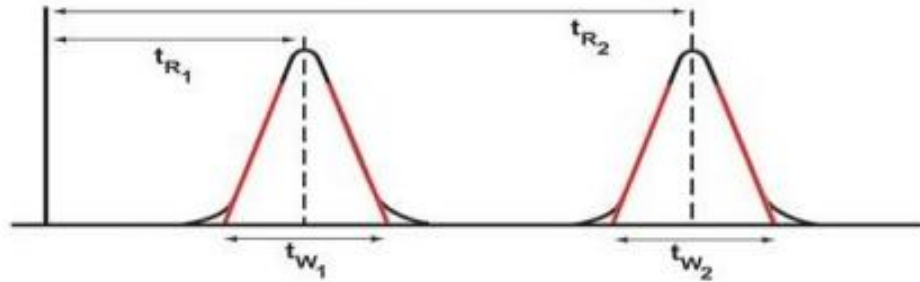


Şekil 2.6. Van Deemter eğrisi.

Ayırıcılık

Ayırıcılık (R_s) hem çözücü hem de kolon etkinliğinin ortak bir ifadesidir. Kromatografik ayırıcılık Eşitlik 2.11 (t_{R1} : 1'inci madde için alıkonma zamanı, t_{R2} : 2'inci madde için alıkonma zamanı, w_1 : 1'inci maddeye ait elüsyon pik yüksekliğinin % 10'undaki pik taban genişliği, w_2 : 2'inci maddeye ait elüsyon pik yüksekliğinin % 10'undaki pik taban genişliği) yardımıyla hesaplanmakta olup bu eşitlikte yer alan parametreler Şekil 2.7'de gösterilmiştir.

$$R_s = 2 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2) \quad (\text{Eşitlik 2.11})$$

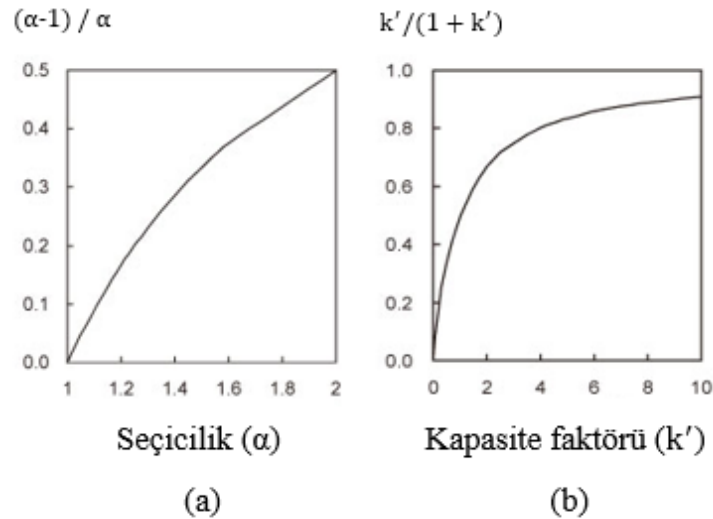


Şekil 2.7. Kromatografik ayırıcılık

İki pikin birbirinden tamamen ayrılabilmesi için $R_s \geq 1.5$ olmalıdır. Kapasite faktörü (k'), seçicilik (α) ve kolon etkinliğinin (N) ayırıcılığa etkisi Eşitlik 2.12 ile verilir.

$$R = [\alpha - 1/\alpha][k'/k' + 1] \times \sqrt{N} \times \frac{1}{4} \quad (\text{Eşitlik 2.12})$$

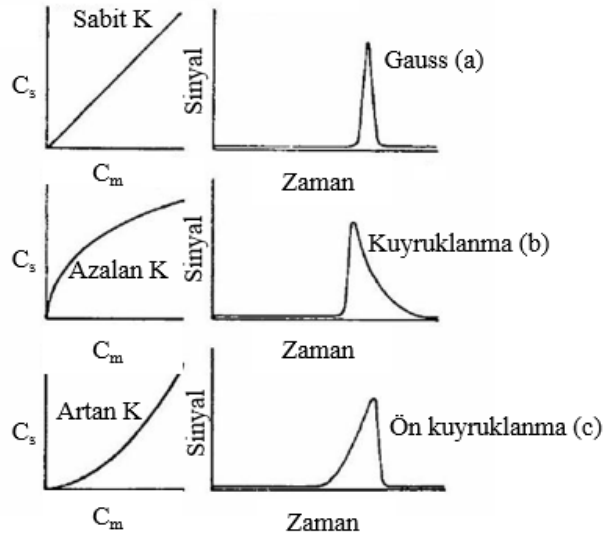
Eşitlik 2.12'e göre seçiciliğin artması ile ayırıcılığın da artması beklenmektedir. Ancak seçicilik değerinin belli bir noktaya gelmesinden sonra toplam ayırıcılıkta iyileşme olmadan piklerin alıkonma sürelerinde farklılıklar olabilir. Şekil 2.8'de seçiciliğin ve kapasite faktörünün ayırıcılık üzerine olan etkisi gösterilmektedir.



Şekil 2.8. Seçiciliğin ve kapasite faktörünün ayırıcılığa etkisi.

Pik Simetrisi

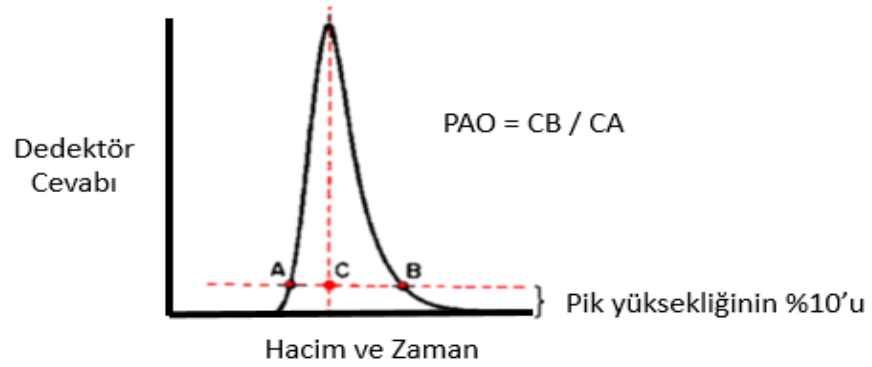
Analitin hareketli fazdaki denge derişiminin (C_m) sabit fazdaki denge derişimine (C_s) karşı grafiğe geçirilmesiyle bir dizi izoterm elde edilir. A çizgisi doğrusal bir izoterm olup eğimi hesaplanarak dağılım katsayısı elde edilir. K değeri bütün C_m değerlerinde sabit olduğundan simetrik bir elüsyon piki oluşur (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Elüsyon izotermi ve pik şekilleri.

Pik simetrisi, Eşitlik 2.14'e göre pik asimetri oranı hesaplanarak belirlenir (Şekil 2.10).

$$\text{Pik asimetri oranı (PAO)} = \text{CB/CA} \quad (\text{Eşitlik 2.14})$$



Şekil 2.10. Pik asimetri oranının hesaplanması.

İyi bir kromatografik ayırım için PAO değeri 1,00-1,25 aralığında olmalıdır (48). Pikin simetrik olduğu durumda (Gauss eğrisi) PAO=1 olur. (Şekil 2.9.a).

Moleküller arası kuvvetlerin maddeyi sabit faz üzerinde tutmasıyla iç bükey bir izoterm ve bunun sonucunda eğride pik kuyruklanması oluşur ve PAO değeri 1'den büyük bulunur (Şekil 2.9.b).

Eğer kolondaki madde miktarı fazla ise sabit fazdaki maddeler arası etkileşimler madde ile çözücü arasındaki etkileşimlere göre daha fazla olur ve K değeri artarak doğrusal olmayan bir izoterm ve pikte ön kuyruklanma oluşur ve PAO değeri 1'den küçük bulunur (Şekil 2.9.c).

2.6. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS)

Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) kimyasal karışımlarını analiz etmede tek bir yöntem oluşturmak için iki güçlü analitik cihazın birleştirilmesiyle elde edilen kombine bir sistemdir. Gaz kromatografisi ile bir karışım bileşenlerine ayrılır, kütle spektroskopisi ile her bir bileşen ayrı ayrı karakterize edilir. GC-MS ile hem nitel hem de nicel analizler gerçekleştirilebilir.

Tarihçe

Gaz-katı kromatografisi üzerine çalışan çok sayıda araştırmacıdan biri olan Alman Gerhard Damköhler (1908-1944), GC'nin temel prensiplerini ilk ortaya koyan kişidir (59). Teknolojinin gelişmesi bilimsel cihaz endüstrisinin doğmasına yol açmıştır. Bu yıllarda İngiliz ve Amerikan firmaları askeri gereksinimleri karşılamak üzere yüksek hassasiyette GC cihazları yapmışlardır (60). GC'nin önemi 1958'de kapiler kolonların Golay tarafından kullanılmasıyla artmıştır (61). 1976'da Zerenner ve Dandeneau'nun ergitilmiş silika kapiler kolonu bulması GC'nin gelişiminde büyük bir adım olarak kabul edilmektedir (62).

Kütle spektroskopisinin tarihçesinde Eugen Goldstein 1886'da pozitif iyonları keşfetmiş; Wilhelm Wien güçlü elektrik veya manyetik alanın ışınları saptırdığını bulmuş ve 1899'da elektrik ve manyetik alanların birbirine dik olduğu bir cihaz oluşturmuştur. Bu alanlar pozitif ışınların birbirlerinden kütle/yük oranına (m/z) göre ayrılmasını sağlamakta idi. İngiliz bilimci J.J. Thomson Wien ise düşük basınç altında çalışarak kütle spektrometresini oluşturmuştur (63,64).

1940'larda kütle spektroskopisi petrol endüstrisindeki kimyagerler tarafından işlem akışlarındaki küçük hidrokarbonların bolluğunu ölçmek için kullanılıyordu. 1960'larda bilim insanları sistemin kompleks molekülleri nasıl parçalandığını ve uygulama aralığını anlamaya başlamıştı (65). İlk kez GC-MS cihazının tanıtımı 1958'de gerçekleşmiş (66) olup 1968'de ilk veri işleme gerçekleştirilmiştir (67). İlk kapiler kolona sahip ticari GC-MS cihazı 1975'de tanıtılmış ve ergitilmiş silika kapiler kolonların kullanımına 1981'de başlanmıştır (68).

2.6.1. Gaz Kromatografisi (44,69,70)

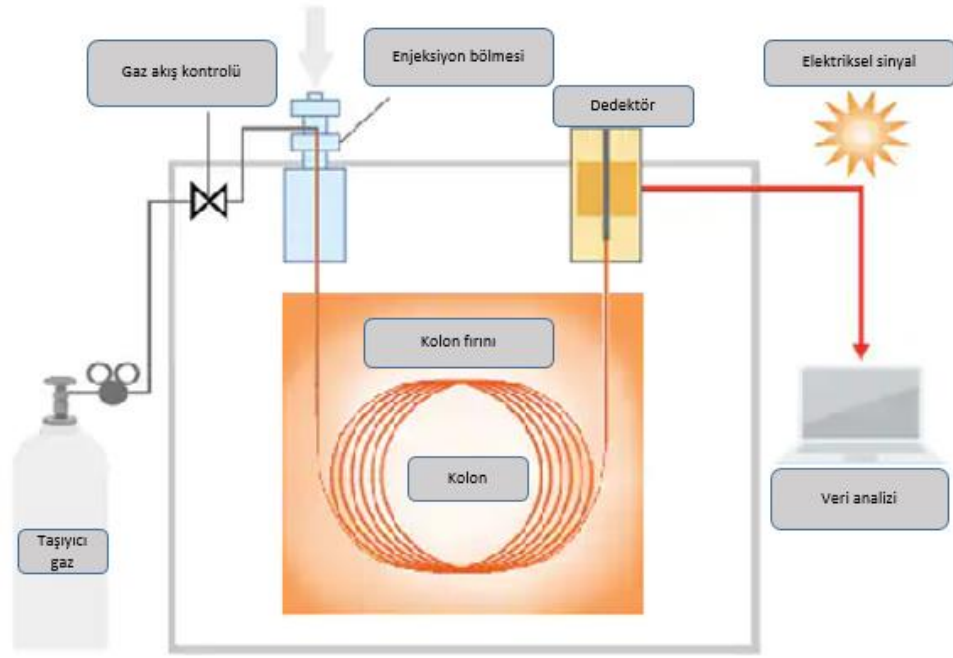
Gaz kromatografisi, bir karışımda bulunan gazları veya ısıtılınca bozunmadan kolayca gaz (buhar) haline gelebilen maddeleri ayırmak, belirlemek ve tayin etmek için kullanılır. Bu sistemde ayırım, gazlar karışımının taşıyıcı bir gazla sabit faz üzerinden geçirilmesiyle gerçekleştirilir. Taşıyıcı gazlar He, Ne, H₂ ve N₂ gibi inert özellikte olup karışımdaki bileşenler ile etkileşime girmez.

Gaz kromatografisi kullanılan sabit fazın özelliklerine göre ikiye ayrılır:

- 1)Gaz-sıvı kromatografisi (GLC)
- 2)Gaz-katı kromatografisi (GSC)

Gaz Kromatografi Cihazı

Gaz kromatografi cihazının şematik olarak gösterimi Şekil 2.11'de verilmiştir. Numune ya gazlar karışımı veya kolay buharlaşan sıvılar karışımıdır. Bu nedenle numune cihaza bir enjektör ile verilir. Numunenin enjeksiyonu, silikon lastiğinden (sıcağa çok dayanıklı) yapılmış bir tıpadan, doğrudan tübüler kolonun girişine yapılır. Numune sıvı ise birden buharlaşma olur ve buharlar taşıyıcı gaz vasıtasıyla kolona taşınır.

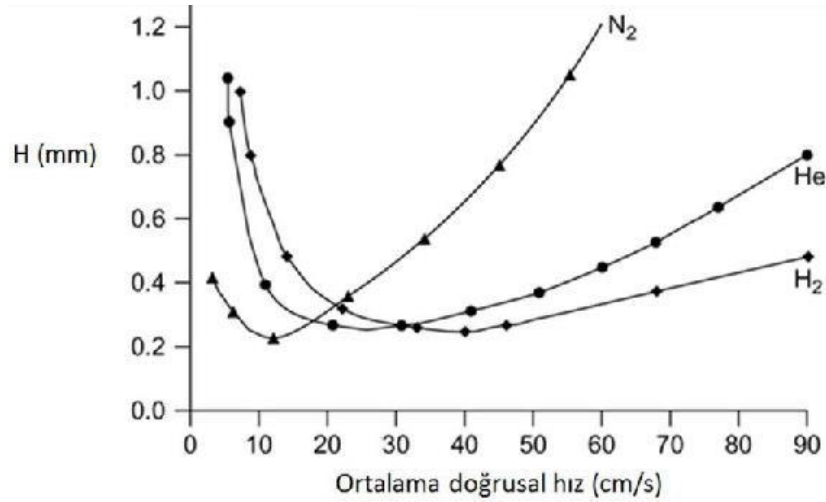


Şekil 2.11. Gaz kromatografisi cihazının temel kısımları.

Taşıyıcı Gaz

Gaz kromatografisinde taşıyıcı gaz olarak en çok helyum (He), hidrojen (H_2) ve azot (N_2) kullanılır.

Doğru ve güvenilir bir analiz için gazların lineer akış hızları da önemlidir. Şekil 2.12’te, minimum tabaka yüksekliğinde verimliliği en yüksek gazın N_2 olduğu; ancak doğrusal hızının artışı ile H değerinin düştüğü görülmektedir. Daha geniş doğrusal hız aralığında olan H_2 gazı patlayıcı olması ve doymamış organik bileşikleri indirgememesinden dolayı seçilmemektedir. Bu nedenlerle en çok kullanılan taşıyıcı gaz He gazıdır.



Şekil 2.12. Taşıyıcı gazların Van Deemter eğrileri.

Yarıçapı r , kapasite faktörü k' olan bir kolonun hareketli fazdaki kütle transfer hızını etkileyen tek unsur, çözünenin hareketli faz içindeki diffüzyon katsayısıdır. Taşıyıcı gazların diffüzyon katsayısı büyüklükleri, $N_2 < He < H_2$ şeklindedir.

İç çapı dar olan kolonlarda gazın akış hızı çok yavaş olabilir. Böyle durumlarda, kromatografik ayırım için optimum akış hızı ve taşıma gazı olarak en iyi sonuç veren gaz kullanılır. Taşıyıcı gazların safsızlık içermesi sabit fazı kirletir. Bu nedenle bu gazların saflığının yüksek olması, içinde H_2O ve O_2 bulunmaması gerekir. Taşıyıcı gaz genellikle 0,3 MPa altındaki basınçta uygulanır. Dolgulu kolonlarda akış hızı yaklaşık olarak 20 mL/dk iken açık kapiler kolonda 1 mL/dk'dır.

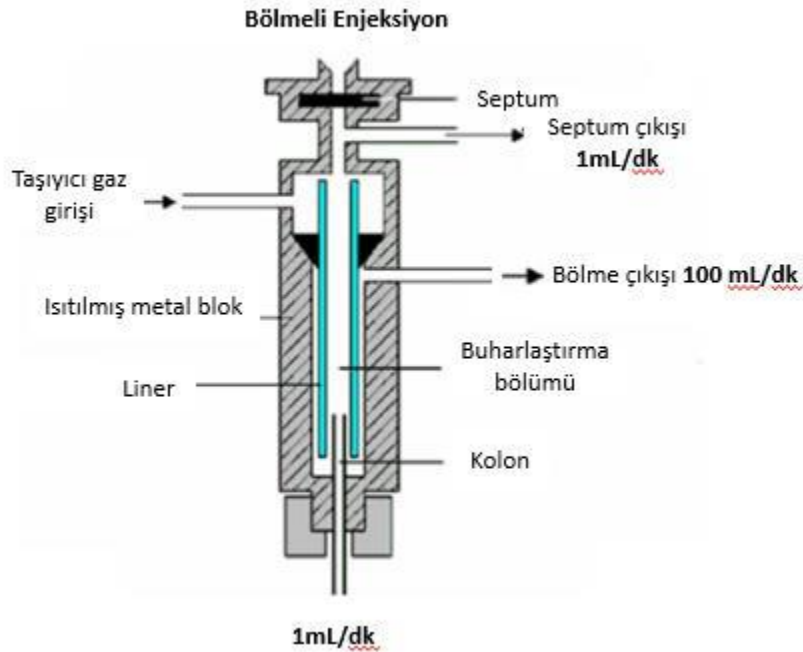
Enjeksiyon Türleri

Numune girişi GC'de en kritik basamak olup numunenin kolona tek seferde verilmesi ve analitin tamamının detektöre ulaşması sağlanmalıdır. Bu süreçte bileşenlerin termal bozunmaya uğraması ya da bileşenlerin sahip olduğu farklı uçuculuk değerlerinden dolayı kromatografik ayırımın sağlanamaması engellenmelidir. Numunenin yavaş verilmesi ile pik genişlemesi oluşabilir ve bu durum ayırma gücünde azalmaya neden olabilir.

En yaygın uygulanan enjeksiyon teknikleri;

1) Bölmeli (split) Enjeksiyon

İçerdiği bileşenlerin her birinin kütlesi, numune kütlesinin %0,1'den büyük (derişik) olduğu durumlarda bölmeli enjeksiyon tipi kullanılır. Numune, hücreye bir saniyeden daha kısa sürede enjekte edilir. Enjekte edilen bölgenin sıcaklığı yaklaşık 350° C, numunenin hacmi 1 µL olmalıdır. Bu hacimdeki numune buharlaştığı zaman hacmi yaklaşık 0,5 mL olur. Büyük oranda sıvı olan numune buharlaşmanın gerçekleştiği ve 'liner' olarak adlandırılan kısma enjekte edilir. Numune hızla buharlaşma sonucunda taşıyıcı gaz ile karışır ve hızlı bir şekilde kolonun girişine taşınırken numunenin büyük bir bölümü çıkıştan atılır (Şekil 2.13).

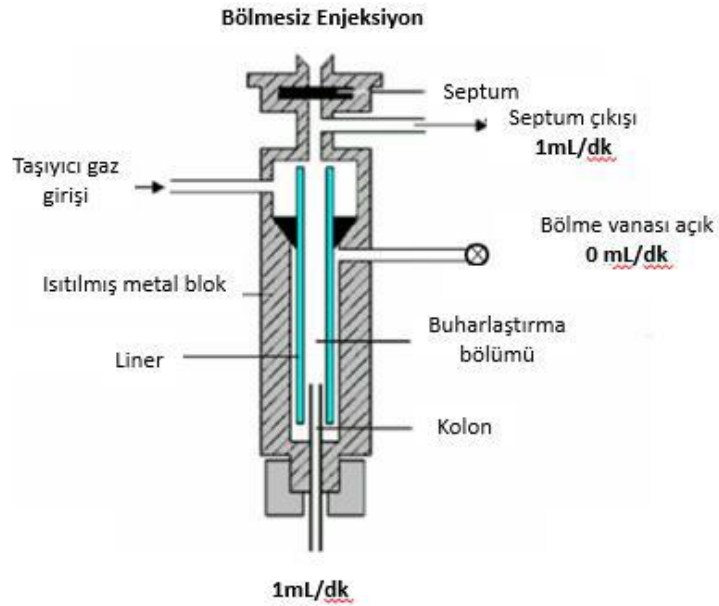


Şekil 2.13. Bölmeli enjeksiyon bloğu.

2) Bölmesiz (splitless) Enjeksiyon

Bölmeli enjeksiyon, numune kütlesinin en çok %0,01' i kadar olan bileşenlerin kromatogramlarını almada ve nicel tayinlerini yapmada kullanılır. Bu enjeksiyon türünde bölmeli enjeksiyonda olduğu gibi, bileşen buharlarını karıştırma kısmı olmadığı gibi, gazlar karışımını iki kısma bölen basınç ayarlama sistemi de yoktur.

Bölmesiz enjeksiyonda kolonun başlangıç sıcaklığı önemli bir parametre olup kullanılan çözücünün kaynama noktasına bağlıdır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Bölmesiz enjeksiyon bloğu.

3) Doğrudan Kolona Enjeksiyon

Bu enjeksiyon türü, kaynama sıcaklığının üstünde çabuk bozulan bileşenlerin nicel analizleri için kullanılır.

GC'de Kullanılan Kolonlar

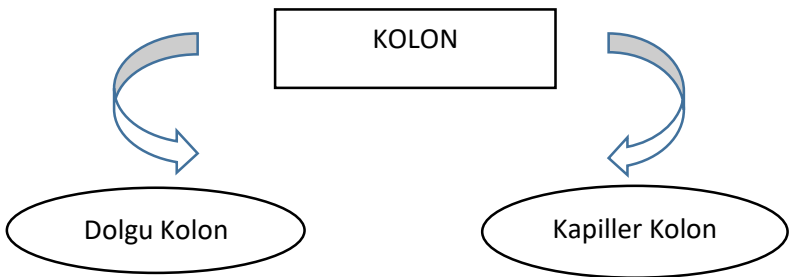
GC'de kolon, sıcaklık programlaması yapılabilen fırınının içine yerleştirilir. Kromatografik analiz süresince, fırın sıcaklığı genellikle sabit ve düzenli olarak artar. Sonuçta, kaynama noktası ve sabit fazla etkileşimlerin farkı ile bileşenlerin ayırımı gerçekleştirilebilir.

Sabit fazın parçalanması sonucunda oluşan bileşiklerin elüsyonu sebebiyle kolon kanaması gerçekleşebilir, düşük analit derişimlerde çalışılıyor ise girişimler oluşur, ayırımın tekrarlanabilirliği düşer ayrıca kolon zarar görür ve kullanılamaz hale gelir. Sabit fazın katı destek materyal üzerine bağlanması ile bu durum

engellenebilir. Kolon seçiminde kolondaki sabit fazın aktifliği (polarite), kolonun iç çapı ve kolondaki sabit fazın partikül büyüklüğü dikkate alınmalıdır.

GC-MS uygulamalarında iki tip kolon kullanılmaktadır. Bunlar dolgulu ve kapiler kolonlar olup özellikleri Tablo 2.4'te karşılaştırılmıştır.

Tablo 2.4. GC'de kullanılan kolon türleri: dolgu kolonlar ve kapiler kolonlar.



Sabit faz doğrudan kolon ile kaplıdır.	Kolonun iç duvarı sabit faz ile kaplıdır.
Hem Gaz-Katı hem de Gaz-Sıvı Kromatografisi için geçerlidir.	Yalnızca Gaz-Sıvı Kromatografisi için geçerlidir.
Sıvı faz, dolgunun yüzeyine ince bir tabaka halinde emdirilmiştir.	Sıvı faz, kapiler kolon duvarı iç yüzeyini kaplar.

Dolgulu Kolonlar

İlk ticari cihazlar sadece dolgulu kolonları kabul ettiğinden, GC'nin tüm ilk çalışmaları dolgulu kolonlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Dolgulu kolonlar tipik olarak paslanmaz çelikten yapılır ve 0,64 veya 0,32 cm dış çapa ve 0,61-3,05 m uzunluğa sahiptir. Cam, nikel, florokarbon polimer (teflon) ve cam veya teflon ile kaplı çelik gibi inert malzemeler de kullanılmıştır. Dolgulu kolonlar kapiler kolonlardan daha düşük etkinliğe sahiptir.

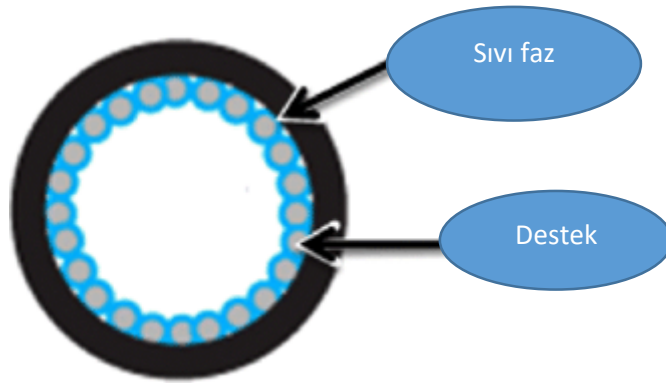
Kapiler Kolonlar

1959'da piyasaya sürülen kapiler kolonlar, 1980'e kadar popülerlik kazanmamışlardır. Kapiler kolonlar, ayırma maliyetinin daha ekonomik, ayırımın hızlı ve verimli olması nedeniyle, uygulamaların %80'den fazlasında kullanılmaktadır. Kapiler kromatografik kolonlar, dolgu malzemesi ile

doldurulmaz; bunun yerine, ince bir sıvı faz filmi iç duvarı kaplar. Tüp açık olduğu için akışa direnci çok düşüktür ve bu nedenle açık kapiler kolon olarak adlandırılır. Açık kapiler kolonlar; sabit fazın kolon çeperine farklı şekillerde uygulanması ile oluşan destek kaplı açık kapiler (SCOT), çeperi kaplı açık kapiler (WCOT) ve gözenekli katmanlı açık kapiler (PLOT) kolon olmak üzere üçe ayrılmaktadır.

Destek Kaplı Açık Kapiler (SCOT) Kolonlar

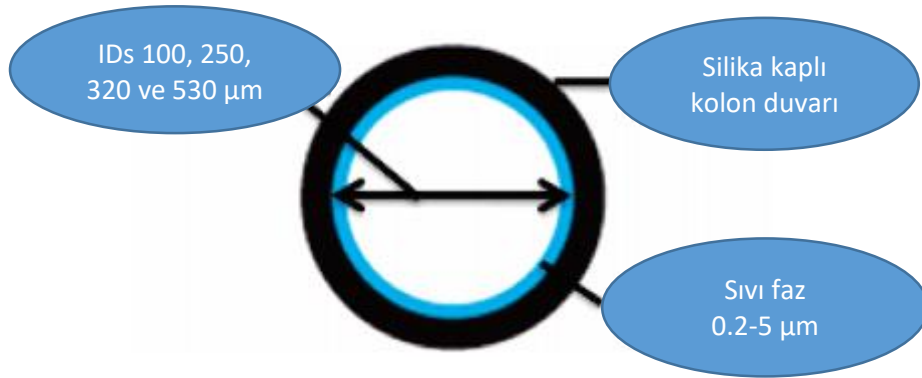
SCOT kolonlar 1963 yılında Halász ve Horváth tarafından tanıtılmıştır. Kolonun iç çeperi destek materyali ile kaplı olup üzerine sabit sıvı faz yüklenmiştir (Şekil 2.15). SCOT kolonlar yüksek numune kapasitesine sahiptir ancak verimlilikleri düşüktür.



Şekil 2.15. Destek kaplı açık tübüler kolon.

Çeperi Kaplı Açık Kapiler (WCOT) Kolonlar

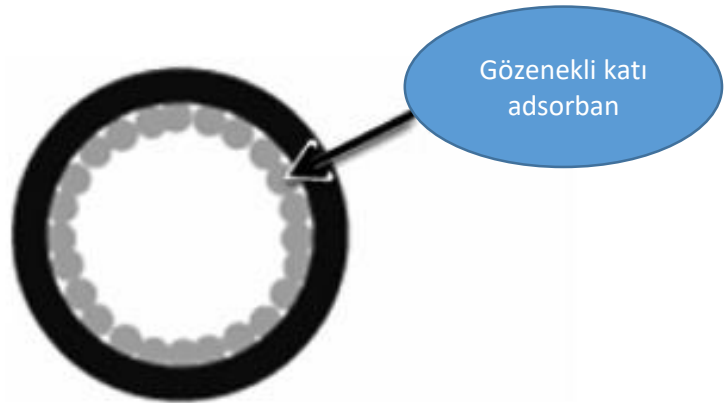
1957'de Golay, WCOT kolonların (verimlilikte 100 kat veya daha yüksek bir artış) üstünlüğünü göstermiş; ancak bu verimliliğin pratikte gerçekleşmesi çeyrek asır sürmüştür. WCOT kolonlarında duvar, 0.05–3 µm film kalınlığında sabit faz tabakası ile doğrudan kaplanır. En sık kullanılan kolon tipidir. Tipik bir WCOT kolon Şekil 2.16' da gösterilmektedir.



Şekil 2.16. Çeperi kaplı açık kapiler kolon.

Gözenekli Katmanlı Açık Kapiler (PLOT) Kolonlar

İlk olarak 1950'lerin sonlarında Golay tarafından önerilen PLOT kolonlar başarıyla geliştirilmiş ve ticarileştirilmiştir. PLOT kolonları, alümina, moleküler elekler veya Porapak gibi gözenekli bir katı adsorban tabakası içerir. PLOT kolonları ışık, sabit gazlar ve sabit gazların analizi için çok uygundur. PLOT bir kolonun tipik yapısı Şekil 2.17'te gösterilmektedir.



Şekil 2.17. Gözenekli katmanlı açık kapiler kolon.

Dedektörler (71)

Bileşenler kolondan ayrıldığında detektörle etkileşime girerler. Detektör, bu etkileşimi veri sistemine gönderilen bir elektronik sinyale dönüştürür. Sinyalin büyüklüğü, zamana karşı (enjeksiyon anından itibaren) grafiğe dökülür ve bir

kromatogram oluşturulur. Kolondan çıkan numunenin yoğunlaşmasını önlemek için dedektör sıcaklığı yüksek olmalıdır.

Bazı dedektörler, kolondan ayrılan herhangi bir maddeye yanıt verirken, diğerleri yalnızca belirli yapılara, işlevsel gruplara veya atomlara sahip çözünen maddelere yanıt verir.

Çoğu dedektör, düzgün çalışması için bir veya daha fazla gazı ihtiyaç duyar. Yanma, reaktif, yardımcı ve tamamlayıcı gazlar vardır. Bazı durumlarda, bir gaz birden çok amaca hizmet edebilir. Dedektör gazının türü, dedektöre bağlıdır ve GC üreticileri arasında oldukça evrenseldir ancak her dedektör türü için akış oranları değişiklik gösterir. Bir dedektör için optimum hassasiyeti, seçiciliği ve doğrusal aralığı elde etmek için önerilen akış hızlarını takip etmek önemlidir.

Alev İyonizasyon Dedektörü (FID):

Mekanizma: Bileşikler bir hidrojen-hava alevinde yakılır. Karbon içeren bileşikler, kollektöre çekilen iyonları üretir. Toplayıcıya çarpan iyonların sayısı ölçülür ve bir sinyal üretilir.

Seçicilik: C-H bağlarına sahip bileşikler.

Nitrojen Fosfor Dedektörü (NPD):

Mekanizma: Bileşikler, hidrojen ve hava ile beslenen rubidyum boncuğu çevreleyen bir plazmada yakılır. Azot ve fosfor içeren bileşikler, kollektöre çekilen iyonları üretir. Toplayıcıya çarpan iyonların sayısı ölçülür ve bir sinyal üretilir.

Seçicilik: Azot ve fosfor içeren bileşikler.

Elektron Yakalama Dedektörü (ECD):

Mekanizma: Elektronlar, dedektör hücrelerini kaplayan ^{63}Ni folyodan sağlanır. Hücrede bir akım üretilir. Elektroaktif bileşikler elektronları yakalar ve akımda bir azalmaya neden olur. Akım kaybının miktarı dolaylı olarak ölçülür ve bir sinyal oluşturulur.

Seçicilik: Halojenler, nitratlar ve konjuge karboniller.

Termal İletkenlik Dedektörü (TCD):

Mekanizma: Bir dedektör hücresi, uygulanan bir akımla ısıtılmış bir filaman içerir. Çözünen maddeler içeren taşıyıcı gaz hücreden geçerken, filaman akımında bir değişiklik meydana gelir. Mevcut değişiklik, bir referans hücresindeki akımla karşılaştırılır. Fark ölçülür ve bir sinyal oluşturulur.

Seçicilik: Taşıyıcı gaz dışındaki tüm bileşikler.

Alev Fotometrik Dedektörü (FPD):

Mekanizma: Bileşikler bir hidrojen-hava alevinde yakılır. Kükürt ve fosfor içeren bileşikler ışık yayan türler üretir (394 nm'de kükürt ve 526 nm'de fosfor). Tek renkli bir filtre, dalga boylarından yalnızca birinin geçmesine izin verir. Işık miktarını ölçmek için bir fotoçoğaltıcı tüp kullanılır ve bir sinyal oluşturulur.

Seçicilik: Kükürt veya fosfor içeren bileşikler.

Fotoiyonizasyon Dedektörü (PID):

Mekanizma: Bir hücreye salınan bileşikler, bir lambadan yayılan yüksek enerjili fotonlarla bombardımana tutulur. Foton enerjisinin altında iyonlaşma potansiyeline sahip bileşikler iyonize edilir. Ortaya çıkan iyonlar bir elektrota çekilir, ölçülür ve bir sinyal üretilir.

Seçicilik: Genellikle aromatikler ve olefinler.

Elektrolitik İletkenlik Dedektörü (ELCD):

Mekanizma: Bileşikler bir reaksiyon gazı ile karıştırılır ve yüksek sıcaklıkta bir reaksiyon tüpünden geçirilir. Bir çözücü ile karışan ve bir elektrolitik iletkenlik hücresinden geçen özel reaksiyon ürünleri oluşturulur. Çözücünün elektrolitik iletkenliğindeki değişiklik ölçülür ve bir sinyal üretilir. Reaksiyon tüpü sıcaklığı ve çözücü, hangi tür bileşiklerin tayin edildiğini belirler.

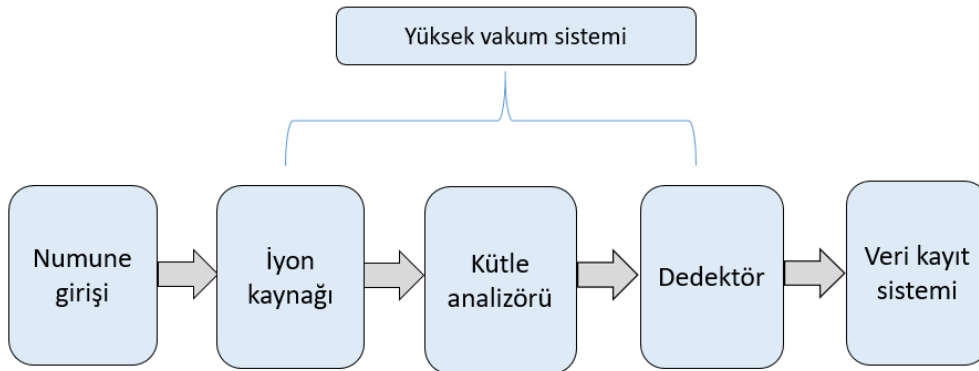
Seçicilik: Halojenler, kükürt veya nitrojen içeren bileşikler.

Tez çalışması kapsamında kütle spektroskopisi dedektör olarak kullanıldığından bu detektöre ait daha detaylı bilgi verilecektir.

2.6.2. Kütle Spektroskopisi (72 -74)

Kütle spektroskopisi, organik molekül parçalanması ile ortaya çıkan karakteristik fragmanlar veya iyonları belirler. Temel ilke, pozitif yüklü iyonlar üretmek için organik bileşiğin bir elektron demeti ile bombardıman edilmesini içerir. Ayrıca, moleküler iyon, bağları kırmak ve pozitif yüklü türler veya fragman iyonları elde etmek için elektronların enerjisi ile parçalanır. Oluşan pozitif veya fragman iyonları, manyetik alan kullanılarak dairesel bir yolda daha da hızlandırılır ve saptırılır sonrasında kütlelerine ve yüklerine göre dedektör veya fotoğraf plakasına odaklanır. Her iyon, plaka üzerinde ayrı bir çizgiyi temsil eder. İyonların ayrılması kütle-yük (m/z) oranına dayanır ve alınan cevap iyonların bolluğu ile orantılıdır.

Bir kütle spektrometresi beş ana kısımdan oluşur. Bunlar, numune girişi, iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör ve veri kayıt sistemidir (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Kütle spektrometresinin temel kısımları.

Numune Giriş Kısmı

Madde kromatografik kolondan ya doğrudan ya da açık bölmeli ara bağlantı yoluyla verilebilir. Madde, bozunmayı önlemek amacıyla belli bir sıcaklık ve düşük basınçta gaz haline getirilir.

Vakum Sistemleri

Kütle spektrometresi ile vakum altına çalışarak tekrarlanabilir parçalanma sağlanır bu sayede yüksek hassasiyet ve güvenilir bir kütle analizi gerçekleştirilebilir. Vakum, iki kademeli sistem ile sağlanır: İlki rotary pompa (kaba veya ön pompa) olup 10^{-2} - 10^{-4} torr vakum sağlar. İkincisi ise turbomoleküler veya difüzyon pompası olabilir; bu pompalar ile vakum 10^{-5} torr değere ulaşabilir (73).

İyonizasyon Teknikleri

Örnekteki moleküller, ısıtılan bir flamandan anoda doğru akan elektron akımı ile doğrudan veya dolaylı olarak iyonlaştırılırlar.

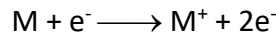
Numunelerin türüne ve uçuculuğuna bağlı olarak farklı iyonizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar; elektron iyonizasyon, kimyasal iyonizasyon, alan iyonlaştırma, alan desorpsiyon, hızlı atom bombardımanı, ikincil iyon kütle spektrometresi, elektrosprey, matriks yardımcı desorbsiyon/iyonlaştırma, plazma desorbsiyon ve termospay iyonlaştırma teknikleridir.

Tez kapsamında iyonizasyon için elektron iyonizasyon kullanılacağından bu teknik ile ilgili daha detaylı bilgi verilecektir.

Elektron İyonizasyonu Tekniği (EI)

Elektron iyonizasyon yöntemi, sert iyonizasyon tekniği olup GC-MS'de kullanımı oldukça yaygındır.

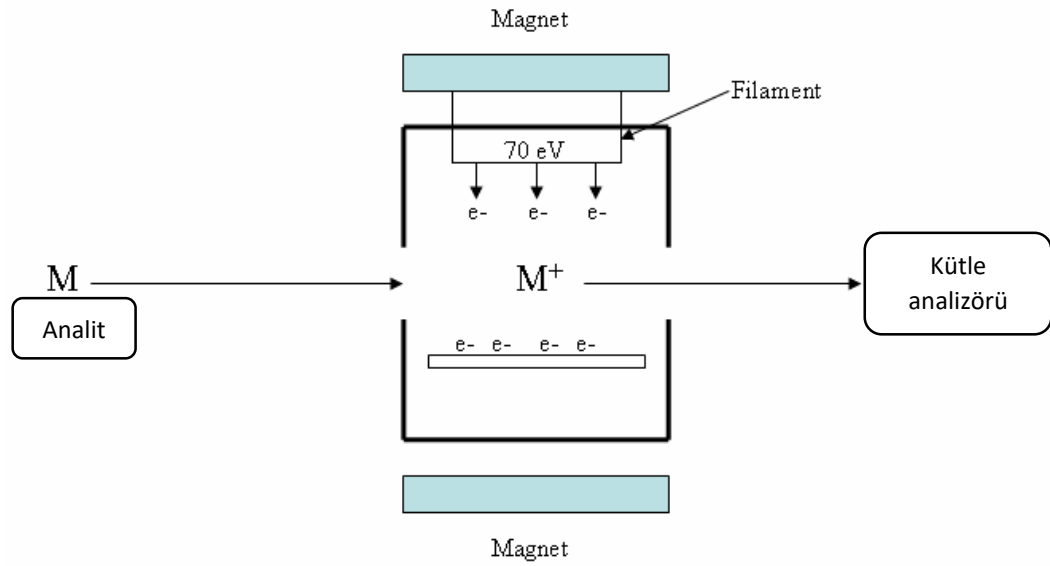
Kütle spektrumunun alınabilmesi için aşağıdaki iyonizasyon işlemi başlatabilecek miktarda elektron demeti enerjisine (pek çok organik bileşik için 7-15 eV kadar) ihtiyaç duyulmaktadır (M molekül, M^+ moleküler iyon veya ana iyon).



Elektron demeti enerjisinin artması ile iyon-molekül çarpışma olasılığı arttıracığından, daha fazla moleküler iyon oluşur. Demet enerjisinde büyük artışlar olduğunda ilave edilen enerjinin ana iyondaki elementler arasındaki bağı/bağları koparmasıyla genellikle daha küçük kütleli tanecikler meydana gelir

ve moleküler iyon piki küçülebilir. Şekil 2.19’da elektron iyonizasyon kaynağına ait şematik gösterim yer almaktadır.

Elektron iyonizasyonu (EI), yağlar, hidrokarbonlar vb. gibi uçucu organik bileşikler için yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.19.Elektron iyonizasyon (EI) kaynağı şematik gösterimi.

Kütle Analizörü

Kütle/yük oranları farklı olan iyonların ayrılması için farklı sistemler mevcuttur. Analizörün çok küçük kütle farklılıklarını algılayabilmesi istenir. En çok kullanılan kütle analizör türleri ve özellikleri Tablo 2.5’te yer almaktadır.

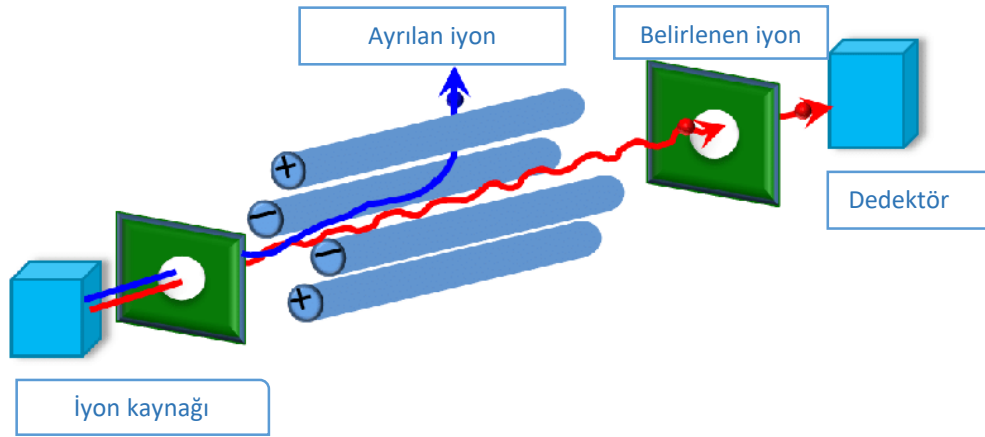
Tablo 2.5. Kütle Analizörlerinin Özellikleri.

Analizör	Ölçülen Özellik	Kütle/yük (m/z) aralığı	m/z=1000'de ayırıcılık	Dinamik aralık
Sektör manyetik (MSA)	Moment/yük	10^4	10^5	10^7
Uçuş zamanı (TOF)	Uçuş zamanı	10^6	10^3-10^4	10^4
İyon siklotron rezonans (FT-ICR MS)	Siklotron frekansı	10^5	10^6	10^4
İyon kapanı (QSTAR)	Frekans	10^4	10^4	10^4
Kuadrupol (Q)	m/z için filtreler	10^3-10^4	10^3-10^4	10^5

Tez kapsamında kuadrupol kütle analizörü kullanıldığından bu analizöre ait daha detaylı bilgi verilecektir.

Kuadrupol Kütle Analizörleri

Kuadrupol (dört kutuplu) analizörler dört paralel çubuktan oluşur; karşılıklı olan çubuklar aynı polaritede iken komşu çubuklar zıt polaritededir (Şekil 2.20). Her bir çubuğa doğru akım (DC) ve radyo frekans (RF) voltajı uygulanır; DC/RF kuadrupol voltajları değiştirilerek iyonlar taranır. RF alanda, sadece belirlenmiş m/z oranındaki iyonlar doğru yolu izlerler. Her iki alan da iyon kaynağından çıkan pozitif tanecikleri hızlandıracak bir etki yapmaz. Ancak alan birleştirildiğinde, taneciklerin kendi merkezi eksen etrafında titreşmeleri sağlanır, böylece çubuklardan biri ile çarpışarak sadece belli m/z oranına sahip tanecikler geçebilir. Uygulanan alternatif akımın veya iki kaynağın potansiyelleri değiştirilirken oranın sabit tutulması ile analiz sağlanır.



Şekil 2.20. Kuadropol analizörünün şematik gösterimi.

Dedektör

Analizörden gelen iyonlar, yarıktan geçerek bir elektrot üzerinde toplanır. İyon akımı yükseltir. Oluşan akım kaydediciye gönderilir.

Diğer bir yöntemde, ayırıcıdan gelen iyonlar bir katot yüzeyine çarparak elektron açığa çıkarırlar. Meydana gelen elektronlar bir diyota doğru hızlandırılarak diyota çarptırılır ve bu sayede yeni elektronlar elde edilir. Bu işlemi birden fazla tekrarlanması ile yükseltile elektron akımı elektronik olarak kaydedilir.

Kütle spektrometresinde 3 tip iyon tarama şekli bulunmaktadır. Bunlar SCAN, SIM ve tek iyon taramasıdır. SCAN'da analiz sırasında bütün iyonlar belirlenen alanda taratılır. SIM'da analit için en özgün, bolluğu fazla olan ve kararlı m/z değerlerinin seçilmesiyle tarama gerçekleştirilir.

Veri Sistemi

Bir kütle spektrumunun en önemli özelliklerinden biri içerdiği yapısal verilerin çokluğudur. Yapısal bir tayinin gerçekleştirilebilmesi için her bir pikin yüksekliğine ve kütle sayısının saptanmasına, toplanmasına ve görüntülenmesine ihtiyaç duyulur. Verilerin sayısının çok fazla olması, bu verilerin hızla toplanmasını ve işlemlendirilmesini gerektirir; bu ise en ideal şekilde bilgisayarlarla yapılabilir.

İleri teknolojik bilgisayar programları sayesinde veriler işlenir, yorumlanır ve raporlanır.

GC-MS Sisteminin Ayarlanması (Otomatik ayar)

GC-MS'de analize başlamadan önce MS sisteminin iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektör kalibrasyonunun yapılması gerekmektedir.

Kararlılığı ve uçuculuğu yüksek olan perfluorotribütil amin (PFTBA) analizi ile sistemin otomatik ayarı yapılır. Bu ayar PTBA'nın parçalanması ile oluşan m/z 69, 219 ve 502 iyon piklerinin bağıl bolluklarının bulunması ile gerçekleştirilir. Tablo 2.6'da PFTBA molekülünün parçalanma ürünlerinin istenen bağıl bollukları yer almaktadır.

Tablo 2.6. PFTBA molekülünün parçalanması ile oluşan iyonlarının bağıl bollukları (75).

m/z	69	219	502
Bağıl bolluk (%)	100	>35	>1
İzotop kütlesi	70	220	503
İzotop oranı	0,5-1,6	3,2-5,4	7,9-12,3

2.6.3. Türevlendirme Teknikleri (76)

Bir analitik çalışmada, analitin yapısı uygulanacak analiz yöntemine uygun olmayabilir ya da analiz sonucunda elde edilen verilerin iyileştirilmesi gerekebilir. Analitin uygun özelliklere sahip hale getirilmesi için uygulanan işleme türevlendirme denir.

GC analizlerinde türevlendirmenin başlıca nedenleri aşağıda verilmiştir:

- Uygun uçuculuk sağlamak.
- Isıl kararlılığı arttırmak.
- Polar örneklerin kolon yüzeyinin iç duvarına tutulmasını engellemek.

- Pikleri iyileştirmek.
- Karışan pikleri yeniden düzenlemek.
- Duyarlılığı arttırmak.

Türevlendirme reaksiyonlarında ana hedef $-OH$, $-COOH$, $=NH$, $-NH_2$, $-SH$ ve diğer fonksiyonel grupları içeren bileşiklerin polaritelerinin azaltılması ya da maskelenmesidir. Bunun için alkilleme, açılme ve sililleme gibi türevlendirme reaksiyonları kullanılmaktadır. Bu reaksiyonlar ile organik asitler, amidler, poli hidroksi bileşikler, amino asitler gibi oldukça polar numunelerin uçuculuğu arttırılarak GC analizine uygun hale getirilmektedir. Elektron yakalama dedektörleri (ECD) için ise saptanabilirliği arttırmak için analite halojen eklenmektedir. Sık kullanılan türevlendirme reaktiflerine ait bazı örnekler Tablo 2.7'de verilmiştir.

Alkilleme Reaktifleri

Alkilleme reaktifleri, esterleri, eterleri ve amitleri oluşturmak için tek başına veya açılme veya sililleme reaktifleri ile birlikte kullanılabilir. Kuvvetli asidik ortamdan kuvvetli bazik ortama değişen reaksiyon koşullarının tümünde kararlı türevler oluştururlar ancak kullanılan reaktifler toksiktir.

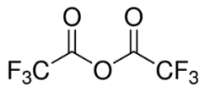
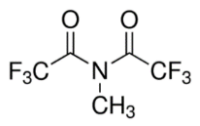
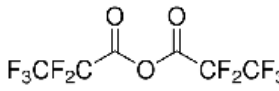
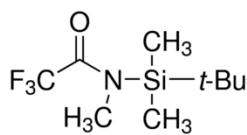
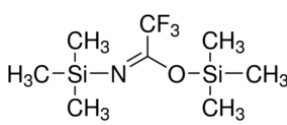
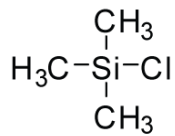
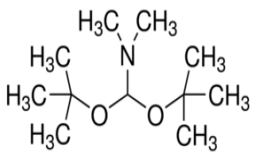
Sililleme

Sililleme reaksiyonları ile uçucu olmayan polar bileşikler, uçucu ve termal kararlılığa sahip türevlere dönüştürülmektedir. Reaksiyonda SH, OH ve NH gibi gruplar üzerinde bulunan aktif hidrojenler, TMS (trimetilsilil grubu) ile yer değiştirir. Sililleme reaktifleri önce su ve alkollerle reaksiyona girmektedir. Bu yüzden türevlendirme işleminde hem numunenin hem de çözücülerin kuru olması oldukça önemlidir. Sililleme reaktifleri genellikle neme karşı duyarlı olduğundan ağız sıkıca kapatılmış kaplarda saklanmalıdır.

Açilleme

Açilleme reaksiyonları ile amino, hidroksil ve tiyol gruplarının polaritesi azaltılmaktadır. Bu reaksiyonlarda aktif hidrojenler (-OH, -SH ve -NH) içeren bileşikler, açil anhidrit, açil halojenür ve aktive edilmiş açil amid reaktifleri ile sırasıyla esterlere, tiyoesterlere ve amidlere dönüştürülmektedir. Açilleme ile türevlendirme reaksiyonlarında özellikle polar bileşiklerin uçucu türevleri elde edilmektedir. Ancak, anhidritler ve açil halojenür reaktifleri, GC analizinden önce uzaklaştırılması gereken asit yan ürünlerini oluştururlar. Bu yüzden açilleme sırasında piridin, tetrahidrofuran veya asit yan ürününü tutabilen çözücüler kullanılmaktadır. Sililleme ile karşılaştırıldığında açilleme, polaritesi daha yüksek ve fazla fonksiyonel grup bulunduran (karbonhidrat, aminoasit) örneklere uygulanmaktadır. Açilleme, şekerler gibi son derece polar numuneleri GC ile ayırmaya uygun hale getirebilir ve sililleme ile türevlendirmeye alternatif veya tamamlayıcı olabilir.

Tablo 2.7. Türevlendirme reaktifleri.

Kimyasal adı	Türevlendirme tekniği	Kimyasal formülü
Trifluoroasetik asit anhidriti (TFA)	Açilleme	
N-metilbis (trifluoroasetamit) (MBTFA)	Açilleme	
Pentafluoropropiyonik anhidrit (PFPA)	Açilleme	
N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroasetamit (MSTFA)	Sililleme	
N,O bis(trimetilsilil) trifluoroasetamit (BSTFA)	Sililleme	
Trimetilsilil klorür (TMCS)	Sililleme	
Bor triflorür metanol	Alkilleme	$\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$
N,N-dimetilformamit di-tert-bütül asetat	Alkilleme	

2.6.4. Sistem Uygunluk Testi (SUT)

SUT, numunelerin analizine başlamadan önce sistemin uygunluğunun referans bir madde ile kontrol edilmesidir. Kromatografik sistemler de uygulanmakta olan SUT için incelenen parametreler ve bu parametrelerin kabul sınırları Tablo 2.8’de verilmiştir.

Tablo 2.8. SUT için geçerli parametreler ve sınır değerleri.

Parametre	Sınırlar
Kapasite faktörü (k')	$k' > 2$
Ayırıcılık (Rs)	$Rs > 1.5$
Pik asimetri oranı (PAO)	$PAO \leq 1.5$
Teorik tabaka sayısı (N)	$N > 2000$
Enjeksiyon tekrarlanabilirliği	$n > 5, BSS \leq \%1$

n: Enjeksiyon sayısı, BSS: Bağıl standart sapma

2.6.5. Analitik Yöntem Validasyonu (77-79)

Bir sistemin belirlenen amaca uygunluğunun ölçülmesi ve performansının değerlendirilmesi için yapılan test ve ölçme işlemlerinin yazılı delillerle kanıtlanmasına validasyon denir.

Bir laboratuvar da kullanılacak standart olmayan bir yöntemin analiz öncesinde laboratuvar koşullarında analiz yapan kişiler tarafından valide edilmesi gerekmektedir.

Validasyon Parametreleri

Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Uygulamaları Kurumu (US FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi yasal kuruluşların hazırladığı kılavuzlar veya farmakopeler doğrultusunda validasyon parametreleri değerlendirilebilir.

Biyoanalitik yöntem validasyonunda bakılması gereken parametreler aşağıda verilmiştir:

- Kararlılık
- Özgünlük (Seçicilik)
- Doğrusallık
- Duyarlılık (Gözlenebilme sınırı (LOD) ve Tayin alt sınırı (LLOQ))
- Doğruluk
- Kesinlik
- Sağlamlık
- Taşınma
- Geri kazanım
- Sistem uygunluk

Kararlılık

Tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için numunelerin, stok ve standart çözeltilerin ve kullanılan çözücülerin stabitelerinin ne kadar süre ile korunduğunun bilinmesi gerekir.

Kısa dönem, uzun dönem, oto örnekleyici ve donma ve çözme kararlılığının belirlenmesi için taze hazırlanan çözeltilerin çalışma koşullarındaki kararlılığı ve beklemiş numunelerin kararlılıkları istatistiksel hesaplamalar kullanılarak karşılaştırılır. Aralarında %2'den fazla fark bulunmaması istenir.

Seçicilik

Yöntemin analiti matriksindeki diğer maddelerden ayırabilme özelliğidir. Karışık bir matriks içerisindeki analitin tam ve doğru olarak bulunabilmesidir. US FDA biyoanalitik yöntem kılavuzuna göre seçiciliğin değerlendirilebilmesi için en az altı farklı biyolojik materyalden analiz gerçekleştirilmeli ve herhangi bir girişimin olup olmadığı kontrol edilmelidir.

Doğrusallık

Doğrusallık, yöntemin numunedeki analitin derişimi ile doğru orantılı olan test sonuçları elde etme yeteneğini değerlendirir.

Ölçüm aralığını sağlayacak numune standart stok çözeltiden seyreltilerek ya da ayrı ayrı hazırlanabilir. Kalibrasyon eğrisi, standart derişimine karşılık analiz sonucu ya da ölçüm sinyali grafiğe geçirilerek oluşturulur. Doğrusal bir ilişki bulunması durumunda test sonuçları uygun istatistiksel yöntemlerle değerlendirilir. Doğrusalığın ifade edilebilmesi için beklenen ölçüm aralığının %80 ile %120'sini kapsayacak en az 5-6 nokta önerilir.

Duyarlılık

Gözlenebilme sınırı (LOD), istatistiksel kesinlikte kabul edilebilir, ölçülebilen en düşük değerdir. Derişimi (düşük) bilinen numunelerden ölçülen değer, analit içermeyen boş numune ile karşılaştırılır. Sinyal/gürültü (S/G) değerinin 3 olduğu derişim LOD olarak kabul edilir ve tayin edilebilecek en düşük derişim olarak belirlenir.

Tayin alt sınırı (LLOQ), ölçüm işleminin analizi yapılan maddeyi nicel olarak ölçme yeteneğini ifade eden performans karakteristiğidir. S/G değerinin 10 olduğu derişim LLOQ olarak kabul edilir.

Gürültü ölçülemediği durumlarda kalibrasyon eğrilerinden $LOD=3,3 \sigma/S$ (σ : Kalibrasyon eğrisinin kesişim değerinin standart sapması, S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi); $LLOQ=10 \sigma/S$ formülleri ile hesaplanmaktadır.

Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır.

Derişimi bilinen standartların analizleri aynı gün, LLOQ ve doğrusal aralıkta bulunan 3 derişim değerinde, 3 tekrarlı yapılan analizler ile 6 farklı günde yapılan analizlerin sonuçları ile karşılaştırılır. Sonuçlar bağıl hata (BH) değerleri üzerinden değerlendirilir.

Kesinlik

Belirlenen analiz koşulları altında elde edilen sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Kesinlik rasgele hataların dağılımı ile ilişkilidir, gerçek değerle ilgisi yoktur. Kesinlik sonuçları aşağıdaki parametrelerden etkilenebilir:

- Analizci
- Cihaz ve cihazın kalibrasyonu
- Çevre koşulları (sıcaklık, nem, hava kirliliği vb)
- Ölçümler arasında geçen zaman

LLOQ ve doğrusal aralıkta bulunan 3 derişim değerinde hazırlanan numunelere aynı gün ve farklı günlerde analizler yapılır ve bağıl standart sapma (BSS) hesaplanır. Kesinliğin belirlenmesinde enjeksiyon tekrarlanabilirliği de kontrol edilir. Doğrusal aralıkta bulunan bir derişimde hazırlanan standart çözeltisinin arka arkaya 10 enjeksiyonunun yapılmasıyla BSS hesaplanır.

Bir analitik yöntemin tutarlılığı da kesinliğinin bir göstergesi olup yöntemin farklı cihaz, analizci ya da laboratuvar gibi değişikliklerde yeniden üretilebilirliğinin göstergesidir. Her değişiklikte elde edilen sonuçlar arasındaki farkın değerlendirmesi istatistiksel olarak gösterilir.

Sağlamlık

Sağlamlık, yöntem parametrelerinde küçük ama belirgin bir değişiklikler yapıldığında yöntemin bu değişikliklerden etkilenip etkilenmediğini gösterir.

tkilenme yeteneğinin göstergesidir. Sağlamlık testlerinden elde edilen bilgi, yöntemin uygulanabilir olduğu koşulların tanımlanmasını da sağlar.

Taşınma

Yüksek derişimdeki standart çözelti enjeksiyonundan sonra yıkama işlemlerini takiben yapılan çözücü enjeksiyonu ile bulunan derişim değerinin karşılaştırılması yapılır. Boş çözeltideki değerin LLOQ'nun %20'sinden az olması analizler sırasında bir taşınma olmadığını gösterir.

Geri kazanım

Geri kazanım, bilinen derişimdeki analitin biyolojik matrikse eklenerek analizinin gerçekleştirilmesi ve elde edilen sonuçların aynı derişimdeki standart çözeltinin analizinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmasıdır. Analitin geri kazanım sonucunun doğru ve tekrarlanabilir olması istenir. Geri kazanım çalışmaları, seçilen çalışma aralığının alt, orta ve üst derişimlerinde yapılır.

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kullanılan Cihazlar

- | | |
|---|-----------------------------------|
| • Gaz kromatografisi-
Kütle spektrometrisi | Shimadzu GCMS QP 2010 Ultra MSD |
| • Vakumlu santrifüj | Hermle Z 233 M-2 (15000 dev dk-1) |
| • Hassas terazi | Mettler-Toledo AG 285 |
| • Milli Q deiyonize su cihazı | Barnstead NanoPure Diamond |
| • Ultrasonik banyo | Bandelin, Sonorex, RK514 BH |
| • Vorteks karıştırıcı | IDL RS2 |
| • Derin donduruculu buzdolabı | Bosch |

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- | | |
|---|------------|
| • Metoksiamin hidroklorür | Sigma |
| • N-metil-N-trimetilsililtrifloroasetamit+trimetilklorosilan
(MSTFA + %1 TMCS) | Sigma |
| • Piridin(≥ %99,5) | Sigma |
| • Aseton | Sigma |
| • 2-hidroksi bütirik asit (2-HB) | Sigma |
| • Piroglutamik asit (PGA) | Sigma |
| • Glutamik asit (GA) | Sigma |
| • 4-hidroksi glutamik asit (4-OHGA) | Sigma |
| • N-asetil L- glutamik asit (NAGA) | Sigma |
| • N-karbamil L- lutamik asit (NCGA) | Sigma |
| • Miristik asit-d27 (İS) | Sigma |
| • Asetonitril (≥ %99,5) | Sigma |
| • Metanol (≥ %99,5) | Sigma |
| • Helyum gazı (%99,9) | Ankara Gaz |

3.3. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler

- DB5-MS kolon Agilent
(30 m × 0,25 mm, 0,25 µm + ön kolon 10 m)
- Vial (vida kapaklı) Shimadzu
- İnsert silillenmiş Shimadzu
- Ependorf tüp Polipropilen (1,5 - 2 mL)
- Mikropipet Eppendorf
(0,1-10, 10-100, 100-1000, 1000-5000 µL)
- Mikropipet ucu Isolab
(0,1-10, 10-100, 100-1000, 1000-5000 µL)
- PTFE/SI septum kapak S&H

3.4. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

2-HB stok çözeltisi (1000 µg /mL): 10,41 mg 2-HB tartılmış, bir miktar metanol:su (9:1, h:h) kullanılarak balon jodede çözünmesi sağlandıktan sonra 10 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin 10 kez seyreltilmesi ile 1000 µg/mL derişimindeki stok çözelti hazırlanmıştır.

PGA stok çözeltisi (1000 µg /mL): 12,91 mg PGA tartılmış, bir miktar metanol:su (9:1, h:h) kullanılarak balon jodede çözünmesi sağlandıktan sonra 10 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin 10 kez seyreltilmesi ile 1000 µg/mL derişimindeki stok çözelti hazırlanmıştır.

GA stok çözeltisi (1000 µg /mL): 14,71 mg GA tartılmış, bir miktar metanol:su (9:1, h:h) kullanılarak balon jodede çözünmesi sağlandıktan sonra 10 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin 10 kez seyreltilmesi ile 1000 µg/mL derişimindeki stok çözelti hazırlanmıştır.

4-OHGA stok çözeltisi (1000 µg /mL): 16,31 mg 4-OHGA tartılmış, bir miktar metanol:su (9:1, h:h) kullanılarak balon jodede çözünmesi sağlandıktan sonra 10

mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin 10 kez seyreltilmesi ile 1000 µg/mL derişimindeki stok çözelti hazırlanmıştır.

NAGA stok çözeltisi (1000 µg /mL): 18,91 mg NAGA tartılmış, bir miktar metanol:su (9:1, h:h) kullanılarak balon jodede çözünmesi sağlandıktan sonra 10 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin 10 kez seyreltilmesi ile 1000 µg/mL derişimindeki stok çözelti hazırlanmıştır.

NCGA stok çözeltisi (1000 µg /mL): 19,01 mg NCGA tartılmış, bir miktar metanol:su (9:1, h:h) kullanılarak balon jodede çözünmesi sağlandıktan sonra 10 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin 10 kez seyreltilmesi ile 1000 µg/mL derişimindeki stok çözelti hazırlanmıştır.

Stok çözeltiler -20°C'de saklanmıştır. Standart çalışma çözeltileri metanol:su (9:1, h:h) ile stok çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak günlük olarak hazırlanmıştır.

Metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi (20 mg/mL): 5,0 mg metoksiamin hidroklorür 250 µL piridin ile çözülür ve çözünmenin tamamlanması için vortekslenir. Yapılan her deney öncesinde taze hazırlanmıştır.

Miristik asit-d27 (İS) çözeltisi (1000 µg/mL): 1,0 mg miristik asitd27 bir miktar metanol:su (9:1, h:h) ile çözünmesinin ardından 1 mL'ye aynı çözücü ile tamamlanmıştır.

Çalışma standartları:

- **Standart karışım çözeltisi (50 µg/mL):** Her bir metabolite ait hazırlanan 1000 µg/mL derişimdeki stok çözeltilerden 50 µL alınmış ve metanol:su (9:1, h:h) kullanılarak 1 mL' ye tamamlanmıştır. Standart karışım çözeltisi günlük hazırlanmıştır.
- **Kalibrasyon doğrusu için çalışma standartları:** Belirlenen derişimde çalışma standartı hazırlamak amacıyla standart karışım çözeltilisinden gerekli

hacimlerde alınmış, kuruluğa kadar uçurulmasının ardından 60 µL MSTFA + %1 TMCS reaktifi eklenmiş ve 37°C sıcaklıkta 20 dk bekletilmiş sonrasında viallere aktarılmıştır.

3.5. Analiz Yöntemi

3.5.1 Türevlendirme

Ependorf tübün içerisine 50 µL standart karışım çözeltisi konulup 4 saat uçurulduktan sonra üzerine 20 µL metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi eklenmiş, 1 dk vortekslenip 30°C'de 90 dk etüvde bekletilmiştir. Etüvden çıkarılıp oda sıcaklığına getirildikten sonra üzerine 60 µL türevlendirme reaktifi (MSTFA + %1 TMS) eklenip maddelerin farklı sıcaklıklarda (37, 50 ve 60°C) ve zaman dilimlerinde (10, 20, 25, 30, 40 dk) türevlendirilmesi sağlanmıştır. MSTFA + %1 TMS türevlendirme reaktifi için 20 µL metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi eklenerek ve eklenmeden bir seri analiz yapılmıştır. Aynı türevlendirme reaktifleri için sıcaklık ve süre parametreleri sabit tutularak türevlendirme reaktifinin miktarı 60, 70, 80, 90, 100 µL olarak değiştirilmiştir.

3.5.2. Kromatografik Koşullar

Analiz için Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra cihazı ve DB5-MS (%5 difenil %95 dimetilpolisiloksan) kapiler kolon kullanılmıştır. Kolon, 30 m uzunluğunda (+10 m ön kolon), 0,25 mm iç çapında ve 0,25 µm film kalınlığındadır.

Fırın sıcaklık programı sistem uygunluğunun sağlandığı koşullarda oluşturulmuştur. Fırın 60°C 1 dk bekletilir, dakikada 10°C artış ile 200°C ulaşılır, dakikada 30°C artış ile 320°C ulaşılır ve son sıcaklıkta 5 dk beklenir ve soğutulur.

Kütle Seçici Dedektör (MSD) transfer bölmesi sıcaklığı 290°C'dir. Hareketli faz olarak helyum gazı kullanılmıştır ve akış hızı 0,99 mL/dk'dır. Bölmeli enjeksiyon yapılmış olup bölme oranı 1:10'dur. Toplam analiz süresi 24 dk'dır. İç standart olarak miristik asit-d27 kullanılmıştır.

Günlük çalışmanın başlangıcında otomatik ayar yapılmış ve otomatik ayar şartları kaydedilmiştir. Her analiz öncesinde, yıkama çözeltisi olan asetonu içeren

şişeler yenilenmiştir. Her bir analiz sonunda bir kez; her seri sonunda en az 2 kez aseton enjeksiyonu yapılmıştır.

3.6. Sistem Uygunluk Testi (SUT)

40 µg/mL derişimde hazırlanan standart karışım çözeltilisinin on tekrarlı analiz sonuçları Amerika Farmakopesi'nde (USP) (80) belirtilen ve Tablo 2.7'de verilen enjeksiyon kesinliği, kapasite faktörü, ayırıcılık, teorik tabaka sayısı ve pik asimetri oranına göre değerlendirilmiştir.

3.7. Yöntem Validasyonu

Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmaları için US FDA kılavuzunda yer alan biyolojik materyal analizi için kararlılık, özgünlük, doğrusallık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık, taşınma ve geri kazanım parametreleri incelenmiştir (81).

3.7.1. Kararlılık

Kısa dönem kararlılık: 40 µg/mL derişimde standart karışım çözeltilisi oda sıcaklığında 6, 12, 24 s bekletildikten sonra analiz edilmiştir (n = 3). Aynı derişimde taze hazırlanmış standart çözeltilerin analiz sonuçları ile karşılaştırılarak geri kazanımları hesaplanmıştır.

Uzun dönem kararlılık: Her bir metabolitin stok çözeltilisi (1000 µg/mL) - 20°C'de (derin dondurucuda) 1 ay bekletilmiş ve oda sıcaklığına kadar ısınması beklendikten sonra analiz edilmiştir (n = 3). Aynı derişimde taze hazırlanmış standart çözeltilerin analiz sonuçları ile karşılaştırılarak geri kazanımları hesaplanmıştır.

Oto örnekleyici kararlılığı; 40 µg/mL derişimde standart karışım çözeltilisi analiz edildikten sonra 24 s oto örnekleyici de bekletilmiş ve tekrar analiz edilmiştir (n = 3).

3.7.2. Özgünlük (Seçicilik)

2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA, ve NCGA için özgünlük, standart karışım çözeltilerinin artan derişimlerde yapılan analizlerinde kromatogramlarda her metabolite ait alıkonma zamanları ve kaynaklardaki m/z değerlerinin incelenmesiyle belirlenmiştir.

3.7.3. Doğrusallık

5, 10, 20, 40, 60 ve 80 µg/mL derişimlerde hazırlanan altı adet standart karışım çözeltilisinin analizleri sonucu bulunan her bir maddeye ait pik alanının İS'nin pik alanına bölünmesiyle elde edilen değerinin derişime karşı grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi ile tanımlayıcılık katsayısı hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü ile birlikte yöntemin doğrusallığının kontrolü için olması gereken derişime karşı regresyon denklemi kullanılarak bulunan derişimler grafiğe geçirilmiş ve elde edilen eğrinin doğrusallığı incelenmiştir.

3.7.4. Duyarlılık (Gözlenebilme ve Tayin Alt Sınırı)

Yönteme ait gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LLOQ) saptanarak yöntem duyarlılığı değerlendirilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin kesişim değerinin standart sapması (σ) ve kalibrasyon doğrusunun eğimi (S) kullanılarak $LOD = 3,3 \sigma/S$ ve $LLOQ=10 \sigma/S$ formülü ile hesaplanmıştır.

3.7.5. Doğruluk

Doğruluk için gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmıştır. Aynı gün içinde 10, 40 ve 60 µg/mL derişimlerde hazırlanan standart çözeltilere ait analiz sonuçları ile elde edilen verilerin bağıl hata (BH) değerleri (n = 6) hesaplanarak gün içi çalışmalar; aynı derişimlerdeki standart çözeltilerin 6 gün art arda analiz edilmesi ile elde edilen verilerin BH değerleri hesaplanarak günler arası çalışmalar değerlendirilmiştir.

3.7.6. Kesinlik

Gün içi ve günler arası çalışmalar ile yöntem kesinliği değerlendirilmiştir. Doğrusallık aralığında bulunan 3 farklı derişimde (10, 40 ve 60 µg/mL) 6 seri çözelti hazırlanıp aynı gün içinde analiz edilerek gün için çalışmalar; aynı derişimde 6 seri çözelti hazırlanıp 6 farklı günde analiz edilerek günler arası çalışmalar yapılmıştır.

Sonuçlar standartların pik alan oranlarından kalibrasyon doğrusu denklemi kullanılarak hesaplanan derişim değerlerinin BSS'ları hesaplanarak değerlendirilmiştir.

Doğrusal aralıktaki 40 µg/mL standart karışım çözeltisinin on tekrarlı enjeksiyonu yapılmış, kalibrasyon doğrusu denklemi kullanılarak hesaplanan derişim değerlerinin BSS'ları hesaplanarak enjeksiyon (cihaz) tekrarlanabilirliği incelenmiştir.

Ayrıca farklı analizcilerin etkisi de değerlendirilmiştir. İki farklı analizci tarafından aynı anda hazırlanan 10 ve 60 µg/mL derişimlerdeki standart çözeltiler aynı optimum deney koşullarında analiz edilerek sonuçlar Mann-Whitney U Testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.7.7. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığı, akış hızı için optimum deney cihaz koşullarında (0,99 mL/dk), küçük değişiklikler yapılarak (0,79 – 1,19 mL/dk), 10 ve 60 µg/mL derişimdeki standart karışım çözeltisinin analizi ile incelenmiştir. Sonuçların optimum deney koşullarında yapılan analizlerde elde edilenler sonuçlar ile karşılaştırılması t-testi kullanılarak yapılmıştır.

3.7.8. Taşınma

Yüksek derişimdeki standart karışım çözeltisinin analizinin ardından boş çözelti analizi yapılarak değerlendirilmiştir.

3.7.9. Geri Kazanım

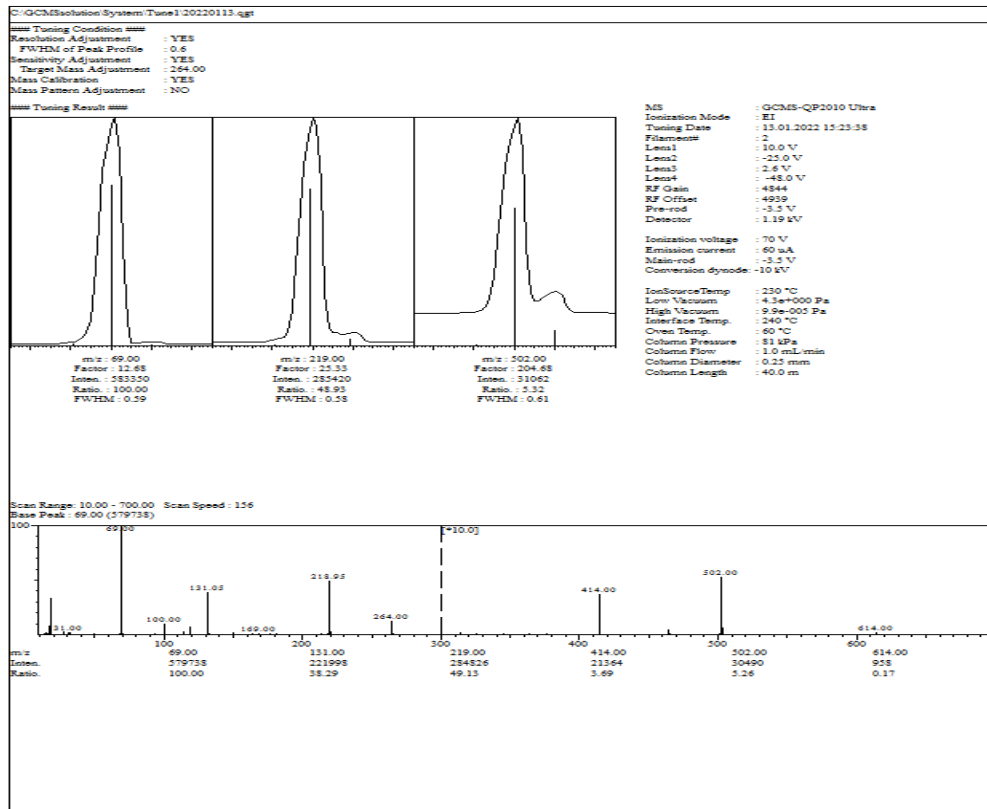
Her bir standart için doğrusallık aralığına giren dört farklı derişimdeki (5, 10, 20 ve 40 µg/mL) numuneler, boş ticari plazmaya standart ekleme yapılarak hazırlanmıştır. Her metabolite ait pik alanı oranlarının kalibrasyon doğrusu denklemleri kullanılarak derişim değerleri hesaplanmıştır. Bulunan bu değerlerden boş plazmadan elde edilen metabolit değerlerinin çıkarılmasıyla eklenen metabolit miktarları bulunmuş olup ortalama geri kazanım değerleri hesaplanmıştır

4. BULGULAR

Hedeflenmiş metabolitler olan 2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA'nın birarada analizleri için geliştirilen GC-MS yöntemi optimize edildikten sonra valide edilmiştir.

4.1. Analiz Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları

GC-MS sistemi ile her çalışmanın başlangıcında yapılan otomatik ayar şartlarının kontrolüne ilişkin örnek çıktı Şekil 4.1'de verilmiştir. PTBA'nın parçalanma ürünlerinin bağıl bollukları Tablo 2.6'da verilen değerleri karşılamakta olduğundan sistemde iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektörün kalibrasyonunun sağlandığı belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Otomatik ayar çıktı örneği

4.1.1. Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu

Türevlendirmede en verimli şartların bulunması amacıyla MSTFA + %1 TMCS türevlendirme reaktifi kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Türevlendirme tepkimeleri farklı sıcaklıklarda (37, 50 ve 60°C) ve zaman dilimlerinde (10, 20, 25, 30, 40 dk) gerçekleştirilmiştir. Oluşan trimetilsilil türevlerini içeren çözeltiler GC-MS cihazına enjekte edilerek elde edilen pik alanlarının iç standart pik alanına oranları değerlendirilmiştir.

2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA standartlarının trimetilsilil türevlerine ait (TMS) kütle spektrumunda seçilen iyon değerleri ve alıkonma zamanları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Türevlendirilmiş metabolitlere ait bilgiler (m/z) (n=10).

Metabolit adı	Seçilen iyon (m/z)	Alıkonma zamanı* (dk)
2-HB-2TMS	131	9,05±0,02
PGA-2TMS	156	14,58±0,02
GA-3TMS	246	14,88±0,02
4-OHGA-3TMS	244	15,92±0,02
NAGA-2TMS	216	16,70±0,02
NCGA-2TMS	153	17,67±0,02

*Alıkonma zamanı: Ortalama alıkonma zamanı ± standart hata

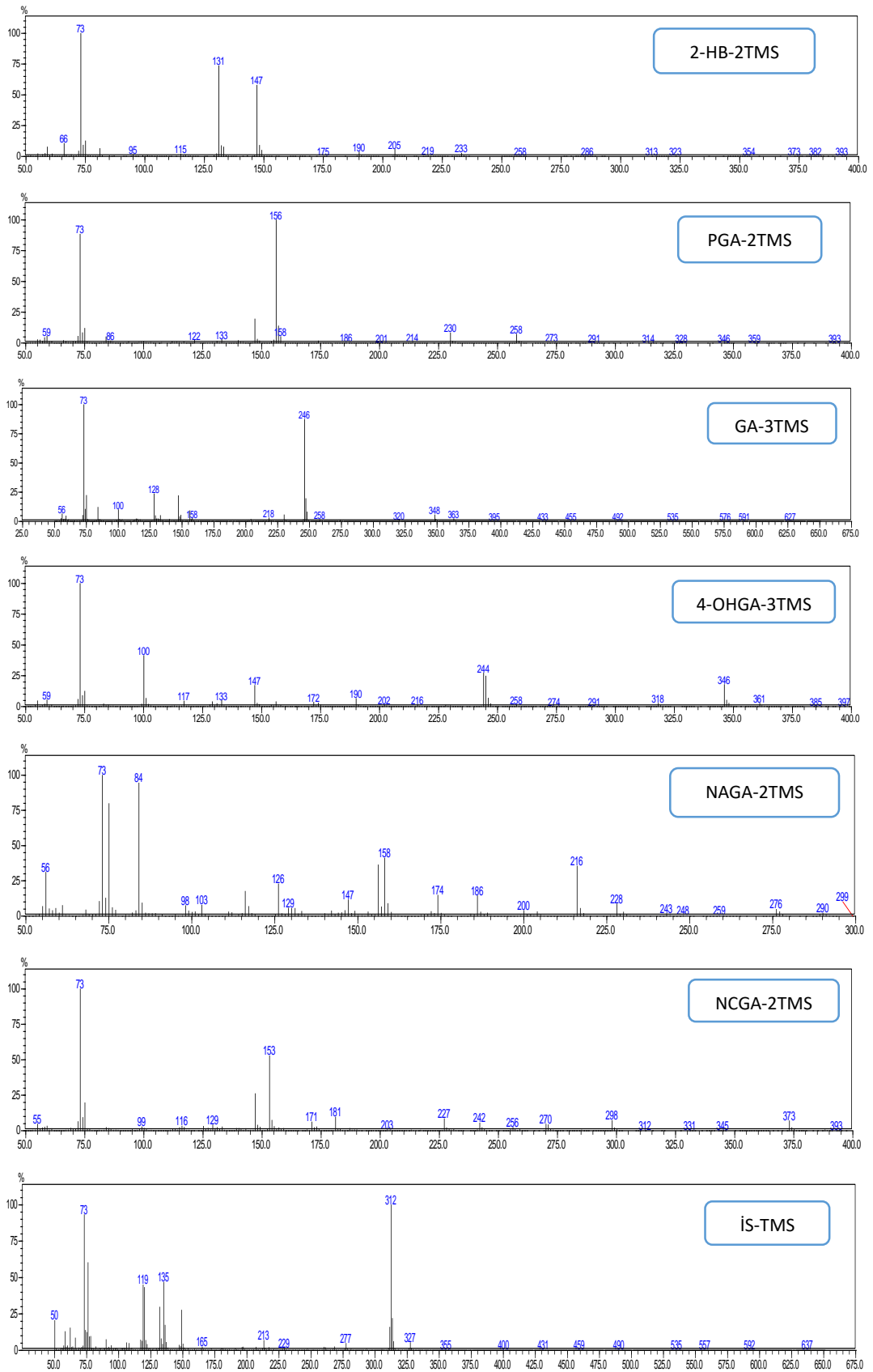
Elde edilen pik şekilleri ve alan değerlerinin karşılaştırılması sonucu pik simetrisinin en iyi ve türevlendirme veriminin en yüksek olduğu 37°C 20 dk türevlendirme şartları seçilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. MSTFA + %1 TMCS ile türevlendirmede sıcaklık ve sürenin optimizasyonu*.

	Süre (dk)	2-HB	PGA	GA	4-OHGA	NAGA	NCGA
37 °C	10	0.73	0.97	0.79	0.90	0.81	0.86
	20	0.99	0.99	0.88	0.94	0.91	1.00
	25	0.95	0.97	0.74	0.84	0.87	0.90
	30	0.92	0.66	0.78	0.77	0.71	1,35
	40	0.80	0.97	0.77	0.79	0.71	1,60
	Süre (dk)	2-HB	PGA	GA	4-OHGA	NAGA	NCGA
50 °C	10	0.84	0.71	0.83	0.83	0.71	0.94
	20	0.50	0.65	0.77	0.78	0.70	0.95
	25	0.54	0.65	0.74	0.74	0.69	0.90
	30	0.60	0.68	0.68	0.73	0.83	0.090
	40	0.66	0.65	0.76	0.77	0.71	1,96
	Süre (dk)	2-HB	PGA	GA	4-OHGA	NAGA	NCGA
60 °C	10	0.68	0.69	0.81	0.83	0.72	2,56
	20	0.93	0.65	0.76	0.76	0.71	0.66
	25	0.88	0.67	0.77	0.75	0.72	1,41
	30	0.74	0.65	0.77	0.74	0.70	0.78
	40	0.87	0.73	0.86	0.87	0.79	2,15

*Değerler pik asimetri oranı (PAO) olarak verilmiştir.

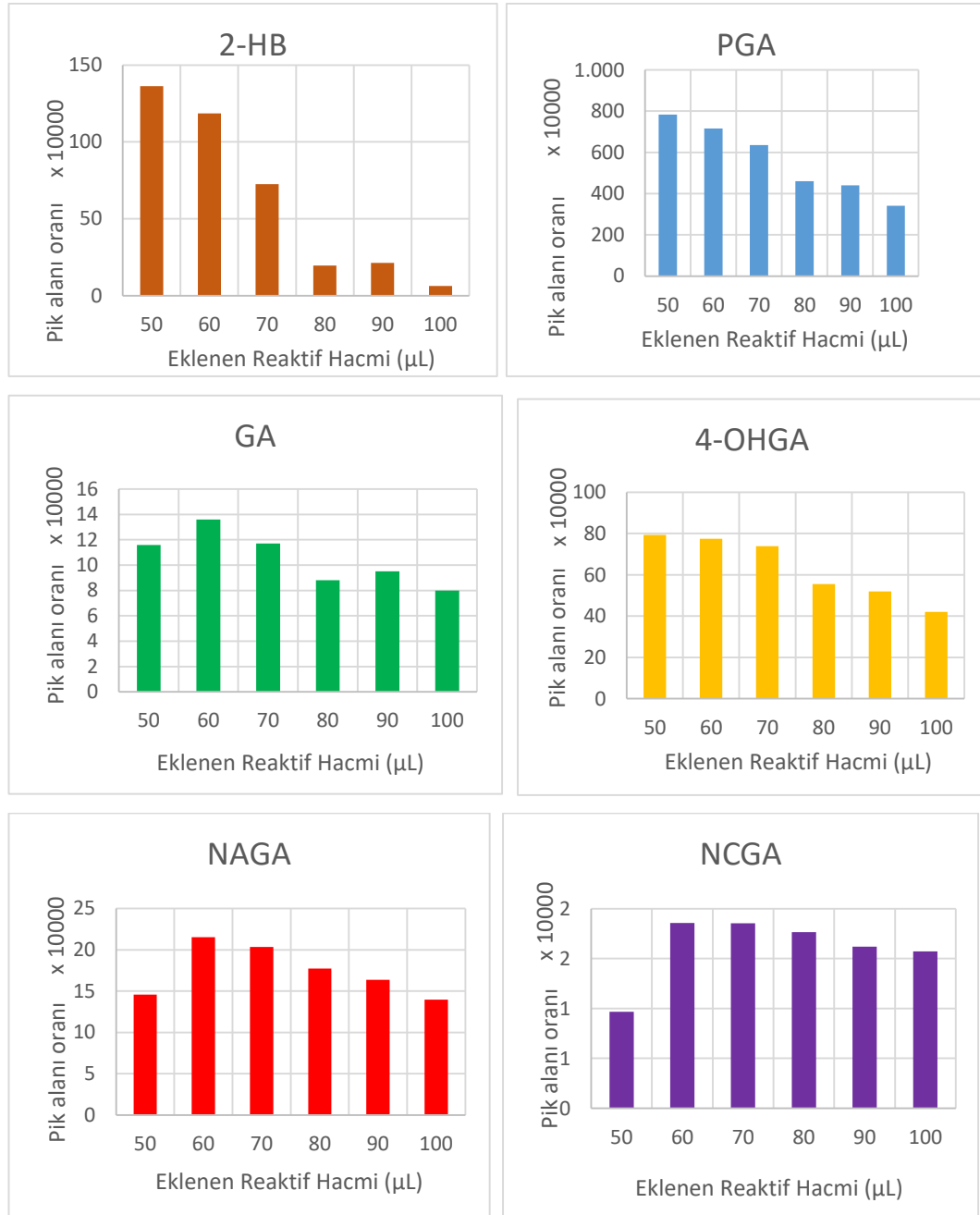
Altı metabolitin MSTFA + %1 TMCS türevlendirme reaktifi ile oluşturulan TMS türevlerine ilişkin kütle spektrumları Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Metabolitler ve iç standardın trimetilsilil türevlerine ait kütle spektrumları.

Türevlendirme Reaktif Miktarının Etkisi

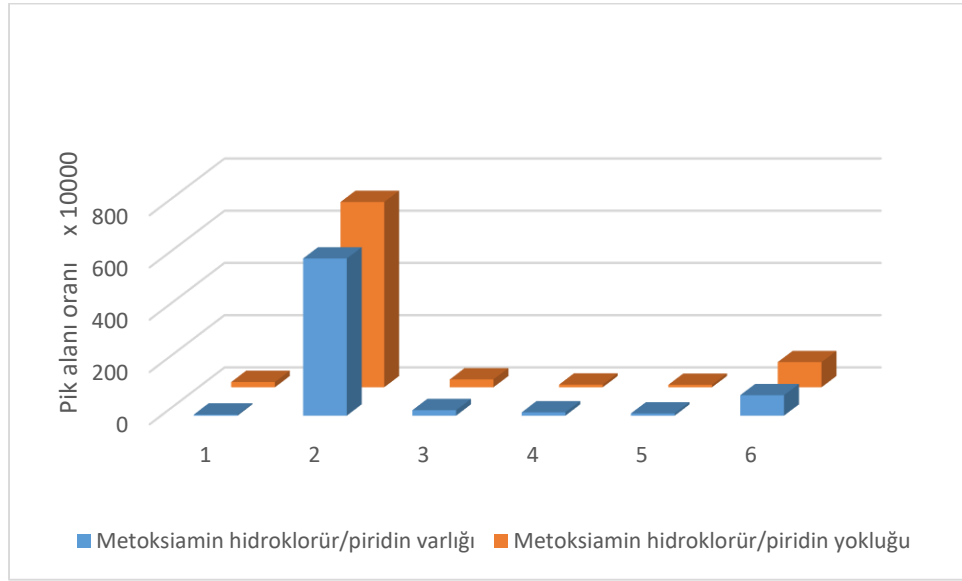
50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μL miktarlarda türevlendirme reaktifi kullanılarak yapılan analiz sonuçları ile optimum türevlendirme reaktif miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.3). Altı metabolit için pik alanlarının iç standart alanına oranı incelenerek 60 μL MSTFA + %1 TMCS reaktif hacminin en uygun hacim olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.3. MSTFA + %1 TMCS hacminin pik alanı oranına etkisi.

Metoksiaminasyonun Etkisi

Metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisinin türevlendirmeye etkisini belirlemek için türevlendirme tepkimesine metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi ilave edilerek ve ilave edilmeden türevlendirilmiş çözeltiler için analizler yapılmıştır. Metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi ilave edilmeden hazırlanan çözeltilere ait sonuçların daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisinin türevlendirmeye etkisi. (1:2-HB, 2:PGA, 3:GA, 4:4-OHGA, 5:NAGA, 6:NCGA)

Bu çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ışığında 2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA'nın GC-MS ile analizlerinde türevlendirme işleminin metoksiamin hidroklorür/piridin eklenmeden 60 µL MSTFA + %1 TMCS ilave edilip 37°C'de 20 dk bekletilerek yapılmasına karar verilmiştir.

4.1.2. Kromatografik Yöntem Koşullarının Optimizasyonu

2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA'nın GC-MS ile analizinde en uygun sıcaklık programını belirlemek için kromatografik analizlerde %5 difenil %95 dimetilpolisiloksan (30 m × 0,25 mm i.ç., 0,25 µm) kapiler kolon kullanılarak farklı sıcaklık programları denenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Fırın sıcaklık programlarının koşulları.

	Fırın baş. Sıcaklığı (°C)	Bekleme süresi (dk)	Sıcaklık artış oranı (°C/dk)	Fırının son sıcaklığı (°C)	Bekleme süresi (dk)	Analiz süresi (dk)
Koşul 1	60	1	10	325	5	32,5
Koşul 2	60	1	5	100		
			20	325	5	25,25
Koşul 3	60	1	5	100		
			10	150		
			60	325	5	21,92
Koşul 4	60	1	10	120		
			60	300	5	15
Koşul 5	60	1	10	200		
			30	320	5	24

Denenen her koşul için sistem uygunluk parametrelerinden k' , R ve PAO hesaplanmıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Farklı fırın sıcaklık programlarında sistem uygunluk parametreleri.

Koşul No	Sistem Uygunluk Parametresi	2-HB*	PGA*	GA*	4-OHGA*	NAGA*	NCGA**
1	k'	3,20	6,32	4,00	7,34	8,15	8,52
	R	1,00	2,42	1,40	1,44	2,78	2,58
	PAO	0,9	0,7	0,9	0,8	0,8	1,0
2	k'	5,81	4,81	9,49	9,83	9,95	10,63
	R	1,26	1,34	1,72	2,18	2,36	1,06
	PAO	0,9	0,7	0,9	0,9	0,9	0,9
3	k'	5,87	8,93	9,55	9,95	10,01	10,76
	R	2,42	1,06	1,90	2,22	2,44	2,86
	PAO	0,5	0,5	0,5	0,5	0,9	1,0
4	k'	4,09	7,25	7,07	8,71	9,21	9,41
	R	2,39	2,22	1,88	1,82	1,94	1,82
	PAO	0,9	0,9	0,9	0,8	0,9	0,9
5	k'	4,19	7,56	8,20	8,58	9,38	9,73
	R	1,96	2,38	2,20	2,12	1,98	1,88
	PAO	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

k':kapasite faktörü, R: ayırıcılık, PAO: pik asimetri oranı

*Ayırıcılık hesaplanmasında kendisinden bir sonra gelen pik komşu pik olarak değerlendirilmiştir.

**Ayırıcılık hesaplanmasında kendisinden önce gelen pik komşu pik olarak değerlendirilmiştir.

Sistem uygunluk parametreleri değerlendirildiğinde en uygun fırın sıcaklık programının 60°C fırın başlangıç sıcaklığında 1 dk bekletildikten sonra, dk'da 10°C artarak 200°C'ye ulaşan, daha sonra dk'da 30°C artarak 360°C'ye ulaşan ve son sıcaklıkta 5 dk bekletilen Koşul 5 olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Altı metabolit için analizlerde DB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) kapiler kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak He kullanılmış olup farklı akış hızları denenmiş; bu hızlara ait N ve H değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir. He gazının akış hızı 0,99 mL/dk olarak seçilmiştir.

Tablo 4.5. Akış hızı değişikliklerindeki teorik tabaka sayısı (N) ve teorik tabaka yüksekliği (H) değerleri.

Akış hızı (mL/dk)	2-HB	PGA	GA	4-OHGA	NAGA	NCGA
0,79	453737	1208241	1417052	1504057	1727647	1804186
0,99	415458	1147469	1343745	1436163	1667197	1746627
1,19	380442,2	1083265	1283236	1367964	1609853	1696246

*Değerler teorik tabaka sayısı (N) olarak verilmiştir.

Akış hızı (mL/dk)	2-HB	PGA	GA	4-OHGA	NAGA	NCGA
0,79	66,0	2,5	21,2	19,9	1,7	1,7
0,99	72,2	2,6	22,3	20,9	1,8	1,7
1,19	78,9	2,8	23,4	21,9	1,9	1,8

*Değerler teorik tabaka yüksekliği (H) (µm) olarak verilmiştir.

4.2. Sistem Uygunluk Testi (SUT)

2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA, NCGA ve iç standart (İS) için elde edilen sistem uygunluk testine ilişkin parametreler Tablo 4.6' da verilmiştir.

Tablo 4.6. Sistem uygunluk testi bulguları*.

	k'	R	N	PAO	BSS
2-HB	4,19	1,96	446224	1	0,18
PGA	7,56	2,38	1215286	1	0,23
GA	8,2	2,2	1417052	1	0,32
4-OHGA	8,58	2,12	1521769	1	0,43
NAGA	9,38	1,98	1784896	1	0,17
NCGA	9,73	1,88	1908819	1	0,22
İS	9,6	2,00	1862679	1	0,15

*Derişim: 40 µg/mL, k':kapasite faktörü, R: ayırıcılık, N:teorik tabaka sayısı, PAO: pik asimetri oranı, BSS: alıkonma zamanlarına ilişkin BSS değerleri (n=10).

4.3. Analiz Yönteminin Validasyonu

Türevlendirme basamağı ve kromatografik şartların optimize edilmesinden sonra Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu (US FDA)'nun biyoanalitik uygulamalar kılavuzuna göre yöntemin validasyon çalışmaları yapılmıştır (80).

Kararlılık

2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA maddelerinin kararlılık çalışmaları 40 µg/mL derişimde hazırlanan standart karışım çözeltisinin kısa dönem için oda sıcaklığında 6, 12, 24 s ve oto örnekleycide 24 s; stok çözeltilerin uzun dönem için dondurucuda (-20°C) bir ay bekletilmesi sonucunda (n = 3) kalan analit miktarları ve yüzde değişim oranları hesaplanarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.7).

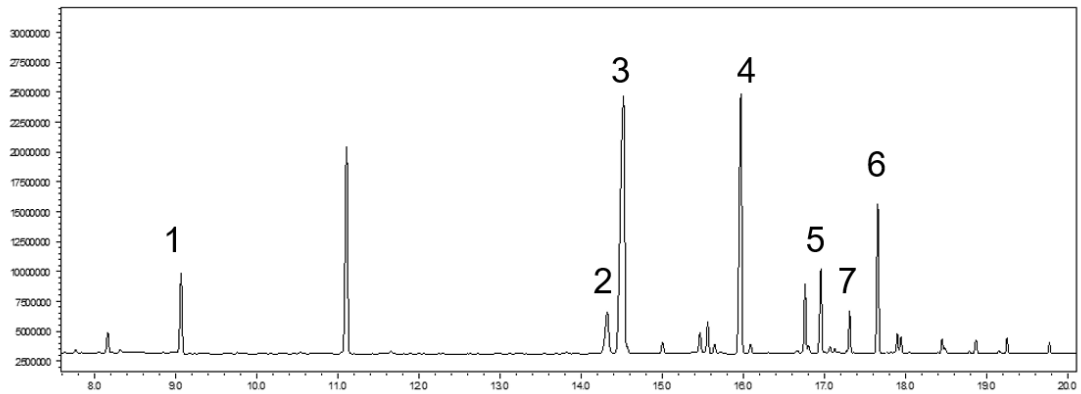
Tablo 4.7. Kararlılık testi sonuçları (n = 3).

Süre	2-HB		PGA		GA		4-OHGA		NAGA		NCGA		
	BM* (µg/mL)	GK** (%)	BM (µg/mL)	GK (%)	BM (µg/mL)	GK (%)	BM (µg/mL)	GK (%)	BM (µg/mL)	GK (%)	BM (µg/mL)	GK (%)	
Kısa dönem (oda sıcaklığı)	0 s	40,01	100,03	40,02	100,05	40,15	100,37	40,14	100,34	40,52	101,29	40,34	100,85
	6 s	39,82	99,56	40,01	100,03	39,98	99,94	40,03	100,07	40,16	100,40	40,25	100,63
	12 s	39,31	98,28	39,98	99,95	39,79	99,47	39,79	99,48	40,15	100,38	39,66	99,16
	24 s	39,35	98,37	39,95	99,86	39,77	99,43	39,71	99,28	40,10	100,25	39,48	98,69
Uzun dönem (-20°C)	1 ay	39,84	99,60	40,01	100,02	40,12	100,31	40,12	100,31	40,43	101,06	40,28	100,70
Oto örnekleyci	24 s	39,38	98,44	39,77	99,43	39,76	99,41	39,74	99,36	39,82	99,54	39,45	98,63

*BM: Bulunan miktar, **GK: Geri kalan

Özgünlük (Seçicilik)

2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA standart karışım çözeltilerinin artan derişimlerde yapılan analizlerinde kromatogramlarda her metabolite ait alıkonma zamanında tek bir pik görülmüş, alıkonma zamanlarının BSS değerlerinin 2'den az olduğu bulunmuş (Tablo 4.6), başka maddeye ait pik görülmemiş (Şekil 4.5) ve kromatogramda her metabolit için belirlenen alıkonma zamanı GC-MS kütüphanesindeki değerler ile eşleşmiştir.

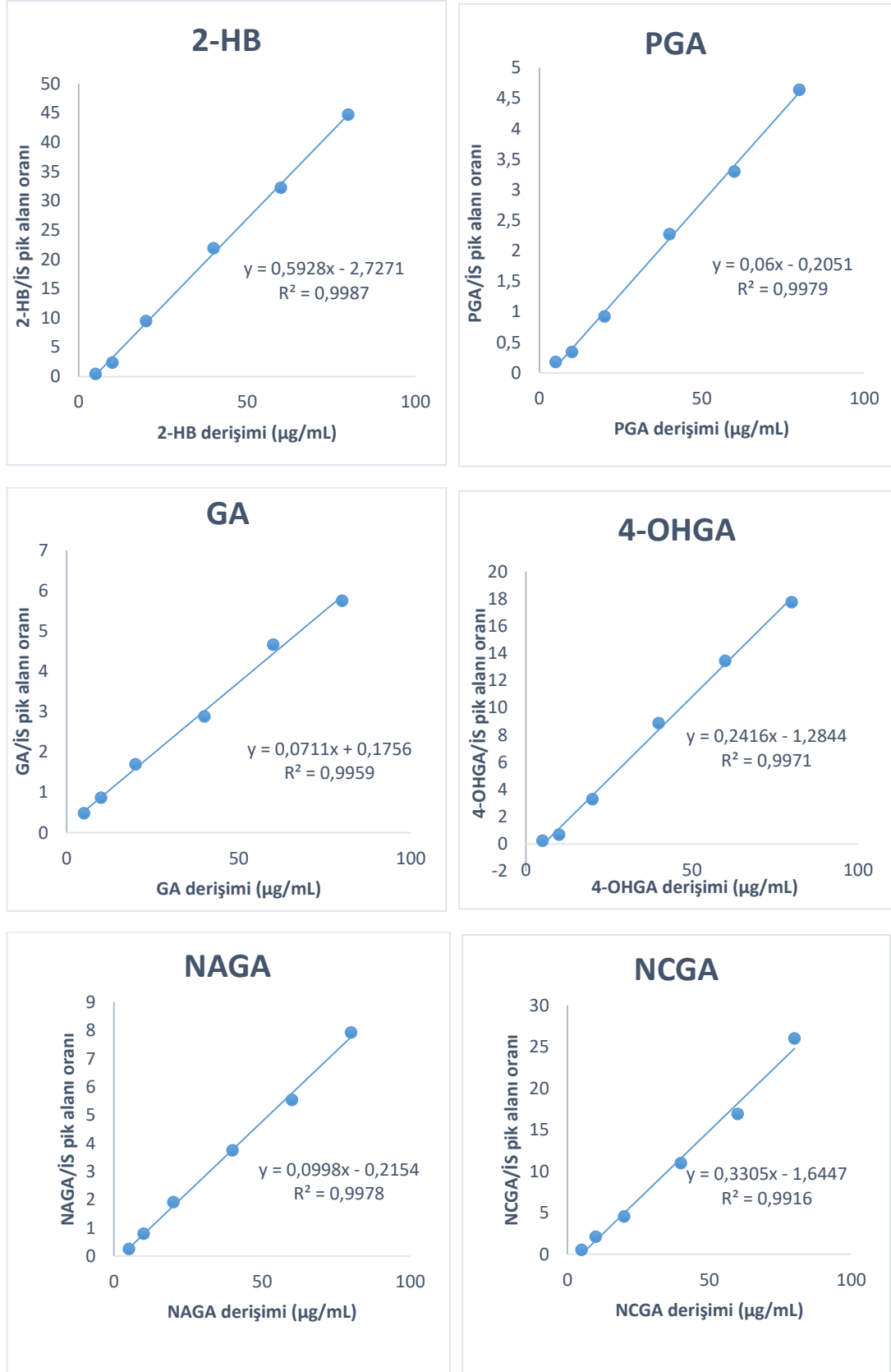


Şekil 4.5. Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile analizine ait kromatogram (1:2-HB, 2:PGA, 3:GA, 4:4-OHGA, 5:NAGA, 6:NCGA, 7:İS)

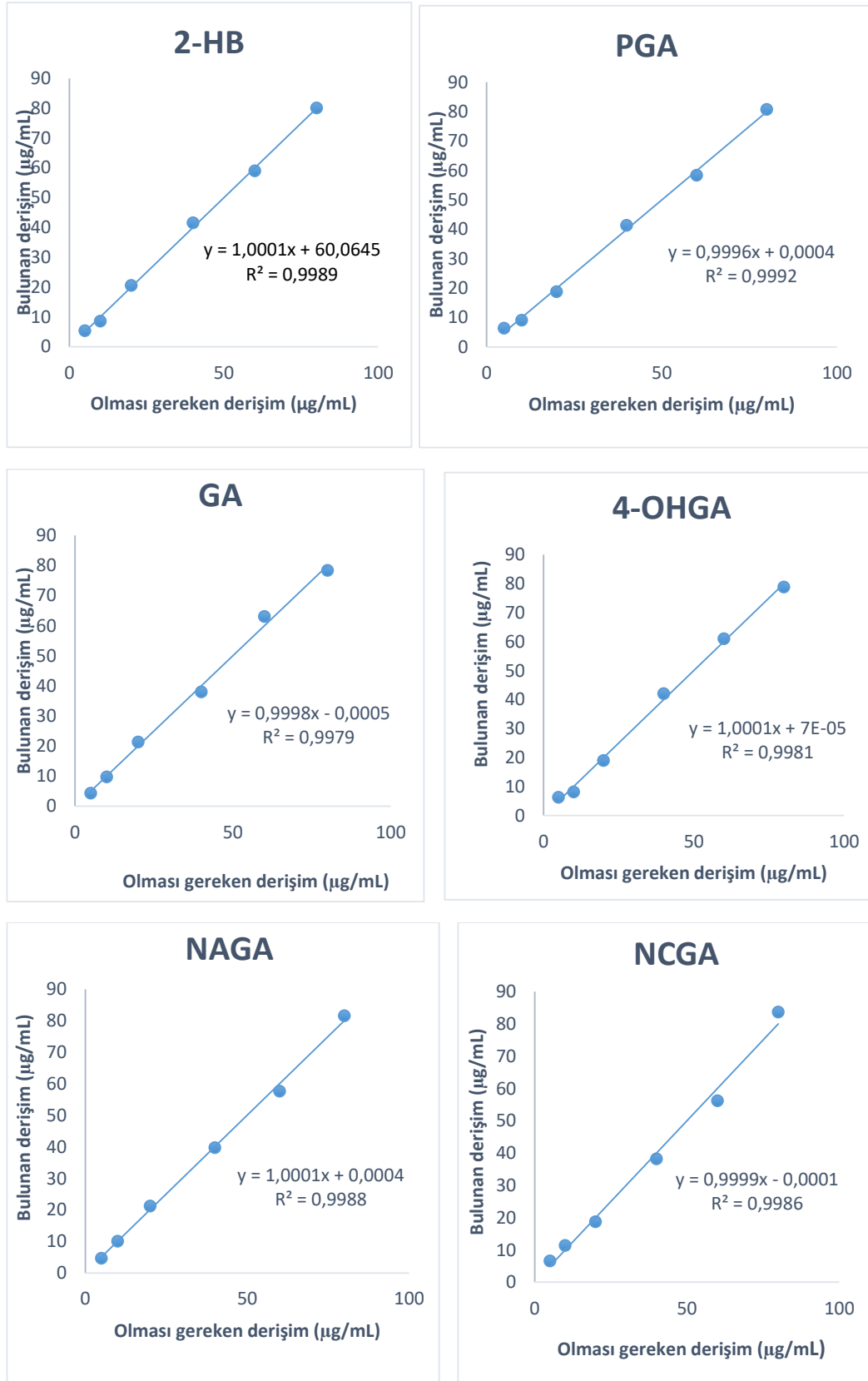
Doğrusallık

5-80 µg/mL derişim aralığında 2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA'nın standart karışım çözeltilerinin analizi ile oluturulan kalibrasyon eğrilerinin doğrusal olduğu görülmüştür (Şekil 4.6). Yöntemin doğrusallığının kontrolü için kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıklarının kontrol grafikleri Şekil 4.7'de verilmiştir.

Çalışılan metabolitlere ait kalibrasyon doğrularının ANOVA analiz sonuçları Tablo 4.8'de ve doğrusallık kontrol grafikleri ile oluşan doğruların analiz sonuçları da Tablo 4.9'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri.



Şekil 4.7. Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile elde edilen doğrusallık kontrol grafikleri.

Tablo 4.8. Metabolitlerin kalibrasyon doğrularının özellikleri.*

	a	b	p	R²	F
2-HB	0,5928	-2,7271	0,0049	0,9980	3000,7
PGA	0,0600	-0,2051	0,0292	0,9979	1912,3
GA	0,0711	0,1756	0,1600	0,9959	982,9
4-OHGA	0,2416	-1,2844	0,0117	0,9971	1379,8
NAGA	0,0998	-0,2154	0,1113	0,9978	1801,1
NCGA	0,3305	-1,6447	0,0733	0,9916	475,1

*y = ax+b (y=metabolit pik alanı / İS pik alanı; x = metabolit derişimi/İS derişimi; a= eğim; b= kesişim).
p: Kesişimin olasılık değeri, bütün metabolitler için 0.0000 < p; R²: Tanımlayıcılık katsayısı;p F: Varyans analizi için hesaplanan değeri.

Tablo 4.9. Metabolitlerin doğrusallık kontrol grafiklerine ilişkin özellikler*.

	a	b	p	R²	F
2-HB	1,0001	0,00006	0,9999	0,9989	2749,5
PGA	0,9996	0,0004	0,9997	0,9992	2025,7
GA	0,0998	-0,0005	0,9997	0,9979	3023,4
4-OHGA	1,0001	0,0001	0,9999	0,9981	2263,64
NAGA	1,0001	0,0004	0,9997	0,9988	1752,2
NCGA	0,9999	-0,0001	0,9999	0,9986	645,7

* $y = ax+b$ (y =metabolit pik alanı / İS pik alanı; x = metabolit derişimi/İS derişimi; a = eğim; b = kesişim).
 p : Kesişimin olasılık değeri, bütün metabolitler için $0.0000 < p$; R^2 : Tanımlayıcılık katsayısı; F : varyans analizi için hesaplanan değeri.

Altı metabolit için doğrusal aralık 5-80 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir.

Duyarlılık

Kalibrasyon eğrisinin kesişim değerinin standart sapması (σ) ve kalibrasyon doğrusunun eğimi (S) kullanılarak; $\text{LOD} = 3,3 \sigma / S$ ve $\text{LLOQ} = 10 \sigma / S$ formülleri ile gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı belirlenmiştir. LLOQ değerinin BSS ve BH değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Duyarlılık testi sonuçları (n = 6).

	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LLOQ ($\mu\text{g/mL}$)	*BSS	*BH
2-HB	1,31	3,96	0,42	-0,24
PGA	1,28	3,85	0,51	-1,24
GA	1,59	4,84	1,14	0,55
4-OHGA	1,57	4,76	1,7	-0,20
NAGA	0,32	0,96	1,38	0,84
NCGA	0,27	0,83	0,46	0,22

*LLOQ değerlerine ait hesaplamalar

Doğruluk

3 farklı derişimde (10, 40 ve 60 $\mu\text{g/mL}$) hazırlanan altı farklı seride çalışma standart çözeltilerinin analizine ilişkin gün içi ve günler arası doğruluk çalışmalarından elde edilen veriler kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve BH değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.11 ve 4.12).

Tablo 4.11. Gün içi kesinlik ve doğruluk verileri* (n= 6).

Derişim	2-HB	PGA	GA	4-OHGA	NAGA	NCGA
10 µg/mL	Veri aralığı (µg/mL)	9,95-10,21	9,91-10,19	9,89-10,28	9,76-10,26	9,90-10,61
	\bar{X}	10,05 ±0,71	10,07±0,15	10,08±0,43	10,05±0,15	10,10±0,64
	SS	0,11	0,11	0,14	0,17	0,26
	BSS	1,10	1,10	1,38	1,70	2,60
BH	0,54	0,50	0,73	0,84	1,51	0,99
40 µg/mL	Veri aralığı (µg/mL)	39,42-41,98	39,86-40,68	39,78-40,32	40,03-40,36	39,13-40,57
	\bar{X}	40,71±0,71	40,14±0,15	40,05±0,43	40,21±0,15	40,09±0,64
	SS	1,13	0,28	0,20	0,13	0,51
	BSS	2,78	0,71	0,50	0,32	1,28
BH	1,77	0,47	0,35	0,13	0,52	0,23
60 µg/mL	Veri aralığı (µg/mL)	58,99-61,02	60,02-61,53	59,95-60,65	59,53-60,43	58,24-60,43
	\bar{X}	59,89±0,71	60,39±0,15	60,21±0,43	60,07±0,15	59,47±0,64
	SS	1,05	0,57	0,25	0,29	0,77
	BSS	1,76	0,94	0,42	0,48	1,29
BH	-0,18	0,65	0,35	0,11	-0,89	

* \bar{X} : Ortalama(µg/mL ± standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma (%) ve BH: Bağlı hata (%).

Tablo 4.12. Günler arası kesinlik ve doğruluk verileri* (n= 6).

Derişim	2-HB	PGA	GA	4-OHGA	NAGA	NCGA
10 µg/mL	Veri aralığı (µg/mL)	10,01-10,14	9,81-10,27	9,99-10,05	9,29-10,39	9,66-10,19
	\bar{X}	9,96±0,71	10,00±0,15	10,03±0,43	10,00±0,15	9,90±0,64
	SS	0,41	0,17	0,03	0,38	0,22
	BSS	4,10	1,72	0,26	3,79	2,25
BH	-0,45	0,67	-0,01	0,31	-0,03	-0,97
40 µg/mL	Veri aralığı (µg/mL)	39,85-40,52	39,75-40,15	39,89-40,71	39,88-40,63	39,53-40,06
	\bar{X}	39,91±0,71	39,95±0,15	40,20±0,43	40,35±0,15	39,86±0,64
	SS	0,17	0,16	0,29	0,31	0,22
	BSS	0,41	0,40	0,72	0,77	0,56
BH	-0,23	0,65	-0,13	0,51	0,88	-0,36
60 µg/mL	Veri aralığı (µg/mL)	58,57-60,19	59,80-60,35	59,71-60,32	58,65-60,72	60,16-60,67
	\bar{X}	59,27±0,71	60,46±0,15	59,98±0,43	59,86±0,15	60,41±0,64
	SS	0,33	0,86	0,22	0,69	0,19
	BSS	0,56	1,42	0,37	0,16	0,32
BH	-1,21	-0,26	0,77	-0,03	-0,23	0,68

* \bar{X} : Ortalama(µg/mL ± standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma (%) ve BH: Bağıl hata (%)

Kesinlik

3 farklı derişimde (10, 40 ve 60 µg/mL) hazırlanan altı farklı seride çalışma standart çözeltilerinin analizine ilişkin gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen veriler kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve BSS değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.11 ve 4.12).

Enjeksiyon tekrarlanabilirliği için elde edilen veriler Tablo 4.13'de verilmiştir.

Tablo 4.13. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği verileri* (40 µg/mL) (n=10)

2-HB	\bar{X}	40,59±0,71
	SS	0,93
	BSS	2,28
PGA	\bar{X}	40,13 ±0,09
	SS	0,26
	BSS	0,66
GA	\bar{X}	40,02±0,15
	SS	0,08
	BSS	0,19
4-OHGA	\bar{X}	40,11±0,43
	SS	0,17
	BSS	0,44
NAGA	\bar{X}	40,23±0,15
	SS	0,13
	BSS	0,32
NCGA	\bar{X}	40,10±0,64
	SS	0,38
	BSS	0,96

* \bar{X} : Ortalama(µg/mL ± standart hata, SS: Standart sapma, BSS:Bağıl standart sapma(%)).

Tutarlılık, farklı analizci etkisi ile değerlendirilmiştir. 10 ve 60 µg/mL derişimlerdeki standart çözeltiler iki farklı analizci tarafından hazırlanmış ve aynı optimum deney koşullarında analiz edilerek sonuçları Tablo 4.14 ve Tablo 4.15'de karşılaştırmalı olarak verilmiş ve farkın anlamlılığı istatistiksel olarak gösterilmiştir (p < 0,05).

Tablo 4.14. Tutarlılık çalışmalarına ait bulgular*(10 µg/mL) (n = 6).

		1. Analizci	2. Analizci
2-HB	\bar{X}	10,47±0,71	10,31±0,71
	SS	0,11	0,16
	BSS	1,09	1,56
p =0,873, z=-0,16, U=17			
PGA	\bar{X}	10,16±0,09	10,16±0,09
	SS	0,1	0,1
	BSS	1,02	1,00
p =0,336, z=-0,96, U=12			
GA	\bar{X}	10,17±0,15	10,36±0,15
	SS	0,18	0,18
	BSS	1,77	1,70
p =0,109, z=-1,60, U=8			
4-OHGA	\bar{X}	10,25±0,43	10,337±0,43
	SS	0,13	0,13
	BSS	1,32	1,26
p =0,423, z=-0,80, U=13			
NAGA	\bar{X}	10,47±0,15	10,31±0,15
	SS	0,11	0,16
	BSS	1,09	1,56
p =0,109, z=-1,60, U=8			
NCGA	\bar{X}	10,34±0,64	10,47±0,64
	SS	0,12	0,18
	BSS	1,13	1,74
p =0,149, z=-1,44, U=9			

* \bar{X} : Ortalama (µg/mL) ± standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma (%)

Tablo 4.15. Tutarlılık çalışmalarına ait bulgular*(60 µg/mL) (n = 6).

		1.Analizci	2. Analizci
2-HB	\bar{X}	60,51±0,71	60,03±0,71
	SS	0,80	0,31
	BSS	1,32	0,52
p =0,336, z=-0,96, U=25			
PGA	\bar{X}	59,56±0,09	60,12±0,09
	SS	1,06	0,44
	BSS	1,77	0,72
p =0,423, z=-0,80, U=17			
GA	\bar{X}	60,34±0,15	59,99±0,15
	SS	0,84	0,89
	BSS	1,40	1,48
p =0,630, z=-0,48, U=24			
4-OHGA	\bar{X}	60,13±0,43	60,40±0,43
	SS	0,28	0,52
	BSS	0,47	0,86
p =0,149, z=-1,44, U=21			
NAGA	\bar{X}	59,83±0,15	60,31±0,15
	SS	0,42	0,39
	BSS	0,71	0,65
p =0,054, z=-1,92, U=17			
NCGA	\bar{X}	60,10±0,64	60,21±0,64
	SS	0,29	0,39
	BSS	0,49	0,65
p =0,630, z=-0,48, U=15			

* \bar{X} : Ortalama (µg/mL) ± standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma(%)

Sonuçlar Mann-Whitney U Testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. $|Z| < 1.96$, $P > 0.05$ ve $U_{Hesap} < U_{Tablo}$ (29) olduğundan iki analizci arasındaki farkın anlamsız olduğu ve yöntemin analizci değişimine karşın tutarlı olduğu belirlenmiştir.

Sağlamlık

Optimum deney koşullarındaki akış hızında (0,99 mL/dk) küçük değişiklikler yapılarak (0,79 ve 1,19 mL/dk) yöntemin sağlamlığı incelenmiştir. 10 ve 60 µg/mL derişimlerde hazırlanmış olan standart karışım çözeltileri analiz edilmiştir. Değişikliklere ait değerlendirmeler optimum deney koşullarında yapılan analizlerle karşılaştırılarak bulunan sonuçlar istatistiksel değerlendirmeleri ile Tablo 4.16'da verilmiştir.

Tablo 4.16. Sağlamlık çalışmalarına ait bulgular* (n = 3).

		2-HB	PGA	GA	4-OHGA	NAGA	NCGA
Akış hızı 0,79 mL/dk (10 µg/mL)	\bar{X}	10,35	10,30	10,42	10,11	10,29	10,31
	SS	0,18	0,46	0,14	0,36	0,30	0,08
	BSS(%)	1,77	4,41	1,33	3,58	2,90	0,80
	t _{Hesap}	0,05	1,19	3,76	0,56	0,97	0,63
Akış hızı 1,19 mL/dk (10 µg/mL)	\bar{X}	10,19	10,28	10,2	10,17	10,43	10,62
	SS	0,13	0,35	0,13	0,22	0,23	0,24
	BSS(%)	1,23	3,40	1,28	2,15	2,16	2,25
	t _{Hesap}	0,88	1,42	1,39	0,45	0,33	2,43
Akış hızı 0,79 mL/dk (60 µg/mL)	\bar{X}	60,19	60,96	60,16	59,15	60,25	59,88
	SS	0,53	0,52	0,94	0,63	0,27	0,34
	BSS(%)	0,89	0,85	1,57	1,06	0,45	0,57
	t _{Hesap}	0,80	2,42	0,37	2,53	1,78	0,38
Akış hızı 1,19 mL/dk (60 µg/mL)	\bar{X}	59,87	59,99	59,93	60,21	60,12	60,04
	SS	0,23	0,57	0,23	0,28	0,37	0,11
	BSS(%)	0,38	0,95	0,38	0,46	0,62	0,17
	t _{Hesap}	2,02	1,06	0,08	0,84	1,08	0,60

* \bar{X} : Ortalama (µg/mL), SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma (%), t_{Hesap}: Hesaplanan t değeri.

Sonuçlar tek tek optimum koşullarda elde edilen bulgular ile t-testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. $T_{\text{Tablo}} = 2,78 > t_{\text{Hesap}}$ ($p < 0,05$) olduğundan aralarındaki farkın anlamsız ve yöntemin gaz akış hızındaki değişimlere karşı sağlam olduğu bulunmuştur.

Taşınma

60 µg/mL derişimdeki çalışma standardının ardından analizi gerçekleştirilen boş çözeltide 2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA için sırasıyla bulunan miktarlar 0,10, 0,00, 0,74, 0,93, 0,11 ve 0,13 µg/mL'dir.

Geri Kazanım

2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA için 5, 10, 20 ve 40 µg/mL derişimlerdeki standart karışım çözeltilerinin eklendiği plazmalardan yapılan geri kazanım çalışmalarında elde edilen ortalama geri kazanım değerleri Tablo 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.17. Ortalama geri kazanım değerleri (n=3).

	Ortalama geri kazanım (%)
2-HB	92,81
PGA	98,91
GA	95,84
4-OHGA	108,91
NAGA	91,14
NCGA	93,95

5.TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında Preeklampsi hastalığının erken teşhisi amacıyla kullanılması önerilebilecek 2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA adlı hedeflenmiş metabolitlerin GC-MS ile aynı anda analizlerinin gerçekleştirildiği bir yöntem geliştirilmiş ve geliştirilen yöntem validasyon parametreleri doğrultusunda değerlendirilmiştir.

Yöntemin Optimizasyonu

2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA'nın GC-MS ile analizlerinde bileşiklerin daha uçucu ve kararlı hale gelmesi ve kromatogramdaki piklerin daha düzgün olması amacıyla türevlendirme işlemi yapılmıştır. Türevlendirme için MBTFA, MTBSTFA, MSTFA, MSTFA + %1 TMCS gibi farklı türevlendirme reaktifleri denenmiştir. Çalışılan metabolitlerin silil türevlerinin oluşması ve elde edilen sonuçların daha iyi olması nedeniyle çalışmalarda MSTFA + %1 TMCS reaktifi kullanılması seçilmiştir.

2-HB, GA, 4-OHGA ve NCGA trimetilsilil (TMS) türevlerinin kütle spektrumlarında temel iyon piklerin 73 m/z değerinde olduğu görülmüş ancak söz konusu pik türevlendirme reaktifine ait olması nedeniyle tanımlayıcı pik olarak alınmamış; 2-HB, GA, 4-OHGA ve NCGA için sırasıyla 131, 246, 244 ve 153 m/z değerlerindeki iyonlar seçilmiştir. PGA ve NAGA için seçilen iyonlar 156 ve 216 m/z değerinde olup aynı zamanda spektrumdaki temel piklerdir. Çalışılan altı metabolit için Şekil 4.2'de yer alan kütle spektrumlarında görülen ve Tablo 4.1' de belirlenen seçilen iyonlara ait olası parçalanma ürünlerinin aşağıda belirtilen şekilde olduğu öngörülmektedir.

- 2-HB-2TMS M(248)-CH₃CH₂=219, 219-OTMS=131
- PGA-TMS M(273)-OTMS =184, 184-CO=156
- GA-3TMS M (362)-CO-OTMS+H = 246
- 4-OHGA-3TMS M(379)-NH₂=363, 363-OTMS=274, 274-CO=246, 246-2H=244
- NAGA-2TMS M(333)-CO-OTMS=216
- NCGA-2TMS M(334)-CO-OTMS-CH₂=203, 203-NH-CO-NH₂=153

Türevlendirme basamağının optimizasyonu çalışmaları kapsamında ilk olarak 37, 50 ve 60°C sıcaklıkta 10, 20, 25, 30 ve 40 dk gibi farklı zaman dilimlerinde çalışmalar yapılmıştır. 50 ve 60°C sıcaklıklarda gerçekleştirilen analizlerde pik alanlarında ciddi bozulmaların olduğu görülmüş ve piklerin PAO'ları hesaplanmıştır. PAO değerleri göz önüne alındığında simetrik piklerin 37°C sıcaklıkta 20 dk bekletilerek elde edildiği görülmüştür.

Ayrıca MSTFA + %1 TMCS türevlendirme reaktifi için 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL miktarlar eklenerek analizler yapılmıştır. GA, NAGA ve NCGA için 60 µL'den az türevlendirme reaktifi kullanıldığında pik alanının azaldığı ancak 60 µL'den fazla kullanıldığında ise pik alanında önemli bir değişiklik olmadığı; 2-HB, PGA ve 4-OHGA için ise 60 µL'den az kullanımda pik alanında önemli bir değişiklik olmadığı ancak 60 µL'den fazla kullanımda pik alanında azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.3). Bu sonuçlar göz önüne alınarak en uygun türevlendirme reaktif hacmi olarak 60 µL seçilmiştir.

Türevlendirme basamağında MSTFA + %1 TMCS reaktifi eklenmeden önce 20 µL metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi eklenerek 30°C sıcaklıkta 90 dk bekletilmiş ardından MSTFA + %1 TMCS reaktifi eklenerek analiz gerçekleştirilmiştir. Sililleme sırasında aldehit veya keton grupları türevlendirmede metoksiamin kullanımı ile korunmaktadır. Aksi halde alfa-keto asitlerine ait karboksil gruplarından karbondioksit kaybı ve kromatogramda iki farklı pik oluşabilmektedir (82,83). Bu tez kapsamında metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisinin türevlendirmeye etkisini görmek amacıyla metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi eklenerek elde edilen sonuçlar, ekleme yapılmadan doğrudan MSTFA + %1 TMCS reaktifi eklenerek türevlendirilen çözeltilerin analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.4). Metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi eklenmeden doğrudan MSTFA + %1 TMCS reaktifi eklenerek yapılan çalışmaların pik alanlarının çok az da olsa daha iyi olduğu görülmüştür. Aynı zamanda metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisinin toksisitesi yüksek bir bileşik olduğu da göz önüne alınarak türevlendirme basamağının metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi eklenmeden yapılmasına karar verilmiştir.

Altı metabolitin kromatografik analizlerinde DB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) kapiler kolon kullanılmıştır. En uygun fırın sıcaklık programının belirlenmesi amacıyla Tablo 4.3'te verilen beş farklı sıcaklık programında analizler gerçekleştirilmiştir. Fırın sıcaklık programı açısından denenen her koşul için k' , R, PAO kromatografik parametreleri hesaplanmıştır (Tablo 4.4). Söz konusu sistem uygunluk parametrelerinden R'nin 2'den büyük, PAO'nun 1 olduğu, 60 °C'de 1 dk bekletildikten sonra, sıcaklık dk'da 10 °C artırılarak 200 °C'ye, ardından dk'da 30 °C artırılarak 320 °C'ye ulaştırıldığı ve bu sıcaklıkta da 5 dk bekletildiği fırın sıcaklık programı seçilmiştir.

Yapılan kromatografik koşul optimizasyon çalışmaları sonucunda toplam analiz süresi 24 dk'dır (Şekil 4.5). Metabolitlerden 2-HB, PGA, GA, NAGA ve NCGA türevlerinin GC-MS sistemiyle gerçekleştirilen analizinde alıkonma zamanları sırasıyla 9,05, 14,58, 14,88, 16,70 ve 17,67 dk olarak bulunmuştur. 2-HB, PGA, GA, NAGA ve NCGA metabolitlerine ait kaynama noktaları sırasıyla 124,56°C, 239,15°C, 333,8°C, 324°C ve 438°C'dir. Bu metabolitlerin molekül ağırlıkları ise sırasıyla 104, 129, 147, 189 ve 190'dır. Kaynak araştırmasında 4-OHGA'ya ait kaynama noktası verisine ulaşamamıştır. Söz konusu metabolitin molekül ağırlığı 163 ve kromatogramdaki alıkonma zamanı 15,92 dk olduğundan kaynama noktasının GA ve NAGA'nın kaynama noktaları arasında olabileceği düşünülmektedir. Sonuçta metabolitlerin alıkonma zamanları ile kaynama noktaları arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu değerlendirilmiştir.

Gaz kromatografisinde taşıyıcı gaz olarak Şekil 2.12'de de görüldüğü üzere en iyi doğrusal hız aralığına sahip olan He gazı taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır.

Standart karışım çözeltisi (10 µg/mL), He akış hızının 0,79, 0,99 ve 1,19 mL/dk olduğu durumlarda gerçekleştirilmiş ve verilerden akış hızının artması ile teorik tabaka sayısının (N) azaldığı ve teorik tabaka yüksekliğinin (H) arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.5). Van Deemter grafiği (Şekil 2.6) incelendiğinde optimum akış hızına H değeri minimum olduğunda ulaşılacağı görülmektedir. En düşük H değerine 0,79 mL/dk hızında ulaşılma ile birlikte bu akış hızında analiz süresinin uzadığı göz önüne alınarak He gazının akış hızı 0,99 mL/dk olarak seçilmiştir.

Kromatografik analizlerde enjeksiyon hacmi ve hızındaki belirsizlikler önemli bir problemdir. Özellikle GC'de sıcak bir bölgeye yapılan enjeksiyonda enjektör ucundaki buharlaşma, enjeksiyonu yapılan numune hacminde ciddi değişikliklere neden olabilir. Analiz sonrası elde edilen sonuçların güvenilirliğini artırmak için iç standart ekleme yöntemi kullanılarak numune enjeksiyonundan kaynaklanan hatalar en aza indirilebilmektedir. İç standart seçiminde, diğer bileşenlerin piklerinden iyi ayrılmış olmasına dikkat edilmelidir. Bu tez çalışması kapsamında radyo izotop işaretli, endojen olmayan miristik asit-d27 iç standart olarak seçilmiştir. Çalışılan altı metabolitin oluşan türevlerine ait alıkonma zamanları standart hata ile birlikte Tablo 4.1'de verilmiştir. Miristik asit-d27'nin alıkonma zamanı ise $17,3 \pm 0,02$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.5). Standart hatanın düşük olması yöntemin dış faktörlerden etkilenmediğini de göstermektedir.

GC-MS sistemi ile analize başlamadan önce ve belirli aralıklarla kalibrasyonu yapılmıştır. Sistem otomatik ayarı, uçuculuğu ve kararlılığı oldukça yüksek olan perfluorotributilamin (PFTBA) ile gerçekleştirilmiştir. Analize başlamadan önce Tablo 2.6'da verilen kabul kriterlerinin sağlandığı belirlenmiştir. Şekil 4.1'de GC-MS cihazından alınan otomatik ayar çıktısına ait bir örnek yer almaktadır.

Çalışılan GC-MS sisteminin, uygunluğu USP'ye göre değerlendirilmiştir (Tablo 4.6). Elde edilen değerlerin belirtilen sınırlar içinde $BSS < 1\%$, $k' > 2$, $R > 1,5$, $N > 2000$ ve $PAO < 1,5$ bulunmuş olması sistemin söz konusu metabolitlerin analizlerini gerçekleştirmek için uygun olduğunu göstermektedir.

Kromatografik Yöntem Validasyonu

Altı metabolitin aynı anda GC-MS ile analizini gerçekleştirebilmek için geliştirilen yönteminin kararlılık, özgünlük, doğrusallık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık, taşınma ve geri kazanım parametreleri ile sistem uygunluğu incelenerek validasyonu gerçekleştirilmiştir.

40 µg/mL derişimde hazırlanan standart karışım çözeltisinin kısa dönem için oda sıcaklığında 6, 12, 24 s ve oto örnekleyicide 24 s; stok çözeltilerin uzun dönem için dondurucuda (-20°C) bir ay bekletilmesi sonucunda (n = 3) kalan analit miktarları

ve aynı derişimde taze hazırlanan çözeltilerin analiz sonuçlarına göre yüzde değişim oranları hesaplanmıştır (Tablo 4.7). Söz konusu karşılaştırmada değişimin %2'den az olduğu ve bunun sonucunda metabolitlerin çalışılan koşullarda kararlı olduğu saptanmıştır.

2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA standart karışım çözeltilerinin artan derişimlerde yapılan analizlerinde kromatogramlarda her metabolite ait alikonma zamanında tek bir pikin görülmesi, alikonma zamanlarının BSS değerlerinin 2'den az olması (Tablo 4.6), başka maddeye ait pik görülmemesi (Şekil 4.5) ve kromatogramda her metabolit için belirlenen alikonma zamanın GC-MS kütüphanesindeki değerler ile eşleşmiş olması yöntemin seçici olduğu göstermiştir. GC-MS kütüphanesinde bulunmayan 4-OHGA için yöntem seçiciliği kaynak araştırmaları ve artan derişimlerde analizlerinin gerçekleştirilmesiyle değerlendirilmiştir.

Altı metabolite ait kalibrasyon eğrileri çizilmiş olup metabolitlerin 5-80 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu (Şekil 4.6) ve ayrıca doğrusallığın göstergelerinden biri olan tanımlayıcılık katsayısının (R^2)>0,9916 olduğu bulunmuştur. Olması gereken derişimlerin, analiz sonucunda elde edilen pik alanı oranı verilerinin kalibrasyon doğrusu denkleminde yerine konulmasıyla bulunan derişimlere göre grafiğe geçirilmesiyle derişim-sonuç arasındaki ilişkinin doğrusallığının kontrolü sağlanmıştır (Şekil 4.7). Çalışılan metabolitlere ait kalibrasyon doğruları (Tablo 4.8) ve doğrusallık kontrol grafikleri ile oluşan doğruların (Tablo 4.9) ANOVA analiz sonuçları da yöntemin doğrusallığını göstermiştir.

Duyarlılık çalışması kapsamında gerçekleştirilen analizlerde 2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA için LOD değerleri sırasıyla 1,31, 1,28, 1,59, 1,57, 0,32 ve 0,27 µg/mL; LLOQ değerleri ise sırasıyla 3,96, 3,85, 4,84, 4,76, 0,96 ve 0,83 µg/mL olarak bulunmuştur. LOD ve LLOQ değerleri yöntemin metabolitlerin plazmadan analizleri için yeterli duyarlılıkta olduğunu göstermektedir. Ayrıca LLOQ değerleri için BSS ve BH değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.10). Elde edilen sonuçlardan BSS değerinin en düşük %0,42 ve en yüksek %1,7 olduğu; BH değerinin ise en düşük %0,2 ve en yüksek %0,84 olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar biyoanalitik yöntem kılavuzlarında belirtilen %20

sınır değerinin altında olması tayin alt sınırı değerinde de yöntemin doğru ve kesin olduğunu göstermektedir.

10, 40 ve 60 µg/mL derişimlerde hazırlanan altı farklı seride çalışma standart çözeltilerinin analizine ilişkin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapılmıştır (Tablo 4.11 -Tablo 4.12). Bağıl hata değerleri gün içi en düşük %-0,89 en yüksek %1,77, günler arası en düşük %-1,21 ve en yüksek %0,88 olarak bulunmuştur. Gün içi kesinlik çalışmalarında BSS değeri en düşük %0,32, en yüksek %2,78 ve günler arasında da en düşük %0,16, en yüksek %4,10 olarak bulunmuştur. Elde edilen BSS ve BH değerlerinin %15'in altında bulunması geliştirilen yöntemin kesin ve doğru olduğunu göstermektedir.

Enjeksiyon tekrarlanabilirliği çalışmaları için 40 µg/mL derişimde on tekrarlı analizler gerçekleştirilmiş elde edilen sonuçlar üzerinden SS ve BSS değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.13). En düşük BSS değerinin %0,19, en yüksek BSS değerinin %2,28 olması enjeksiyon tekrarlanabilirliğinin bir göstergesidir.

Yöntemin kesinliği iki farklı analizci tarafından 10 ve 60 µg/mL derişimlerdeki standart çözeltilerin aynı optimum deney koşullarında analiz edilerek sonuçlarının Mann Whitney U testi uygulanarak karşılaştırılması ile de incelenmiştir (Tablo 4.14-Tablo 4.15). 2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA için U_{Hesap} değerleri sırasıyla (10 µg/mL) 17, 12, 8, 13, 8, 9; (60 µg/mL) 25, 17, 24, 21, 17, 15 bulunmuştur. $|Z| < 1.96$, $p > 0.05$ ve $U_{\text{Hesap}} < U_{\text{Tablo}}$ (29) olduğundan aralarındaki farkın anlamsız ve yöntemin analizci değişimine karşın tutarlı olduğunun saptanması yöntemin kesinliğini destekler niteliktedir.

Yöntemin sağlamlığı taşıyıcı gaz akış hızında değişiklikler yapılarak incelenmiştir. Değişikliklere ait değerlendirmeler optimum deney koşullarında yapılan analizlerle karşılaştırılarak bulunan sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri yapılmış (Tablo 4.16) ve t_{hesap} değerinin en düşük 0,04 ve en yüksek 2,53 olduğu görülmüştür. $t_{\text{tablo}} = 2,78 > t_{\text{hesap}}$ ($p < 0,05$) olduğundan aralarındaki farkın anlamsız ve yöntemin gaz akış hızındaki değişimlere karşı sağlam olduğu bulunmuştur.

60 µg/mL derişimdeki çalışma standardının ardından analizi gerçekleştirilen boş çözeltide 2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA için sırasıyla bulunan miktarlar

0,10, 0,00, 0,74, 0,93, 0,11 ve 0,13 µg/mL'dir. Bulunan bu miktarlar çalışılan altı metabolitin herbirine ait LLOQ değerin %20'sinden az olduğundan söz konusu taşınmanın ihmal edilebilir düzeyde olduğu görülmüştür.

Altı metabolit için 5, 10, 20 ve 40 µg/mL derişimlerdeki standart karışım çözeltilerinin eklendiği plazmalardan yapılan geri kazanım çalışmalarında elde edilen ortalama geri kazanım değerleri %91,14 - %108,91 arasında bulunmuştur (Tablo 4.17). Bu bulgular yöntemin doğruluğunu desteklemektedir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Preeklampsi hastalığının erken tanısında kullanılmak amacıyla hedeflenen altı metabolitin aynı anda analizleri için GC-MS yöntemi geliştirilmiştir.

Yapılan kaynak incelemelerinde glutamin, taurin, histidin, 3-hidroksivalerik asit, 2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA'nın preeklampsi hastalığının erken tanısında biyobelirteç olarak kullanılmak üzere önerilmekte olduğu saptanmıştır. Ancak mevcut GC-MS sistemi ile glutamin, taurin, histidin ve 3-hidroksivalerik asit için cevap alınamadığından tez çalışmasında hedeflenen 2-HB, PGA, GA, 4-OHGA, NAGA ve NCGA metabolitlerinin analizleri gerçekleştirilmiştir. Kaynaklarda bu altı metabolitin aynı anda analiz edildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca kaynaklarda 4-OHGA, NAGA ve NCGA'nın miktar tayinine ilişkin bilgi de yer almamaktadır.

Altı metabolitin GC-MS ile birarada analizlerinin gerçekleştirilmesinde DB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) kapiler kolon kullanılmıştır. Optimum kromatografik koşulların belirlenmesi için yapılan analizler sonucunda en uygun fırın sıcaklık programının; fırın sıcaklığının 60 °C'de 1 dk bekletildikten sonra, dk'da 10 °C artırılarak 200 °C'ye, ardından dk'da 30 °C artırılarak ile 320 °C'ye ulaşıldığı ve bu sıcaklıkta 5 dk bekletildiği program olduğu saptanmış ve analizler bu koşullarda gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak He kullanılmış olup gazın akış hızı 0,99 mL/dk'dır. Analizler bölmeli (1:10) enjeksiyon ile gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak miristik asit-d27 kullanılmıştır. Yapılan kromatografik optimizasyon çalışmaları sonucunda toplam analiz 24 dk'da tamamlanmıştır.

Geliştirilen yöntemin, biyoanalitik validasyon parametreleri (US FDA) açısından değerlendirilmesi sonucunda, altı metabolitin analizi için kararlı, özgün, doğrusal, duyarlı, doğru, kesin ve sağlam olduğu kanıtlanmıştır.

Bu tez çalışmasında altı metabolitin aynı anda GC-MS ile analizlerinin yapılabildiği bir yöntem geliştirilmesi ve yöntemin preeklampsi hastalığı olan gebelerden alınan kan örneklerine uygulanması hedeflenmiş idi. Ancak dünya genelinde etkisini gösteren ve kamu sağlığını ciddi derecede tehlikeye atan COVID-19

salgını nedeniyle preeklampsili hastalardan kan örneği toplanamamıştır. Bu nedenle tez kapsamında altı hedeflenen metabolitin aynı anda analizinin gerçekleştirildiği bir GC-MS yönteminin optimizasyonu ve validasyonu yapılmıştır.

Bilimsel kaynaklarda yer alması amaçlanarak geliştirilen yöntemin, preeklampsisi hastalığının erken teşhisi için biyobelirteç belirlenmesi konusunda yapılacak çalışmalara yol gösterici olacağı böylelikle maternal mortalite ve morbidite oranlarının azalmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Pierre A, Zaharatos J, Goodman D, Callaghan, WM. Challenges and opportunities in identifying, reviewing, and preventing maternal deaths. *Obstet gynecol* 2018; 131: 138-42.
2. Taşkın L. Riskli gebelikler. Doğum ve kadın sağlığı hemşireliği. Akademisyen Yayınevi, 13. Baskı, Ankara, 2016: 243-50.
- 3-Report of the National High Blood Pressure Education Program. Working group report on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: S1–22.
- 4- Ness, R. B., & Roberts, J. M. (1996). Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *American journal of obstetrics and gynecology*, 175(5), 1365-1370.
5. Brown, H. L., & Small, M. J. (2018). Overview of maternal mortality and morbidity updated: Jan 2018.
6. Bakanlığı, T. S. (2016). Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2016 Haber Bülteni. Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü, Ankara, 2017. Erişim: 13 Mart 2018.
7. Hoyert, D. L., & Miniño, A. M. (2020). Maternal mortality in the United States: changes in coding, publication, and data release, 2018.
8. Ferreira, M. B. G., Silveira, C. F., Silva, S. R. D., Souza, D. J. D., & Ruiz, M. T. (2016). Nursing care for women with pre-eclampsia and/or eclampsia: integrative review. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 50(2), 324-334.
9. Ozpak L. Preeklampsili ve Normal Gebelerde Anjiyotensin tip 2 Reseptör Geni A1675G ile İnterlökin 4 geni -590 (C>T) Polimorfizimlerinin ve Genotip Dağılımlarının Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Adana: Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2012.
10. Ozan, Y. D., Ertuğrul, M., & Okumuş, H. (2012). Preeklampsia Tanılama, Değerlendirme Ve Hemşirelik Yönetimi. *Cumhuriyet Hemşirelik Dergisi* 2012; 2:59-65.
11. Dix D. Hipertensive Disorders in Pregnancy. In: Lowdermilk LD, Perry ES, Cashion K, Alden RK (eds), *Maternity Womens and Health Care*. Canada 2012; 654-669.
12. Erçal, T. (2019). Şiddetli Preeklampsia Ve Eklampsia: Hastane Öncesi Tanı Ve Yönetimde Güncel Yaklaşımlar. *Hastane Öncesi Dergisi*, 4(1), 33-46.
13. Marcantel, D., Arnold, A. Callahan, A. (2016) , Preeclampsia and Eclampsia: Common Pitfalls in Diagnosis and Management. Edited by: Alex Koyfman, and Brit Long, <http://www.emdocs.net/preeclampsia-and-eclampsia-common-pitfalls-in-diagnosis-and-management>. Nisan 23,2019.
14. Taşkın L. Riskli Gebelikler. Taşkın L (Edt), Doğum ve Kadın Sağlığı Hemşireliği. Sistem Ofset Matbaacılık, Ankara, 2012; ss 288-296.
15. Khalil G. Hameed A. Preeclampsia: Pathophysiology and the maternal-fetal risk. *J Hypertens Manag* 2017, 1:1-5.

16. Oskay UG . Gebelik Komplikasyonu Gelişen Riskli Durumlar ve Hemşirelik Yaklaşımı. Kızılkaya NB, editör. Kadın Sağlığı ve Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2015; 447-472.
17. WHO. Recommendations for prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. [http:// apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44703](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44703). (1/12/2018).
18. Turgut A. Hellp Sendromu ve Ağır Preeklampsi Olgularında Maternal ve Fetal Sonuçların Karşılaştırılması [Uzmanlık Tezi]. Ankara: Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, 2008.
19. Li X, Xu Z, Lu X, Yang X, Yin P, Kong H, et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for metabolomics: Biomarker discovery for diabetes mellitus. *Analytica Chimica Acta*. 2009;633(2):257-62.
20. Kaplan, O., & Çelebier, M. (2020). Metabolomik Çalışmaların Dünü, Bugünü ve Yarını. *Türkiye Klinikleri. Tıp Bilimleri Dergisi*, 40(3), 366-374.
21. Meng, Q., Mäkinen, V. P., Luk, H., Yang, X. (2013). Systems biology approaches and applications in obesity, diabetes, and cardiovascular diseases. *Curr. Cardiovasc. Risk. Rep.* 7(1): 73-83.
22. Fiehn, O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*. 2: 155-168
23. Siddik, Y. B., Gurkan, H., Guz, U., Aygun, B. (2003). "A new modeling method of the ECG signals based on the use of an optimized predefined functional database". *Acta Cardiologica. Int. J. Cardiol.* 58 (3): 59-61
24. Gündoğdu, A. K., Karahan, A. G. (2008). Nutrigenomik teknolojileri. *SDÜ Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 33 (4): 183-191
25. De Hoog, C. L., Mann, M. (2004). Proteomics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 5: 267-2693.
26. Griffiths, W. J., Karu, K., Hornshaw, M., Woffendin, G., Wang, Y. (2007). Metabolomics and metabolite profiling: past heroes and future developments. *Eur. J. Mass. Spectrom.* 13: 45-50.
27. Klein, M. S., Shearer, J. (2015). "Metabolomics and Type 2 Diabetes: Translating basic research into clinical application." *Journal of Diabetes Research*. Article ID 824814.
28. Yaman, Ö. (2015). Hekimlikte Metabolomik Çalışmalara Genel Bir Bakış. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 3(1), 33-46.
29. Dettmer, K., Aronov, P. A., Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*. 26(1):51-78.
30. Zhou, B., Xiao, J. F., Tuli, L., & Ransom, H. W. (2012). LC-MS-based metabolomics. *Molecular Biosystems*, 8(2), 470-481.

31. Kouremenos, K.A., M. Johansson, and P.J. Marriott, Advances in gas chromatographic methods for the identification of biomarkers in cancer. *Journal of Cancer*, 2011. 3: p. 404-420.
32. Nemetlu, E., Zhang, S., Gupta, A., Juranic, N. O., Macura, S. I., Terzic, A., ... & Dzeja, P. (2012). Dynamic phosphometabolomic profiling of human tissues and transgenic models by 18O-assisted 31P NMR and mass spectrometry. *Physiological genomics*, 44(7), 386-402.
33. Nemetlu E, Juranic N, Zhang S, Ward LE, Dutta T, Nair KS, et al. Electron spray ionization mass spectrometry and 2D 31P NMR for monitoring 18O/16O isotope exchange and turnover rates of metabolic oligophosphates. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*. 2012;403(3):697-706.
34. Li X, Xu Z, Lu X, Yang X, Yin P, Kong H, et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for metabonomics: Biomarker discovery for diabetes mellitus. *Analytica Chimica Acta*. 2009;633(2):257-62.
35. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00357>. [Internet]. [Mayis 2015].
36. Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of nutrition*, 130(4), 1007S-1015S.
37. McEntee, W. J., & Crook, T. H. (1993). Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology*, 111(4), 391-401.
38. Figen Gürdöl EA. *Biyokimya: Nobel Tıp Kitabevleri*; 2013.
39. Geffaut, T., Bauer, U., Airola, K., & Koskinen, A. M. (1996). Asymmetric 1, 3-dipolar cycloaddition: Synthesis of N-protected (4S)-4-hydroxy L-glutamic acid diester. *Tetrahedron: Asymmetry*, 7(11), 3099-3102.
40. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Third Edition)*, 2021.
41. Chapel-Crespo, C. C., Diaz, G. A., & Oishi, K. (2016). Efficacy of N-carbamoyl-L-glutamic acid for the treatment of inherited metabolic disorders. *Expert review of endocrinology & metabolism*, 11(6), 467-473.
42. Lin, Z., Gonçalves, C. M. V., Dai, L., Lu, H. M., Huang, J. H., Ji, H., ... & Liang, Y. Z. (2014). Exploring metabolic syndrome serum profiling based on gas chromatography mass spectrometry and random forest models. *Analytica chimica acta*, 827, 22-27.
43. Keum, Y. S., Seo, J. S., Li, Q. X., & Kim, J. H. (2008). Comparative metabolomic analysis of *Sinorhizobium* sp. C4 during the degradation of phenanthrene. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(5), 863-872.
44. Chou, J., Liu, R., Yu, J., Liu, X., Zhao, X., Li, Y., ... & Sun, C. (2018). Fasting serum α -hydroxybutyrate and pyroglutamic acid as important metabolites for detecting isolated post-challenge diabetes based on organic acid profiles. *Journal of Chromatography B*, 1100, 6-16.

45. Liu, M. L., Zheng, P., Liu, Z., Xu, Y., Mu, J., Guo, J., ... & Xie, P. (2014). GC-MS based metabolomics identification of possible novel biomarkers for schizophrenia in peripheral blood mononuclear cells. *Molecular biosystems*, 10(9), 2398-2406.
46. Ranjbar, M. R. N., Luo, Y., Di Poto, C., Varghese, R. S., Ferrarini, A., Zhang, C., ... & Roy, R. (2015). GC-MS based plasma metabolomics for identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma in Egyptian cohort. *PLoS one*, 10(6), e0127299.
47. Özkan, E., Nemetlu, E., Beksac, M. S., & Kır, S. (2020). GC-MS analysis of seven metabolites for the screening of pregnant women with Down Syndrome fetuses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 188, 113427.
48. Aranha, B. C., Hoffmann, J. F., Barbieri, R. L., Rombaldi, C. V., & Chaves, F. C. (2017). Untargeted metabolomic analysis of *Capsicum* spp. by GC-MS. *Phytochemical Analysis*, 28(5), 439-447.
49. Belostotsky, R., Pitt, J. J., & Frishberg, Y. (2012). Primary hyperoxaluria type III—a model for studying perturbations in glyoxylate metabolism. *Journal of molecular medicine*, 90(12), 1497-1504
50. Yin, X., Subramanian, S., Willinger, C. M., Chen, G., Juhasz, P., Courchesne, P., ... & Levy, D. (2016). Metabolite signatures of metabolic risk factors and their longitudinal changes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(4), 1779-1789.
51. Alonso, E., García-Pérez, M. A., Bueso, J., & Rubio, V. (1991). N-acetyl-L-glutamate in brain: assay, levels, and regional and subcellular distribution. *Neurochemical research*, 16(7), 787-794.
52. Kelley, R. I., & Stamas, J. N. (1992). Quantification of N-acetyl-L-aspartic acid in urine by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of inherited metabolic disease*, 15(1), 97-104.
53. Evensen, A. S. (2012). Evaluation of Different MS-Based Methods for Urinary Metabolomic (Master's thesis, Institutt for biotecnology).
54. MEB,(2013). Kimya Teknolojisi, Kromatografik Analizler.
55. Gündüz, T. (2015). Kromatografi ve elektroforez. Gazi Kitabevi.
56. Prof. Dr. Ulvi Reha Fidancı. Kromatografi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi. <http://ulvireha.fidanci.org/kromatografi>.
57. Skoog DA, Holler FJoy, Nieman TAoy. Principles of instrumental analysis: Australia: Thomson, c2007. 6th ed.; 2007.
58. Burcu, E. S. E. R., & DİNÇEL, A. S. (2018). Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*, 2(2), 51-57.
59. Hishaw J. W. LCGC Nort America, Vlume 21 Number 6 June 2003.

60. Seidemann, J. (1963). Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 534 S., 147 Abbildungen, 2 Farbtafeln, 125 Tabellen, Kunststoffeinband DM 56,-.
61. Golay MJE. Gas chromatographic terms and definitions. *Nature*. 1958;182(4643):1146-7.
62. Dandeneau RD, Zerenner EH. An investigation of glasses for capillary chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1979;2(6):351-6.
63. "Definition of spectrograph". Merriam Webster. 1 Şubat 2020 tarihinde kaynağından arşivlendi. Erişim tarihi: 1 Şubat 2020.
64. Downard, K. (2007). *Mass spectrometry: a foundation course*. Royal Society of Chemistry.
65. Griffiths, J. (2008). A brief history of mass spectrometry. *Anal. Chem*, 80(15), 5678-5683.
66. Ryhage R. Use of a mass spectrometer as a detector and analyzer for effluent emerging from high temperature gas liquid chromatography columns. *Analytical Chemistry*. 1964;36(4):759-64.
67. Finnigan R, Hoyt D, Smith D. Special Report: Priority Pollutants. II – Cost effective analysis. *Environmental Science & Technology*. 1979;13(5):534-42.
68. Friedli F. Fused silica capillary GC/MS coupling: A new, innovative approach. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1981;4(10):495-9.
69. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning.
70. Rahman, M. M., Abd El-Aty, A. M., Choi, J. H., Shin, H. C., Shin, S. C., & Shim, J. H. (2015). Basic overview on gas chromatography columns. *Analytical Separation Science*, 823-834.
71. J & W Catalogue "Gas chromatography" 1998.
72. Rajawat, J., & Jhingan, G. (2019). Mass spectroscopy. In *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources* (pp. 1-20). Academic Press.
73. *Principles of Instrumental Analysis*, D.A.Skoog, D.M. West, II. Ed.
74. Beşergil, B. (2015), *Enstrümantal Analiz Temel İlkeler*. Gazi Kitabevi, Ankara.
75. *Technologies A. Mass Selective Detector USA 1999*.
76. Çolak, S. Türevlendirme Çeşitleri. *Fen Bilimleri Ve Matematikte Araştırma Ve Değerlendirmeler*,
77. United States Pharmacopoeial Convention TNFNUSP. *The National Formulary (NF 25): USP XXX: United States Pharmacopoeia*. Mack Printing.
78. Swartz M, Krull IS. *Handbook of analytical validation*. [electronic resource]: Boca Raton, Fla. : CRC Press, 2012.; 2012.

79. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*. 2003;987(1-2):57-66. Rockville. 2007.

80. United States Pharmacopoeial Convention TNFNUSP. The National Formulary (NF 25): USP XXX: United States Pharmacopoeia. Mack Printing Rockville. 2007.

81. US Department of Health and Human Services FaDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM):. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation 2001.

82. Catrinescu C, Fernandes C, Castilho P, Breen C. Selective methoxylation of α -terpinyl methyl ether over Al³⁺ ion-exchanged clays. *Applied Catalysis A: General*. 2015;489:171-9.

83. John MH, Daniel W, Anna MP, Raj KPP, Paul DF, Peter MB. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany*. 2005(410):219.

8. EKLER

EK 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

$$\text{Bağıl Standart Sapma (BSS)} = \frac{\text{Standart sapma}}{\text{Aritmetik ortalama}} \times 100$$

Bağıl Hata Hesaplanması

$$\text{Bağıl Hata (BH)} = \frac{(\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar})}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Standart Hata Hesaplanması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{\text{Standart sapma}}{\sqrt{\text{Ölçüm sayısı}}}$$

% Geri Kazanım Hesaplaması

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı

Tez basım

ORIGINALITY REPORT

25% SIMILARITY INDEX	25% INTERNET SOURCES	1% PUBLICATIONS	3% STUDENT PAPERS
--------------------------------	--------------------------------	---------------------------	-----------------------------

PRIMARY SOURCES

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	14%
2	dergipark.org.tr Internet Source	3%
3	www.gecekitapligi.com Internet Source	2%
4	sagens.erciyes.edu.tr Internet Source	1%
5	www.yumpu.com Internet Source	1%
6	Submitted to King Saud University Student Paper	1%
7	bilsenbesergil.blogspot.com Internet Source	1%
8	www.liyas.com.tr Internet Source	1%
9	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	<1%

EK 3. Dijital Makbuz



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Ayşe Kuş Kale
Assignment title: Ayşe Kuş Tez
Submission title: Tez basım
File name: TEZ_SON,_AYS_E_KUS.docx
File size: 1.42M
Page count: 92
Word count: 13,669
Character count: 90,865
Submission date: 23-Feb-2022 04:13PM (UTC+0300)
Submission ID: 1769093616

İÇİNİŞ ve AMAÇ

Gebelik, kadınlar için fizyolojik olayların yaşandığı doğal bir süreç olsa da gebelik komplikasyonlarının gelişmesi, zamanında ve uygun müdahale edilmesinininne bağlı olarak birçok gebre hayatını kaybetmektedir. Preeklampsi artan sistemik vasküler reaktivite, artmış trombotik agregasyonu, pihlajma sisteminin aktivasyonu ve endotelial disfonksiyon ile ilgili yerleşime anormal vasküler tepki ile karakterize olup nedeni bilinmeyen çok sistemli bir hastalıktır. Preeklampsinin klinik bulguları maternal veya fetal sendrom şeklinde kendini gösterebilir. Dünya çapında anne ölümünü nedenleri arasında ilk üç sırada yer alan preeklampsi, ülkemizde ise ikinci sırada yer almaktadır. Ancak hastalığın uygun yönetiminin sağlanması ile maternal morbidite ve mortalite oranları azaltılabilmektedir.

Metabolomik dolularda, hücrelerde ve fizyolojik sınırlarda ortaya çıkan metabolom içindeki metabolitlerin miktar ve dağılımlarının yüksek verimli teknolojilerle eş zamanlı, kapsamlı ve sistemli olarak belirlenmesidir. Omik analizlerin en yeni olan metabolomik analizler sayesinde hastalıkların erken teşhisi yapılarak kişiye özgül tedavi planlanabilmektedir.

Tez çalışmada, kaynak araştırmalarında preeklampsi hastalığının erken teşhisinde ayrıcı olabileceği düşünülen 2-hidroksi bükirik asit, piroglutamik asit, glutamik asit, 4-hidroksi glutamik asit, N-asetil L-glutamik asit ve N-karbamil L-glutamik asit metabolitleri seçilerek hedeflenmiş metabolomik çalışmaların gerçekleştirilmesine yönelik olarak bu metabolitlerin bir arada analizlerinin sağlanabilmesi için GC-MS yönteminin geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin plazma numunelerine uygulanmak amacıyla valide edilmesi planlanmıştır.

9. ÖZGEÇMİŞ