

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOWN SENDROMUNUN TANISINA YÖNELİK SEÇİLMİŞ  
METABOLİTLERİN GAZ KROMATOĞRAFİSİ KÜTLE  
SPEKTROMETRİSİ İLE TAYİNİ**

**Kim. Ece ÖZKAN**

**Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2017**

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOWN SENDROMUNUN TANISINA YÖNELİK SEÇİLMİŞ  
METABOLİTLERİN GAZ KROMATOĞRAFİSİ KÜTLE  
SPEKTROMETRİSİ İLE TAYİNİ**

**Kim. Ece ÖZKAN**

**Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Sedef KIR**

**ANKARA**

**2017**

**DOWN SENDROMUNUN TANISINA YÖNELİK SEÇİLMİŞ METABOLİTLERİN GAZ  
KROMATOĞRAFİSİ KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE TAYİNİ**

**Ece ÖZKAN**

Bu çalışma 21/06/2017 tarihinde jürimiz tarafından "Analitik Kimya Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

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



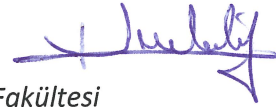
**Tez Danışmanı:** *Prof. Dr. Sedef KIR*  
*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*



**Üye:** *Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN*  
*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*



**Üye:** *Prof. Dr. Nursabah BAŞÇI*  
*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*



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



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

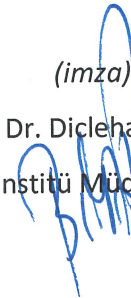
Tarih

14 Temmuz 2017

(imza)

Prof. Dr. Diclehan Orhan

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 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 metinleri yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

- x **Tezimin/Raporumun 14.07.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

- **Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

14/07/2017

  
Ece ÖZKAN

## ETİK BEYAN

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

  
Ece ÖZKAN

**Can'ım Oğluma**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesinde değerli bilgileri ve deneyimleri ile bana yol gösteren, tez çalışmamı titizlikle takip ederek desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sedef KIR'a,

Tez çalışmalarım boyunca bilgilerini, tecrübelerini paylaşan ve önerilerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya,

Numunelerin sağlanması ve yol göstericiliği için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Perinatoloji Bilim Dalı Sayın Prof. Dr. Sinan BEKSAÇ'a,

Ders dönemim ve tez çalışmalarım sırasında katkılarından dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı saygıdeğer hocalarına ve çalışma arkadaşlarıma,

Tüm yaşamım boyunca kalpleri devamlı benimle atan, bana daima güvenen, desteklerini hep hissettiğim sevgili annem Serda CİHAN ve kardeşim Cansu DÖNMEZOĞLU'na, her konuda bana destek olan ve hayatımı kolaylaştırmak için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan eşim Uğurcan ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Özkan E.,Down Sendromunun Tanısına Yönelik Seçilmiş Metabolitlerin Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi ile Tayini. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2017.** Down Sendromu, genetik düzensizlik sonucu insanın 21. kromozom çiftinde fazladan bir kromozom bulunması durumundan ortaya çıkan yaygın bir genetik bozukluktur. Metabolomik; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda küçük moleküllü metabolitlerin (moleküler ağırlığı <1000 Da) tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesidir. Metabolitler, biyokimyasal reaksiyonların ara ürünleridir ve canlı hücre içerisinde gerçekleşen birbirinden farklı birçok yolağın bağlanmasında rol alırlar. Tez çalışmasında Down Sendromunun erken tanısında ayırıcı olduğu düşünülen 2-hidroksi bütirik asit, 3-hidroksi bütirik asit,  $\beta$ -hidroksi izovalerik asit, Urasil, Glutamik asit, Maltoz ve Melezitoz metabolitleri seçilmiştir. Söz konusu metabolitlerin analizleri %5 difenil %95 dimetilpolisiloksan (30 m  $\times$  0,25 mm, 0,25  $\mu$ m) kapiler kolon ile 60°C (1 dk), 10°C dk<sup>-1</sup> ile 200°C sonra 30°C dk<sup>-1</sup> ile 320°C (6 dk) fırın sıcaklık programında, hareketli faz olarak helyum ve akış hızı 2,80 mLdk<sup>-1</sup> ve iç standart olarak miristik asit-d27 kullanılarak GC-MS yöntemi ile yapılmıştır. Geliştirilen yöntem, kararlılık, özgünlük, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, duyarlılık, sağlamlık, tutarlılık ve sistem uygunluk parametreleri değerlendirilerek valide edilmiştir. Geliştirilen ve valide edilen yöntem Down Sendromu tanısı konmuş hasta gebe ve sağlıklı gebelerden alınan plazmalara uygulanmış ve istatistiksel açıdan farklılaşmanın olduğu bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Down Sendromu, Metabolomiks, Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi



## ABSTRACT

**Özkan E., Determination of selected metabolites with gas chromatography-mass spectrometry for down syndrome diagnosis. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Analytical Chemistry Program, M.Sc., Thesis, Ankara, 2017**

Down Syndrome is a common genetic disorder arising due to the condition that humans having an additional chromosome within 21st chromosome couple. Metabolomics is identification and quantification of small molecule metabolites (molecular weight <1000 Da) presence in tissues, cells and physiological fluids within a certain period of time and determining their amounts. Metabolites are midproducts of biochemical reactions and take part in bonding metabolic paths, each different than each other, occurring in living cell. Considered to be differentiators of early diagnosis of Down Syndrome, 2-Hydroxybutyric acid, 3-Hydroxybutyric acid,  $\beta$ -Hydroxyisovaleric acid, Urasil, Glutamic acid, Maltose and Melezitose metabolites were chosen. Analysis of the metabolites were conducted by GC-MS method using %5 phenyl %95 dimethylpolisiloxan (30 m  $\times$  0,25 mm, 0,25  $\mu$ m) capillary column, at 60°C (1 min), 10°C min<sup>-1</sup> with 200°C and 30°C min<sup>-1</sup> with 320°C 6 min oven temperature program, as helium mobile phase and flow rate of 2,80 mL min<sup>-1</sup> and adding myristic acid-d27 as internal standard. Developed method was validated by parameters of stability, selectivity, linearity, accuracy, precision, repeatability, sensitivity, robustness, ruggedness and system compatibility. Developed and validated method was applied to plasma samples taken from pregnant diagnosed with Down Syndrome and healthy pregnant and found to be statistically different.

**Keywords:** Down Syndrome, Metabolomics, Gas Chromatography-Mass Spectrometry

## İÇİNDEKİLER

|  | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| ONAY SAYFASI   | iii          |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI   | iv           |
| ETİK BEYAN   | v            |
| TEŞEKKÜR   | vii          |
| ÖZET   | viii         |
| ABSTRACT   | ix           |
| İÇİNDEKİLER  | x            |
| SİMGELER VE KISALTMALAR  | xiii         |
| ŞEKİLLER   | xvi          |
| TABLolar   | xviii        |
| <b>1.GİRİŞ</b>   | <b>1</b>     |
| <b>2.GENEL BİLGİLER</b>  | <b>3</b>     |
| 2.1. Down Sendromu   | 3            |
| 2.2. Metabolomik Analizler   | 4            |
| 2.3. Metabolitler  | 5            |
| 2.3.1. 2-Hidroksi bütirik asit ( $\alpha$ -Hidroksi Bütirik Asit) (2-HB)                 | 5            |
| 2.3.2. 3-Hidroksi bütirik asit ( $\beta$ -Hidroksi Bütirik Asit) (3-HB)                  | 6            |
| 2.3.3. $\beta$ -Hidroksi İzovaleirik Asit (3-Hidroksi İzovaleirik Asit) ( $\beta$ -HIVA) | 7            |
| 2.3.4. Urasil (URA)  | 7            |
| 2.3.5. Glutamik asit (GLU)   | 8            |
| 2.3.6. Maltoz (MAL)  | 10           |
| 2.3.7. Melezitoz (MEL)   | 10           |
| 2.4. Seçilen Metabolitlerin Gaz Kromatografisi ile Analizleri                            | 13           |
| 2.5. Kromatografi  | 22           |
| 2.5.1. Kromatografi Türleri  | 22           |
| 2.5.2. Kromatografik Parametreler  | 24           |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) | 30        |
| 2.6.1. Gaz Kromatografisi (GC)                       | 31        |
| 2.6.2. Kütle Spektroskopisi (MS)                     | 41        |
| 2.6.3. Türevlendirme Teknikleri                      | 48        |
| 2.6.4. Numune Hazırlama                              | 51        |
| 2.6.5. Sistem Uygunluk                               | 52        |
| 2.6.6. Analitik Yöntem Validasyonu                   | 52        |
| <b>3. DENEYSEL KISIM</b>                             | <b>58</b> |
| 3.1. Kullanılan Cihazlar                             | 58        |
| 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler                    | 58        |
| 3.3. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler               | 59        |
| 3.4. Stok Çözeltilerin Hazırlanması                  | 60        |
| 3.5. Etik Kurul İzni                                 | 62        |
| 3.6. Plazma Numunelerinin Alınması ve Saklanması     | 62        |
| 3.7. Analiz Yöntemi                                  | 62        |
| 3.7.1. Protein Çöktürmesi                            | 62        |
| 3.7.2. Türevlendirme                                 | 62        |
| 3.7.3. Kromatografik Koşullar                        | 63        |
| 3.8. Sistem Uygunluk Testi (SUT)                     | 63        |
| 3.9. Yöntem Validasyonu                              | 64        |
| 3.9.1. Kararlılık                                    | 64        |
| 3.9.2. Özgünlük (Seçicilik)                          | 65        |
| 3.9.3. Doğrusallık                                   | 65        |
| 3.9.4. Doğruluk                                      | 65        |
| 3.9.5. Kesinlik                                      | 65        |
| 3.9.6. Duyarlılık (Gözlenebilme ve Alt Tayin Sınırı) | 66        |
| 3.9.7. Sağlamlık ve Tutarlılık                       | 66        |
| 3.10. Geri Kazanım                                   | 66        |
| 3.11. Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması         | 67        |

|  |     |
|--|-----|
| 3.12. Kalite Kontrol Kartları                        | 68  |
| 3.13. İstatistiksel Hesaplamalar                     | 68  |
| <b>4. BULGULAR</b>                                   | 69  |
| 4.1. Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu         | 69  |
| 4.2. Kromatografik Yöntem Koşullarının Optimizasyonu | 77  |
| 4.3. Protein Çöktürme Basamağının Optimizasyonu      | 77  |
| 4.4. Sistem Uygunluk Çalışması                       | 78  |
| 4.5.Yöntem Validasyonu                               | 78  |
| 4.6. Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması          | 96  |
| 4.7. Kalite Kontrol Kartları                         | 99  |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                   | 101 |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                          | 108 |
| <b>7. KAYNAKLAR</b>                                  | 110 |
| <b>8. EKLER</b>                                      | 118 |
| EK 1. Etik Kurul İzni                                |     |
| EK 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması        |     |
| <b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>                                   | 120 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>2-HB</b>          | 2-Hidroksi bütirik asit                          |
| <b>3-HB</b>          | 3-Hidroksi bütirik asit                          |
| <b>AC</b>            | Alternatif akım                                  |
| <b>AcAc</b>          | Asetoasetat                                      |
| <b>Akb</b>           | Atomik kütle birimi                              |
| <b>BH</b>            | Bağlı hata                                       |
| <b>BSS</b>           | Bağlı standart sapma                             |
| <b>BTFMBzBr</b>      | 3, 5-bis(triflurometil)benzil bromit             |
| <b>CE</b>            | Kapiler elektroforez                             |
| <b>CI</b>            | Kimyasal iyonizasyon                             |
| <b>C</b>             | Hareketli fazdaki madde derişimi                 |
| <b>CP Sil-19CB</b>   | % 14 Siyanopropil fenil-%86 dimetil polisiloksan |
| <b>C<sub>s</sub></b> | Sabit fazdaki madde derişimi                     |
| <b>CVS</b>           | Koryon villus örneklemesi                        |
| <b>DB-1</b>          | Dimetilpolisiloksan                              |
| <b>DB-17</b>         | % 17 fenil-%93 metilpolisiloksan                 |
| <b>DB-5</b>          | %5 fenil- %95 metilpolisiloksan                  |
| <b>DB-5MS</b>        | %5 difenil çapraz bağlı %95 dimetilpolisiloksan  |
| <b>DBWAX</b>         | Polietilen glikol, Rtx-5MS                       |
| <b>DC</b>            | Pozitif veya negatif doğru akım                  |
| <b>EI</b>            | Elektron yakalama                                |
| <b>EMA</b>           | Avrupa İlaç Ajansı                               |
| <b>F</b>             | Hacimsel akış hızı                               |
| <b>US FDA</b>        | Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu   |
| <b>FID</b>           | Alev iyonizasyon dedektörü                       |
| <b>GC</b>            | Gaz kromatografisi                               |
| <b>GC-MS</b>         | Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi          |
| <b>GLU</b>           | Glutamik asit                                    |

|                |   |
|----------------|---|
| <b>H</b>       | Eşdeğer tabaka yüksekliği                         |
| <b>HFBA</b>    | Heptafluobutirik anhidrit                         |
| <b>HFBA</b>    | Heptafluobutirik anhidrit                         |
| <b>HP-1</b>    | % 100 dimetilsiloksan                             |
| <b>HP-5</b>    | % 5 fenil- % 95 metilpolisiloksan                 |
| <b>HP-5MS</b>  | % 5 difenil çapraz bağlı % 95 dimetilpolisiloksan |
| <b>ICH</b>     | Uluslararası Harmonizasyon Konferansı             |
| <b>K</b>       | Dağılım katsayısı                                 |
| <b>k'</b>      | Kapasite faktörü                                  |
| <b>L</b>       | Kolon uzunluğu                                    |
| <b>LC</b>      | Sıvı kromatografisi                               |
| <b>LDH</b>     | $\alpha$ -ketobütirat'ın laktat dehidrojenaz      |
| <b>LOD</b>     | Gözlenebilme sınırı                               |
| <b>LOQ</b>     | Alt tayin sınırı                                  |
| <b>MAL</b>     | Maltoz  |
| <b>MBTFA</b>   | N-metil-bis(trifluoroasetamit)                    |
| <b>MEL</b>     | Melezitoz   |
| <b>MeOX</b>    | Metoksiamin hidroklorür                           |
| <b>MS</b>      | Kütle spektrometrisi                              |
| <b>MSD</b>     | Kütle Seçici Dedektör                             |
| <b>MSTFA</b>   | N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroasetamit        |
| <b>MTBSTFA</b> | N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroasetamit |
| <b>N</b>       | Teorik tabaka sayısı                              |
| <b>n</b>       | Enjeksiyon sayısı                                 |
| <b>NCI</b>     | Negatif kimyasal iyonizasyon                      |
| <b>NMR</b>     | Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi          |
| <b>PAO</b>     | Pik asimetri oranı                                |
| <b>PFPA</b>    | Pentafluoropropiyonik anhidrit                    |
| <b>PFTBA</b>   | Perfluorotributilamin                             |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>PLOT</b>                     | Gözenekli katmanlı açık kapiler             |
| <b>QC</b>                       | Kalite kontrol                              |
| <b>RF</b>                       | Radyo frekansı                              |
| <b>Rs</b>                       | Ayrıcılık                                   |
| <b>Rtx-5MS</b>                  | Difenil dimetilpolisiloksan                 |
| <b>SCOT</b>                     | Destek kaplı açık kapiler                   |
| <b>SIM</b>                      | Seçilmiş iyon taraması                      |
| <b>SPB-20</b>                   | %20 fenil-%80 dimetilpolisiloksan           |
| <b>SS</b>                       | Standart sapma                              |
| <b>SUT</b>                      | Sistem uygunluk testi                       |
| <b>TFA</b>                      | Trifluoroasetik asit anhidriti              |
| <b>TIC</b>                      | Toplam iyon taraması                        |
| <b>t<sub>M</sub></b>            | Ölü zaman                                   |
| <b>TMCS</b>                     | Trimetilklorosilan                          |
| <b>TMS</b>                      | Trimetilsilil                               |
| <b>TMSI</b>                     | <i>N</i> -Trimetilsililimidazol             |
| <b>t<sub>R</sub></b>            | Alıkonma zamanı                             |
| <b>u</b>                        | Çizgisel hız                                |
| <b>URA</b>                      | Urasil                                      |
| <b>USP</b>                      | Amerika Farmakopesi                         |
| <b>WCOT</b>                     | Çeperi kaplı açık kapiler                   |
| <b>WSCOT</b>                    | Çeperi kaplı yüksek kapasiteli açık kapiler |
| <b>ZB-5MS</b>                   | %5 fenil ariyen-%95 dimetilpolisiloksan     |
| <b><math>\alpha</math></b>      | Seçicilik                                   |
| <b><math>\alpha</math>-HBDH</b> | $\alpha$ -hidroksi bütirat dehidrojenaz     |
| <b><math>\beta</math>-HIVA</b>  | $\beta$ -hidroksi izovalerik asit           |
| <b><math>\bar{X}</math></b>     | Ortalama                                    |

## ŞEKİLLER

| Şekil |  | Sayfa |
|-------|--|-------|
| 2.1.  | Keton cisimlerinin karaciğerde sentezi                                       | 7     |
| 2.2.  | Glikojen sentezinde $\alpha$ -1,4 bağlarının oluşumu                         | 8     |
| 2.3.  | Glutamat dehidrojenaz tepkimesi  | 9     |
| 2.4.  | Serum glutamat-pirüvat ve serum glutamat-oksalasetat transaminaz tepkimeleri | 9     |
| 2.5.  | $\alpha$ -1,4 glikozid bağı ile MAL oluşumu                                  | 10    |
| 2.6.  | Kromatografinin sınıflandırılması  | 23    |
| 2.7.  | Tek bir standart madde için örnek kromatogram                                | 23    |
| 2.8.  | Tek bir numune için alıkonma zamanı ve ölü zaman                             | 24    |
| 2.9.  | Van Deemter eğrisi   | 27    |
| 2.10. | Ayırıcılığın seçicilik (a) ve kapasite faktörü (b) ile değişimi              | 28    |
| 2.11. | Pik asimetri oranının hesaplanması   | 29    |
| 2.12. | Elüsyon izotermeleri ve pik şekilleri  | 30    |
| 2.13. | Gaz kromatografisi cihazının temel kısımları                                 | 32    |
| 2.14. | GC'de kullanılan taşıyıcı gazlara ait Van Deemter grafikleri                 | 33    |
| 2.15. | Bölmeli enjeksiyon bloğu   | 34    |
| 2.16. | Bölmesiz enjeksiyon bloğu  | 35    |
| 2.17. | WCOT, PLOT, SCOT ve Dolgulu kolonlar   | 37    |
| 2.18. | Polisiloksan (a) ve polietilen glikol (b) kolonların yapısı                  | 39    |
| 2.19. | Kütle spektrometresinin temel kısımları                                      | 42    |
| 2.20. | Elektron çarpışma tekniği  | 44    |
| 2.21. | Kuadrapol kütle analizörü  | 45    |
| 2.22. | Otomatik ayar çıktısı  | 47    |
| 2.23. | Asetilleme tepkimesi   | 48    |
| 2.24. | Alkilleme tepkimesi  | 48    |
| 2.25. | Sililleme tepkimesi  | 49    |



|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 4.1.  | Metabolitler ve iç standardın trimetilsilil türevlerine ait kütle spektrumları                                  | 71  |
| 4.2.  | MSTFA+%1 TMCS miktarının pik alanına etkisi   | 74  |
| 4.3.  | Piridinin metoksiaminasyona etkisi  | 75  |
| 4.4.  | GC-MS yöntemi ile analiz edilen plazma numunelerine ait kromatogramlar  | 83  |
| 4.5.  | Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri   | 85  |
| 4.6.  | Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile elde edilen doğrusallık kontrol grafikleri                                     | 86  |
| 4.7.  | Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile elde edilen standart ekleme eğrileri   | 95  |
| 4.8.  | Hasta ve sağlıklı gebe plazma analizine ait örnek kromatogramlar (H1: Hasta gebeye ait K1: Sağlıklı gebeye ait) | 96  |
| 4.9.  | Hasta (H) ve sağlıklı (K) gebelere ait plazma metabolit miktarları ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                    | 97  |
| 4.10. | Hasta (H) ve sağlıklı (K) gebelere ait ortalama metabolit miktarları ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                  | 98  |
| 4.11. | Kalite kontrol kartları   | 100 |

## TABLOLAR

| <b>Tablo</b> |   | <b>Sayfa</b> |
|--------------|---|--------------|
| 2.1.         | Metabolitlere ilişkin moleküler özellikler  | 11           |
| 2.2.         | Seçilen yedi metabolit için GC ile yapılan analiz yöntemlerini içeren kaynaklar               | 14           |
| 2.3.         | GC için numune enjeksiyon tekniklerinin önemli özelliklerinin karşılaştırılması               | 35           |
| 2.4.         | GC’de kullanılan sabit fazlar   | 39           |
| 2.5.         | GC’de kullanılan dedektörlerin karakteristik özellikleri                                      | 41           |
| 2.6.         | PFTBA molekülüne ait parçalanma iyonlarının bağlı bollukları                                  | 46           |
| 2.7.         | Türevlendirme reaktifleri   | 49           |
| 2.8.         | SUT için geçerli parametreler ve değerleri  | 52           |
| 3.1.         | Geri kazanım için numune hazırlama  | 67           |
| 4.1.         | Metabolitlerin trimetilsilil türevlerine ait bilgiler (m/z)                                   | 69           |
| 4.2.         | MSTFA + % 1 TMCS ile silil türevi oluşturulmasında türev sıcaklığı ve süresinin optimizasyonu | 70           |
| 4.3.         | Metabolitlerin trimetilsilil türevlerine ait seçilen parçalanma ürünleri                      | 72           |
| 4.4.         | Fırın sıcaklık program koşulları  | 76           |
| 4.5.         | Farklı fırın sıcaklık programlarında sistem uygunluk parametreleri                            | 77           |
| 4.6.         | Asetonitril içeren çözücü sistemleri ile elde edilen tüketim verimleri (%)                    | 78           |
| 4.7.         | Sistem uygunluk testi bulguları   | 78           |
| 4.8.         | 1 µg mL <sup>-1</sup> standart karışım çözeltisi için kararlılık testi sonuçları (n = 3)      | 80           |
| 4.9.         | 10 µg mL <sup>-1</sup> standart karışım çözeltisi için kararlılık testi sonuçları (n = 3)     | 81           |
| 4.10.        | 10 µg mL <sup>-1</sup> plazma çözeltisi için kararlılık testi sonuçları (n = 3)               | 82           |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.11. | Metabolitlerin kalibrasyon doğrularının özellikleri                   | 87 |
| 4.12. | Metabolitlerin doğrusallık kontrol grafiklerine ilişkin özellikler    | 87 |
| 4.13. | Gün içi kesinlik ve doğruluk verileri (n= 6)                          | 88 |
| 4.14. | Günler arası kesinlik ve doğruluk verileri (n=6)                      | 89 |
| 4.15. | Enjeksiyon tekrarlanabilirliği verileri (1 µg mL <sup>-1</sup> , n=5) | 90 |
| 4.16. | Duyarlılık testi sonuçları (n = 6)                                    | 90 |
| 4.17. | Sağlamlık çalışmalarına ait bulgular (1 µg mL <sup>-1</sup> , n = 3)  | 92 |
| 4.18. | Tutarlılık çalışmalarına ait bulgular (1 µg mL <sup>-1</sup> , n = 6) | 94 |
| 4.19. | Ortalama geri kazanım değerleri (%)                                   | 96 |
| 4.20. | Hasta (H) ve sağlıklı (K) gebelere ait karşılaştırmalı sonuçlar       | 98 |

## 1. GİRİŞ

Down Sendromu, genetik düzensizlik sonucu insanın 21. kromozom çiftinde fazladan bir kromozom bulunması durumu ve bunun sonucu olarak ortaya çıkan yaygın bir genetik bozukluktur. Türkiye'de her canlı doğumdan ortalama 1/700 oranında Down Sendromu olan bebek dünyaya gelmektedir. Down Sendromu olasılığı annenin yaşı ile doğrusal olarak artmaktadır (1). Down Sendromu tanısı amniyosentez sırasında kromozom sayımı ve Koryon Villus Biyopsisi (CVS) adlı invaziv yöntemler ile konulmaktadır (2). Ancak bu invaziv yöntemler gebeliğin erken sonlanmasına (düşük) neden olabilmektedir. İnvaziv test yapılması gereken kişilerin daha iyi seçilmesi ile düşük riski en aza indirilebilir ve sadece yüksek riskli (pozitif) gebeliklerde invaziv tanı yöntemleri uygulanabilir. Bu tez çalışmasında, Down Sendromu tanısının, plazmadan bulunacak yeni metabolitler (biyobelirteçler) ile invaziv olmayan yöntemle yüksek kesinlikte belirlenmesi planlanmıştır. Böylece anne sağlığı korunup sağlıklı bireylerin doğmasına yapılacak katkı ile toplum sağlığının korunması amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada kaynaklarda Down Sendromu'nun tanısı için önerilen nitel analizi yapılan metabolitlerden 3-Hidroksi bütirik asit (3-HB) ve  $\beta$ -Hidroksi izovalerik asit ( $\beta$ -HIVA) ile birlikte Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen G014/173 no'lu proje kapsamında yapılan hedeflenmemiş metabolomik çalışmalar sonucunda, hasta ve sağlıklı gebelerde farklılaştığı belirlenen 2- Hidroksi bütirik asit (2-HB), Urasil (URA), Glutamik asit (GLU), Maltoz (MAL) ve Melezitoz (MEL) olmak üzere toplam yedi metabolit seçilmiştir.

Metabolomik; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda küçük molekülü metabolitlerin (moleküler ağırlığı <1000 Da) tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesidir. Metabolomik analizler, hedeflenmiş ve hedeflenmemiş analizler olarak gerçekleştirilmektedir. Hedeflenmemiş analizlerle hastalık tanı ve tedavisi için yeni belirteçlerin miktar tayinleri yapılmaktadır.

Kaynaklarda seçilen metabolitlerin bir arada tayinlerini içeren nitel veya nicel herhangi bir analiz yöntemi bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, seçilen yedi metabolitin Down Sendrom'lu hasta gebe ve sağlıklı gebelerde miktarların ne olduğu

ve nasıl bir farklılaşma gösterdiğinin bulunması amacıyla, seçilen metabolitlerin plazmadan bir arada analizleri için kromatografik davranışlarının incelenerek GC-MS ile yöntem geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin plazma analizlerine uygulanmak üzere valide edilmesi planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Down Sendromu

Trizomi 21 olarak da bilinen Down Sendromu, genetik düzensizlik sonucu insanın 21. kromozom çiftinde fazladan bir kromozom bulunması durumu ve bunun sonucu olarak ortaya çıkan yaygın bir genetik bozukluktur (3). Normalde, her bir insan hücresi 23 çift farklı kromozom içermektedir. Her bir kromozom vücudumuzun düzgün gelişimi ve bakımı için gereklidir. İnsanlarda 23 kromozom yumurta hücresiyle anneden ve 23 kromozom sperm hücresiyle babadan kalıtım yoluyla gelmekte ve toplamda normal gelişim için 46 kromozoma sahip olmak gerekmektedir. Down Sendromu'nda anneden kalıtsal yollarla gelen çift kopya kromozom, 21 babadan gelen tek kromozom 21 ile birleşince toplamda 3 kromozom 21 olmakta ve toplamda 47 kromozom bulunmaktadır. Bu bozukluğa Trizomi 21 adı verilmiştir. Trizomi 21 nedeniyle Down Sendromu olan kişiler, Down Sendromu'na sahip kişilerin %95'ini oluşturmaktadır. Down Sendromu'na neden olan bir diğer bozukluk ise translokasyondur. Down Sendromu olan kişilerin yaklaşık %3-4'ü translokasyon sebebiyle bu hastalığı taşımaktadır. Translokasyon 21. kromozomun başka bir kromozoma (genellikle 14. kromozoma) yapışması sebebiyle gerçekleşir. Bu durumda, ebeveynlerden gelen kromozom 2 tane 21. kromozom ve başka bir kromozoma yapışan fazladan kromozom 21 genleri vardır. Down Sendromu'nun bir diğer nedeni ise mozaiklemedir. Mozaiklemenin Down Sendromu'na etkisi %1'dir. Mozaiklemede, bazı hücreler 46 kromozom içerirken bazı hücreler fazladan 21. kromozoma sahip olması nedeniyle 47 kromozom içermektedir. Down Sendromu taşıyan kişilerin çoğunluğu hafıza ile ilgili problemleri ve öğrenme güçlüğü, kafa, yüz anormallikleri, kas gevşekliği sorunları yaşarlar. Bunlara ek olarak bazı Down Sendromu olan kişiler doğuştan kalp bozuklukları, lösemi, mide ve bağırsak bozuklukları taşırlar.

Türkiye'de her canlı doğumdan ortalama 1/700 oranında Down Sendromu olan bebek dünyaya gelmektedir. Down Sendromu olan çocuk sahibi olma olasılığı annenin yaşı ile doğrusal olarak artmaktadır. Günümüzde Down Sendromu'na sahip kişilerin sayısı artmakta olup bu durum annelerin çocuk sahibi olma yaşınının 35 yaş ve üzerine çıkmasıyla ilişkilendirilmektedir (1).

Down Sendromu tanısı amniyosentez sıvısında kromozom sayımı ve CVS adlı invaziv yöntemler ile konulmaktadır (2). Ancak bu invaziv yöntemler gebeliğin erken sonlanmasına (düşük) neden olabilmektedir. İnvaziv test yapılması gereken kişilerin daha iyi seçilmesi ve sadece yüksek riskli gruplara amniyosentez uygulanması ile düşük riski ve oluşabilecek komplikasyonlar en aza indirilebilir.

## 2.2. Metabolomik Analizler

Gelişmiş teknolojiler sayesinde yapılan genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik (omiks) tarama analizleri hastalıkların mekanizmasını detaylı olarak anlamak, onların erken tanısını kolaylıkla saptamak ve bireye özel tedavileri uygulamak için detaylı bilgiler verir. En yeni omiks teknolojisi, metabolomik analizlerdir.

Metabolom, bir hücre veya organizmadaki metabolizmanın tümü olarak tanımlanır. Metabolomik, metabolomda bulunan küçük molekülü metabolitlerin analitik teknikler kullanılarak yüksek duyarlılıkla saptanması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesidir.

Metabolitler, biyokimyasal tepkimelerin ara ürünleridir ve canlı hücre içerisinde gerçekleşen birbirinden farklı birçok yolağın bağlanmasında rol alırlar. Küçük moleküller, peptitler, oligonükleotidler, şekerler, nükleozidler, organik asitler, ketonlar, aldehitler, aminler, aminoasitler, lipitler, steroidler, alkaloidler ve ilaçlar, birer metabolit olup molekül ağırlıkları 1000 Da'dan daha küçüktür.

Metabolitlerin kandaki seviyesi, hücresel fonksiyonların işleyişi hakkında bilgi verir ve bu sayede genetik veya çevresel faktörlere bağlı hücrenin veya dokunun fenotipini açıklar. Özellikle son yıllarda, metabolomik çalışmalar; biyobelirteç tayininde, enzim substrat ilişkisinde, ilaç aktivite çalışmalarında, metabolik yolak analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Metabolit profillemeye çalışmaları; metabolit ayırım teknikleri olan gaz kromatografisi (GC), sıvı kromatografisi (LC) ve kapiler elektroforez (CE) ve metabolit tayin teknikleri olan kütle spektrometrisi (MS) ve nükleer manyetik rezonansspektroskopisi (NMR) analizlerinden oluşmaktadır.

Günümüzde metabolomik analizlerin özellikle kanser tanısında ve tedavisinde sıkça kullanıldığı gözlenmektedir. Metabolitler hastalıkların tanımlanması sırasında iyi birer biyobelirteç (biomarker) görevi yaparlar. Biyobelirteçler, vücut tarafından

üretilen ve vücut sıvılarında belirlenebilen özel bir süreci, durumu veya hastalığı belirten maddelerdir. Bu metabolitler sayesinde kişiye ve hastalığa özel tedavi yöntemleri uygulanabilmektedir. Sağlık bilimleri alanında devrim niteliğinde olan bu analizler, insan sağlığına verilen önemi kaynaklardaki çalışmalarda gözler önüne sermektedir (4-6).

### 2.3. Metabolitler

Bu tez çalışmasında, Down Sendromu'nun erken tanısında kullanılmak üzere kaynaklarda rastlanan 3-HB ve  $\beta$ -HIVA (7) ile "Down Sendromunun Yüksek Seçicilikte Tanısı İçin Metabolomik Yaklaşımlar" isimli Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen GO14/173 no'lu proje kapsamında seçici olduğu belirlenen 2-HB, URA, GLU, MAL ve MEL olmak üzere toplam yedi metabolit seçilmiştir.

#### 2.3.1. 2-Hidroksi bütirik asit ( $\alpha$ -Hidroksi bütirik asit) (2-HB)

2-HB,  $\alpha$ -ketobütirat'tan türetilen bir organik asittir. 2-HB'nin IUPAC adlandırılması, kapalı formülü, molekül ağırlığı, pKa, logP ve polarizasyonu, sudaki çözünürlüğü, erime noktası ve molekül yapısı Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

2-HB,  $\alpha$ -ketobütirat'ın laktat dehidrojenaz (LDH) ya da  $\alpha$ -hidroksi bütirat dehidrojenaz ( $\alpha$ -HBDH) tarafından katalize edilen tepkime aracılığıyla oluşumu sırasında yan ürün olarak ortaya çıkar (8).  $\alpha$ -ketobütirat ise aminoasit katabolizmasında (treonin ve metiyonin) ve glutatyon anabolizmasında sistein oluşum yolağında üretilir ve propiyonil-KoA ve karbon dioksitde metabolize olur. Temel olarak, treonin katabolize eden ya da glutatyon sentezleyen memeli hepatik dokular içinde oluşur. Oksidatif strese veya detoksifikasyona uğrayan karaciğerdeki ksenobiyotikler, hepatik glutatyon sentezi oranını çok fazla artırabilir. 2-HB, hem insülin direnci hem de artan lipid oksidasyonu ve oksidatif stres dolayısıyla ortaya çıkan bozulmuş glukoz toleransı için erken bir belirteçdir (8). Laktik asidoz ve ketoasidoz hastalarının idrarında bulunur. Yetersiz enerji metabolizması olduğunda vücuttaki derişimi yükselir (örneğin doğumdaki oksijensiz kalma) ve yeni doğan gelişimi sırasında merkezi sinir sistemini etkileyen metabolik hastalıklara aktarılır.

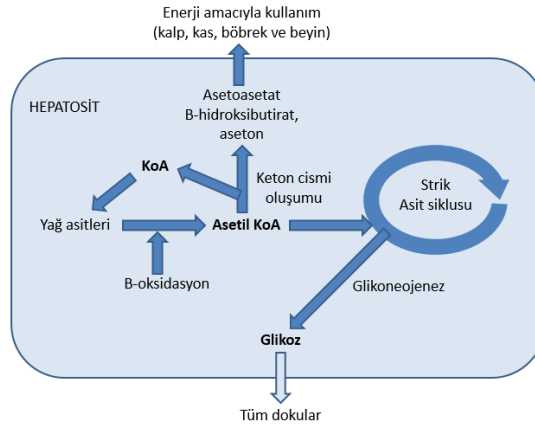


Son zamanlarda, plazmadaki yüksek 2-HB seviyelerinin erken evre tip II diyabet için iyi bir belirteç olduğu gözlenmiştir (9). 1970'lerin ortasında yapılan çalışmalardan, 2-HB'nin üretimindeki en önemli faktörün artan NADH/NAD oranı olduğu sonucu çıkarılmıştır (10).

### 2.3.2. 3-Hidroksi Bütirik Asit ( $\beta$ -Hidroksi Bütirik Asit) (3-HB)

3-HB, bir keton cisimciğidir ve asetoasetatın indirgenmiş şeklidir. 3-HB'nin IUPAC adlandırılması, kapalı formülü, molekül ağırlığı, pKa, logP ve polarizasyonu, sudaki çözünürlüğü, erime noktası ve molekül yapısı Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Karaciğerdeki asetil-KoA/KoA oranını dengelemek için ketojenaz olarak bilinen yolla, asetil KoA'ların asetat grupları, suda çözünen lipid türevleri olan keton cisimciklerine dönüşerek karaciğeri terkederken, serbest kalan KoA'lar yeni yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyona girmelerini sağlar. Kandaki glukoz miktarı düştüğü zaman kan yoluyla karaciğer dışı dokulara taşınarak sitrik asit siklusunda oksitlenir ve kalp, kas, böbrek ve beyin tarafından enerji kaynağı olarak kullanılır (Şekil 2.1). 3-HB, kandaki toplam keton cisimciklerinin %75-80'ini oluşturur (11). Kalıcı hafif hiperketonemi yenidoğanlar için yaygın bir bulgudur. Keton cisimcikleri, özellikle gelişen memelilerin beyin ve ciğerlerindeki ekstrahepatik dokular için vazgeçilmez bir enerji kaynağıdır. Ayrıca, bu cisimcikler kolesterol, yağ asitleri ve karmaşık lipidlerin sentezi için asetoasetil-KoA ve asetil-KoA sağlar. Doğum sonrası periyodun başlarında, asetoasetat (AcAc) ve 3-HB, beyin gelişimi ve miyelinasyon için gerekli fosfolipid ve sfingolipidlerin sentezinde substrat olarak glukoz yerine tercih edilir. Dolayısıyla doğum sonrası gelişimin ilk iki haftasında, kolesterolün biriktiği ve fosfolipidlerin hızlandığı zaman, lipidlerin içine bağlanan keton cisimciğin miktarı artar. Diğer yandan, bu artış aktif miyelinasyon periyodu boyunca serebrosid sentezi için kullanılır. Akciğerdeki fosfolipid sentezinde öncü olarak Ac glukozu göre daha etkili çalışır (11).



**Şekil 2.1.** Keton cisimlerinin karaciğerde sentezi

### 2.3.3. $\beta$ -Hidroksi İzovalerik Asit (3-Hidroksi İzovalerik Asit) ( $\beta$ -HIVA)

$\beta$ -HIVA, insanda bulunan, idrarla atılan bir metabolittir.  $\beta$ -HIVA'nın IUPAC adlandırılması, kapalı formülü, molekül ağırlığı, pKa, logP ve polarizasyonu, sudaki çözünürlüğü, erime noktası ve molekül yapısı Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

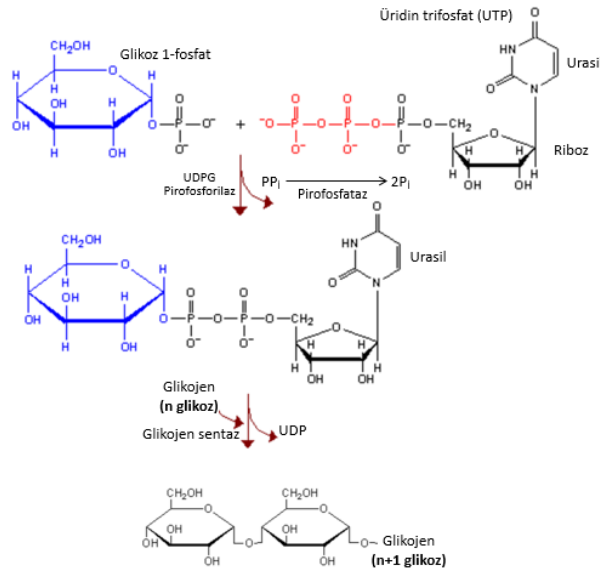
Bu bileşik, dihidrolipoamid dehidrojenaz eksikliği, 3-metilcrotonil-CoA karboksilaz 1 eksikliği, 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA liyaz eksikliği gibi çeşitli kalıtsal hastalıklarda yüksek seviyelerde bulunur.  $\beta$ -HIVA miktarı sigara içenlerde, karbamazepin ve/veya fenitoin ile antikonvülzan terapiye uzun süre maruz kalmış kişilerde artar. Çiğ yumurta beyazının uzun dönem tüketimi de artışa neden olur (12).

### 2.3.4. Urasil (URA)

URA çoğunlukla doğal olarak oluşan, pirimidin grubunda yer alan bir nükleotit olup sadece RNA'da bulunur. URA'nın IUPAC adlandırılması, kapalı formülü, molekül ağırlığı, pKa, logP ve polarizasyonu, sudaki çözünürlüğü, erime noktası ve molekül yapısı Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

URA adeninle baz çifti oluşturur ve DNA'daki timin ile yer değiştirir. URA'nın metilasyonu timini üretir. URA'nın vücut içindeki kullanımı, riboz ve fosfatlara bağlanarak hücre fonksiyonu için gerekli olan birçok enzimin sentezine yardımcı olmaktadır. Birçok önemli biyokimyasal tepkime için koenzim ve allosterik düzenleyici gibi davranır. Nükleozit bazından oluşan URA, üridin olarak adlandırılır; üridin difosfat ve üridin trifosfat, hayvanlardaki Karbamoil Fosfat Sentaz II

aktivitesini düzenler. Üridin difosfat-glikoz, glikojen sentezinde anahtar tepkime olup URA bu döngüde yer almaktadır (Şekil 2.2). URA, aldehytler içindeki şekerlerin aktarımında ve polisakkaridlerin biyosentezinde bulunur (11).

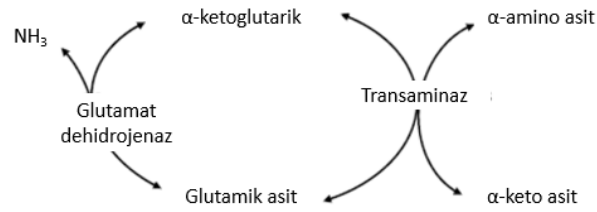


Şekil 2.2. Glikojen sentezinde  $\alpha$ -1,4 bağlarının oluşumu

### 2.3.5. Glutamik Asit (GLU)

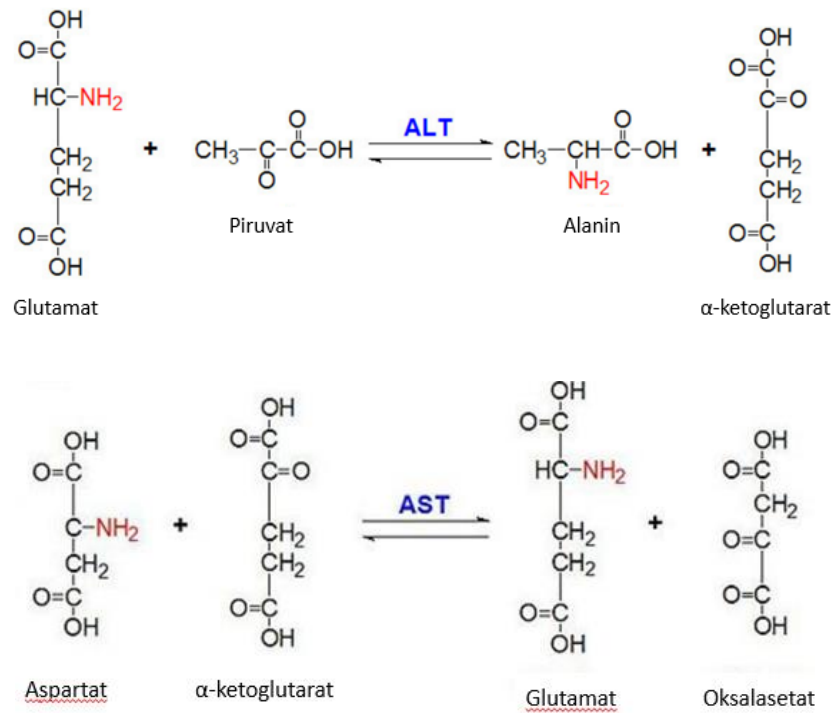
GLU, genellikle glutamat olarak adlandırılır, beyin ve omuriliğin başlıca uyarı vericisidir. GLU'nun IUPAC adlandırılması, kapalı formülü, molekül ağırlığı, pKa, logP ve polarizasyonu, sudaki çözünürlüğü, erime noktası ve molekül yapısı Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

GLU, beyindeki uyarıcı iletinin %75'inden sorumludur. Aminoasitlerin en önemli katabolik yolu, karbon iskeletinden yararlanmak için azotu uzaklaştırarak  $\alpha$ -keto asitlere dönüşmektir. Amin grubundan oluşan amonyak üreye dönüştürülerek vücuttan atılır. Bu olay, transaminasyon ve dezaminasyon tepkimeleri ile gerçekleştirilir. Transaminasyon tepkimesi ile aminoasitlerden azotun uzaklaştırılması döngüsünde, glutamat dehidrojenaz tepkimesi yer almaktadır (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Glutamat dehidrojenaz tepkimesi

Transaminasyonda amaç, amin grubunu tek bir aminoaside yönlendirmektir. Çift substratlı ve çift yönlü olan bu tepkimeye bir aminoasit ve  $\alpha$ -keto asit girer; aminoasidin amin grubu  $\alpha$ -keto aside aktarılır ve glutamat ile bir  $\alpha$ -keto asit oluşur. Transaminasyon glutamat oluşumu ile sonlanır (Şekil 2.4).



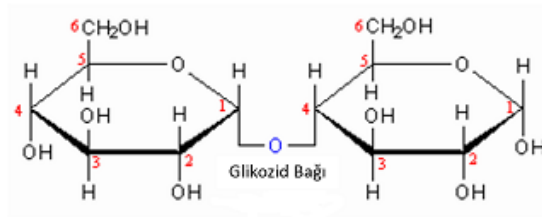
**Şekil 2.4.** Serum glutamat-pirüvat ve serum glutamat-oksalasetat transaminaz tepkimeleri

Glutamattan tek yönlü bir tepkime ile sentezlenen glutamin, karaciğer, lenfosit ve makrofaj mitokondrisinde glutamin katabolizmasında yer alır; aspartat ve asparagin sentezinde kullanılır (11).

### 2.3.6. Maltoz (MAL)

MAL ya da malt şekeri en basit disakkarittir. MAL'ın IUPAC adlandırılması, kapalı formülü, molekül ağırlığı, pKa, logP ve polarizasyonu, sudaki çözünürlüğü, erime noktası ve molekül yapısı Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

MAL, besinlerden alınan nişastanın pankreas ve tükürükte bulunan  $\alpha$ -amilaz tarafından hidrolizi sonucu ortaya çıkar. İki mol D-glikozun  $\alpha$ -1,4 glikozid bağı ile bağlanması sonucu oluşur (Şekil 2.5). MAL oluşumuna katılan glikozlardan birinin aldehit grubu (1.C) diğerinin alkol grubu (4.C) ile glikozid bağı oluşturur. Glikozid bağı oluşuktan sonra birinci glikozun serbest aldehit grubu yokken, ikinci glikozun 1.C'nu bağ yapımına katılmadığı için serbesttir. Sonuç olarak MAL'ın yapısında serbest bir aldehit grubu bulunur ve bu nedenle indirgen bir şekerdir. Suda kolaylıkla çözülür (11). MAL'a bir birim daha glukoz eklenirse maltotrioz ortaya çıkar. İlaveler maltodekstrinleri oluşturur ve en sonunda nişasta oluşur.



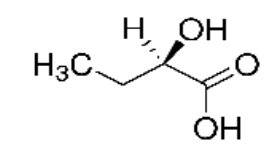
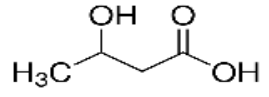
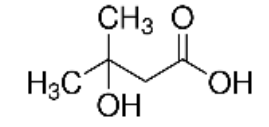
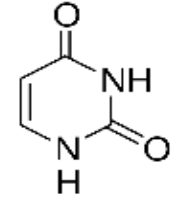
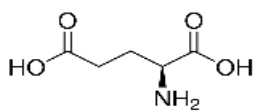
Şekil 2.5.  $\alpha$ -1,4 glikozid bağı ile MAL oluşumu

### 2.3.7. Melezitoz (MEL)

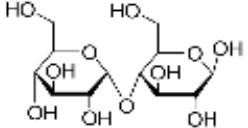
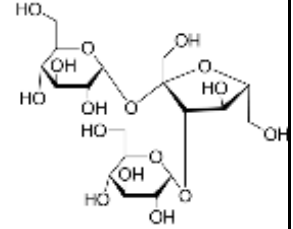
MEL, indirgenmeyen trisakkarit şekerdir. MEL'in IUPAC adlandırılması, kapalı formülü, molekül ağırlığı, pKa, logP ve polarizasyonu, sudaki çözünürlüğü, erime noktası ve molekül yapısı Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

MEL, yaprak bitleri dahil olmak üzere bitki özü yiyen böcekler tarafından enzim tepkimesi sonucu üretilir. Kendi su potansiyelini azaltarak ozmoz stresini düşürür; böylece böceklere fayda sağlar. MEL yaprak özsuynunun bir parçasıdır, arılar için bir yiyecek ve karıncalar için cezbedici olarak görev yapar. MEL, sakkarozun izomeri olan turanoz ve glukozu kısmen hidroliz olabilir (12).

**Tablo 2.1.** Metabolitlere ilişkin moleküler özellikler

| Maddeler | IUPAC adı                            | Kapalı formülü  | Molekül ağırlığı (g mol <sup>-1</sup> ) | pKa  | log P | Polarizasyon değeri (A <sup>3</sup> ) | Sudaki çözünürlüğü (mg mL <sup>-1</sup> ) | Erime noktası (°C) | Molekül yapısı  |
|----------|--------------------------------------|---|---|------|-------|---------------------------------------|---|--------------------|---|
| 2-HB     | 2-hidroksi bütanoik asit             | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>                | 104,10                                  | 3,99 | 0,05  | 9,98                                  | 484,00                                    | 44,20              |    |
| 3-HB     | 3-hidroksi bütanoik asit             | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>                | 104,10                                  | 4,41 | -0,39 | 10,10                                 | 539,00                                    | 46,00              |    |
| β-HIVA   | 3-hidroksi-3-metil bütanoik asit     | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>               | 118,13                                  | 4,55 | -0,11 | 11,75                                 | 384,00                                    | 65,00-67,00        |    |
| URA      | 1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2-4-dion | C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 112,09                                  | 9,77 | -0,86 | 9,37                                  | 26,50                                     | 330,00             |   |
| GLU      | (2S)-2-aminopentandioik asit         | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>               | 147,13                                  | 1,88 | -3,50 | 13,32                                 | 80,60                                     | 210                |  |

**Tablo 2.1.** Metabolitlere ilişkin moleküler özellikler

| Maddeler | IUPAC adı  | Kapalı formülü                                  | Molekül ağırlığı (g mol <sup>-1</sup> ) | pKa   | log P | Polarizasyon değeri (A <sup>3</sup> ) | Sudaki çözünürlüğü (mg mL <sup>-1</sup> ) | Erime noktası (°C) | Molekül yapısı   |
|----------|--|---|---|-------|-------|---------------------------------------|---|--------------------|--|
| MAL      | (2R,3S,4S,5R,6R)-2-(hidroksi metil)-6-[8.7.0.0 <sup>2</sup> ,7.0 <sup>11</sup> ,15]heptadekan-14-one | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> | 342,30                                  | 11,75 | -4,70 | 31,43                                 | 586,00                                    | 102,00-103,00      |   |
| MEL      | (2R,3R,4S,5S,6R)-2-oksolan-2-yl]oksi}-6-(hidroksi metil)oksan-3,4,5-triol                            | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub> | 504,44                                  | 11,86 | -6,30 | 46,29                                 | 781,00                                    | 153,00             |  |

#### 2.4. Seçilen Metabolitlerin Gaz Kromatografisi ile Analizleri

Çalışmamızda GC ile çalışılması planlanmış olduğundan, söz konusu metabolitlerin plazma ve serumdan sadece GC ile yapılmış olan analizleri tez kapsamında irdelenmiştir (Tablo 2.2).

Kaynaklarda, seçilen metabolitlerden 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL'ın tekli; 2-HB, 3-HB ve GLU'nun ikili ve üçlü; 2-HB ve URA'nın ikili analizlerinin serum ve plazmadan GC ile yapılmış olduğu görülmektedir. Ancak serum ve plazmadan MEL analizine rastlanmamıştır.

Söz konusu metabolitlerin HPLC (13), LC-MS (14), CE (15), UPLC (16) ve NMR (17) yöntemleri ile tekli, ikili ve üçlü analiz çalışmaları bulunmaktadır.

Kaynaklarda MEL'in GC-MS, LC-MS ve HPLC yöntemleriyle analizine rastlanmıştır (18-20). Ancak plazmadan GC yöntemi ile analizi bulunmamaktadır. Örneğin, Sanz ve arkadaşları, nektar bal ve tatlı balıdan MEL'in ve benzer şekerlerin nitel analizini GC-MS yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir (21).



**Tablo 2.2.** Seçilen yedi metabolit için GC ile yapılan analiz yöntemlerini içeren kaynaklar

| Metabolit           | Analitik Kolon<br>Fonksiyonel Grup  | Hareketli Faz /<br>Akış Hızı<br>(mL dk <sup>-1</sup> ) | Türevlendirme   | Fırın Sıcaklık Programı  | Enjeksiyon<br>Türü ve<br>Oranı | Detektör ve<br>İyonizasyon<br>Türü | Nitel-Nicel | Kaynak<br>No |
|---------------------|---|--|---|--|--------------------------------|------------------------------------|-------------|--------------|
| 2-HB                | Silika kapiler kolon<br>(30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)   | Helyum / 1.0   | MeOX / piridin<br>(50 µL, 60 dk, 70°C)<br>BSTFA<br>(100 µL, 60 dk, 70°C)  | 70°C (4 dk)<br>→ 8°C / dk<br>→ 300°C (3 dk)                                  | Bölmesiz                       | MS-EI                              | Nitel       | (22)         |
| 2-HB                | Ergitilmiş silika kapiler kolon<br>(30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)  | Helyum / 1.0   | BSTFA + %1 TMS<br>(100 µL, 60 dk, 90°C)                                   | 60 °C (3 dk)<br>→ 7°C / dk<br>→ 140°C (4 dk)<br>→ 5°C / dk<br>→ 300°C (1 dk) | Bölmesiz                       | MS-EI                              | Nitel       | (23)         |
| 2-HB                | Ergitilmiş silika kapiler kolonlar, DB-5<br>(30 m × 0,25 mm, 0,33 µm)<br>DB-17<br>(30 m × 0,25 mm, 0,11 µm) | Helyum   | MTBSTFA (60°C)  | 60 °C (2 dk)<br>→ 3°C / dk<br>→ 280°C  | Bölmeli<br>1 : 10              | MS-EI                              | Nitel       | (24)         |
| 2-HB                | Ergitilmiş silika kapiler kolon<br>(30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)  | 1,0  | MeOX/piridin<br>(960 dk, 25°C)<br>MSTFA + %1 TMCS<br>(30 µL, 60 dk, 25°C) | 70 °C (2dk)<br>→ 20°C / dk<br>→ 320°C (2 dk)                                 | -                              | MS                                 | Nitel       | (25)         |
| 2-HB<br>3-HB<br>GLU | Kapiler kolon<br>(25 m × 0,20 mm, 0,11 µm)  | Helyum / 0,5   | TEA (5 µL), toluen (20 µL) ve MTBSTFA<br>(20 µL, 60 dk, 25°C)             | 100 °C (2 dk)<br>→ 5°C / dk<br>→ 300°C                                       | Bölmeli<br>1 : 10              | MS-EI                              | Nitel       | (26)         |

| Metabolit           | Analitik Kolon<br>Fonksiyonel Grup                           | Hareketli Faz /<br>Akış Hızı<br>(mL dk <sup>-1</sup> ) | Türevlendirme  | Fırın Sıcaklık Programı   | Enjeksiyon<br>Türü ve<br>Oranı | Detektör ve<br>İyonizasyon<br>Türü | Nitel-Nicel  | Kaynak<br>No |
|---------------------|--|--|--|---|--------------------------------|------------------------------------|--|--------------|
| 2-HB<br>URA<br>(27) | HP-5MS kolon<br>(29 m × 250 µm, 0,25 µm)                     | Helyum / 3   | MeOX / piridin<br>(50 µL, 90 dk, 60°C)<br>MSTFA<br>(100 µL, 90 dk, 60°C) | 70 °C (2 dk)<br>→ 5°C / dk<br>→ 200°C (1 dk)<br>→ 320°C / dk (5 dk)                       | Bölmersiz                      | MS-EI                              | Nitel  | (27)         |
| 2-HB<br>GLU<br>(28) | Ergitilmiş silika kapiler kolon<br>(30 m × 0,25 mm, 0,25 µm) | Helyum   | MeOX / piridin<br>(40 µL, 90 dk, 30°C)<br>MSTFA<br>(20 µL, 0,5 sa, 37°C) | 80 °C (2 dk)<br>→ 5°C / dk<br>→ 330°C (6 dk)  | -                              | MS                                 | Nicel<br>Duyarlılık: 55,9-<br>78,0<br>Özgüllük: 69,8-<br>65,1<br>Doğruluk: 63,1-<br>71,3 | (28)         |
| 2-HB<br>3-HB        | HP-5 kapiler kolon<br>(50 m × 0,2 mm, 0,5 µm)                | Helyum / 23,3  | Piridin<br>(25 µL, 45 dk, 90°C)<br>MSTFA<br>(100 µL, 4 sa, 90°C)         | 150 °C (5 dk)<br>→ 10°C / dk<br>→ 300°C<br>→ 20°C / dk<br>→ 320°C                         | Bölmeli<br>1 : 28              | MS-EI                              | Nicel  | (12)         |
| GLU                 |  | Helyum / 20,2  | Piridin<br>(25 µL, 45 dk, 90°C)<br>MSTFA<br>(100 µL, 4 sa, 90°C)         | 150 °C (3 dk)<br>→ 7°C / dk<br>→ 210°C<br>→ 7°C / dk<br>→ 310°C<br>→ 10°C / dk<br>→ 320°C | Bölmeli<br>23 : 2 : 1          |                                    |  | (29)         |

| Metabolit           | Analitik Kolon<br>Fonksiyonel Grup                                      | Hareketli Faz /<br>Akış Hızı<br>(mL dk <sup>-1</sup> ) | Türevlendirme  | Fırın Sıcaklık Programı  | Enjeksiyon<br>Türü ve<br>Oranı | Detektör ve<br>İyonizasyon<br>Türü | Nitel-Nicel  | Kaynak<br>No |
|---------------------|---|--|--|--|--------------------------------|------------------------------------|--|--------------|
| 3-HB                | Ergitilmiş silika kapiler kolon<br>(10 m × 0,18 mm, 0,18 µm)            | Helyum / 1   | MeOX / piridin<br>(30 µL, 960 dk, 25°C)<br>MSTFA + %1 TMCS<br>(30 µL, 60 dk, 25°C) | 70 °C (2 dk)<br>→ 30°C / dk<br>→ 310°C (2 dk)                            | Bölmesiz                       | MS                                 | Nitel  | (30)         |
| 3-HB<br>2-HB<br>GLU | CP-Sil 8CB- kapiler kolon<br>(30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)                  | Helyum / 1   | MeOX / piridin<br>(50 µL, 90 dk, 30°C)<br>MSTFA + %1 TMCS<br>(25 µL, 30 dk, 37°C)  | 80 °C (2 dk)<br>→ 15°C / dk<br>→ 320°C (6 dk)                            | Bölmeli<br>1 : 25              | MS-EI                              | Nitel  | (31)         |
| 3-HB                | DB-5 kapiler kolon<br>(30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)                         | - / 1,2  | BSTFA + %1 TMCS<br>(70 µL, 10 dk, 90°C)  | 60 °C (2 dk)<br>→ 20°C / dk<br>→ 180 °C<br>→ 50°C / dk<br>→ 250°C (1 dk) | Bölmesiz                       | MS                                 | Nicel<br>LOD: 2 mg / L<br>LOQ: 7 mg / L<br>Doğrusallık:<br>50-500 mg / L<br>GK: % 82 | (32)         |
| 3-HB                | Phenomenex Zebron ZB-<br>5MS kapiler kolon<br>(30 m × 0,25 mm, 0,25 µm) | -  | BSTFA + %1 TMCS<br>(75 µL, 5 dk, 90°C)   | 60°C<br>→ 20°C / dk<br>→ 180°C<br>→ 50°C / dk<br>→ 250°C                 | -                              | MS                                 | Nicel<br>LOD: 1 mg / L<br>LOQ: 3 mg / L<br>Doğrusallık:<br>3-25 mg / L               | (33)         |
| 3-HB                | DBWAX<br>(30 m, 0,5 mm)   | Azot   | -  | 60°C   | -                              | FID                                | Nitel  | (34)         |

| Metabolit    | Analitik Kolon<br>Fonksiyonel Grup   | Hareketli Faz /<br>Akış Hızı<br>(mL dk <sup>-1</sup> ) | Türevlendirme   | Fırın Sıcaklık Programı  | Enjeksiyon<br>Türü ve<br>Oranı | Detektör ve<br>İyonizasyon<br>Türü | Nitel-Nicel   | Kaynak<br>No |
|--------------|--|--|---|--|--------------------------------|------------------------------------|---|--------------|
| 3-HB<br>2-HB | Ergitilmiş silika kapiler kolonlar, DB-5<br>(30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)<br>ve DB-17<br>(30 m × 0,25 mm, 0,25 µm) | Azot   | TFA<br>(10 µL, 20 dk, 60°C)   | 60°C (2 dk)<br>→ 3°C / dk<br>→ 280°C   | Bölmeli                        | FID                                | Nitel   | (35)         |
| 3-HB<br>GLU  | Kapiler kolon, DB-5MS<br>(30 m × 250 µm, 0,25 µm)  | Helyum / 1   | MeOX / piridin<br>(30 µL, 60 dk, 70°C)<br>MSTFA<br>(50 µL, 90 dk, 40°C) | 60 °C (3 dk)<br>→ 7°C / dk<br>→ 140°C (4 dk)<br>→ 5°C / dk<br>→ 180°C (6 dk)<br>→ 5°C / dk<br>→ 280°C (2 dk) | Bölmeli<br>1 : 10              | MS-EI                              | Nitel   | (36)         |
| 3-HB         | Kapiler kolon, Ultra-2<br>(25 m × 0,20 mm, 0,11 µm)  | Helyum / 0,5   | MeOX<br>(30 dk, 60°C)<br>MTBSTFA<br>(20 µL, 30 dk, 60°C)                | 100 °C (2 dk)<br>→ 10°C / dk<br>→ 145°C<br>→ 30°C / dk<br>→ 300°C (3 dk)                                     | Bölmeli<br>1 : 10              | MS-EI                              | Nicel<br>LOD: 0,7 µg / L<br>Doğrusallık:<br>0,02-2 µg / L | (37)         |
| 3-HB         | Cam kolon,<br>(1,5 m × 2 mm)   | Azot / 25  | -   | 125°C  | -                              | FID                                | Nitel   | (38)         |
| 3-HB<br>2-HB | Cam kolon,<br>(1 m × 2 mm)   | Azot   | -   | -  | -                              | FID                                | Nitel   | (39)         |

| Metabolit   | Analitik Kolon Fonksiyonel Grup                              | Hareketli Faz / Akış Hızı (mL dk <sup>-1</sup> ) | Türevlendirme  | Fırın Sıcaklık Programı  | Enjeksiyon Türü ve Oranı | Detektör ve İyonizasyon Türü | Nitel-Nicel   | Kaynak No |
|-------------|--|--|--|--|--------------------------|------------------------------|---|-----------|
| 3-HB<br>GLU | Ergitilmiş silika kapiler kolon<br>(10 m × 0,18 mm, 0,18 µm) | Helyum / 1                                       | MeOX<br>(30 µL, 960 dk, 25°C)<br>MSTFA + %1 TMCS<br>(30 µL, 60 dk, 25°C) | 70°C (2 dk)<br>→ 35°C / dk<br>→ 305°C (2 dk)   | Bölmesiz                 | MS                           | Nitel   | (40)      |
| 3-HB        | Kapiler kolon, HP Ultra-2<br>(25 m × 0,20 mm, 0,11 µm)       | Helyum / 0,5                                     | MeOX<br>(30 dk, 60°C)<br>MTBSTFA<br>(20 µL, 30 dk, 60°C)                 | 100 °C (2 dk)<br>→ 5°C / dk<br>→ 250°C<br>→ 20°C / dk<br>→ 300°C(5 dk)                             | Bölmeli<br>1 : 10        | MS-EI                        | Nitel   | (41)      |
| β-HIVA      | CPSil-19CB kapiler kolon                                     | Helyum   | BSTFA, piridin, TMCS<br>(5:1 :0,05) (60 dk, 60°C)                        | 75°C<br>→ 5°C / dk<br>→ 250°C (15 dk)  | Bölmeli<br>1 : 50        | MS                           | Nicel   | (42)      |
| β- HIVA     | Ultra-2 Kapiler kolon<br>(25 m × 0,32 mm, 0,52 µm)           | İzobütan   | % 10 HCl-n-bütanol<br>(150 µL, 10 dk, 30°C)                              | -  | Kolona enjeksiyon        | MS-EI ve CI                  | Nitel   | (43)      |
| URA         | Supelco SPB-20 Kapiler kolon<br>(15 m × 0,25 mm, 0,25 µm)    | Helyum / 1                                       | Pentafluorobenzil  | 100 °C (1 dk)<br>→ 25°C / dk<br>→ 190°C<br>→ 10°C / dk<br>→ 230°C<br>→ 25°C / dk<br>→ 290°C (2 dk) | Bölmesiz                 | MS-EI                        | Nicel<br>Doğrusallık:<br>0,025-250 µM<br>GK: % 95,8 ± 2 | (44)      |

| Metabolit | Analitik Kolon Fonksiyonel Grup                                | Hareketli Faz / Akış Hızı (mL dk <sup>-1</sup> ) | Türevlendirme                                    | Fırın Sıcaklık Programı   | Enjeksiyon Türü ve Oranı | Detektör ve İyonizasyon Türü | Nitel-Nicel   | Kaynak No |
|-----------|--|--|--|---|--------------------------|------------------------------|---|-----------|
| URA       | Ergitilmiş silika kapiler kolon DB-5 (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm) | -  | BSTFA / TMCS (10:1) (100 µL)                     | → 60°C<br>→ 17°C / dk<br>→ 310°C  | Bölmeli<br>1 : 10        | MS-EI                        | Nitel   | (45)      |
| URA(46)   | -  | -  | Pridin (25 µL)<br>MSTFA (75 µL)<br>(30 dk, 70°C) | -   | -                        | MS-EI                        | Nicel<br>GK: % 75   | (46)      |
| URA       | HP-5 (30 m × 0,32 mm, 0,25µm)                                  | Azot / 1.5                                       | Etil Kloroformat                                 | 90°C (1dk)<br>→ 25°C / dk<br>→ 250°C (1 dk)                             | Bölmeli<br>1 : 10        | -                            | Nicel<br>LOD: 0,1 µmol / L<br>Doğrusallık:<br>0,5-50 µmol / L<br>GK: % 98-100 | (47)      |
| URA       | HP-5MS kapiler kolon (30 m × 0,25 mm,0,25 µm)                  | Helyum   | BTFMBzBr   | 100°C (1 dk)<br>→ 25°C / dk<br>→ 240°C<br>→ 20°C / dk<br>→ 280°C (2 dk) | Bölmesiz                 | MS-NCI                       | Nicel<br>GK: % 99,4   | (48)      |
| URA       | HP-5 (30 m × 0,32 mm, 0,25 µm)                                 | Azot / 1,5                                       | İzobütil kloroformat                             | 100°C (1 dk)<br>→ 30°C / dk<br>→ 280°C (2 dk)                           | Bölmeli<br>1 : 10        | -                            | Nicel<br>LOD: 0,08 µmol / L   | (49)      |
| URA       | DB-5kimyasal bağlı kapiler kolon (15 m × 0,32 mm, 0,25 µm)     | -  | -  |   | -                        | MS- NCI                      | Nicel   | (50)      |
| URA       | HP-5 (30 m x 0,32 mm, 0,25 µm) Rtx-200                         | -  | MeOX / piridin (2,5 µL, 90 dk, 30°C)             | -   | -                        | MS                           | Nitel   | (51)      |

| Metabolit | Analitik Kolon<br>Fonksiyonel Grup                                     | Hareketli Faz /<br>Akış Hızı<br>(mL dk <sup>-1</sup> ) | Türevlendirme  | Fırın Sıcaklık Programı                                 | Enjeksiyon<br>Türü ve<br>Oranı | Detektör ve<br>İyonizasyon<br>Türü | Nitel-Nicel  | Kaynak<br>No |
|-----------|--|--|--|---|--------------------------------|------------------------------------|--|--------------|
|           | (2 m x 0,25 mm, 0,25 µm)   |  | MSTFA + %1 TMCS<br>(22,5 µL, 30 dk, 37°C)  |   |                                |                                    |  |              |
| MAL       | DB-5MS kapiler kolon<br>(30 m x 250 µm, 0,25 µm)                       | Helyum / 1   | MeOX / piridin<br>(80 µL, 90 dk, 30°C)<br>BSTFA + %1 TMCS<br>(80 µL, 120 dk, 70°C) | 80°C (2 dk)<br>→ 5°C / dk<br>→ 285°C (7 dk)             | Bölmesiz                       | MS-EI                              | Nitel  | (52)         |
| GLU       | DB5-MS ergitilmiş silika<br>kapiler kolon<br>(30 m x 250 µm, 0,25 µm)  | Helyum   | MeOX / piridin<br>(65 µL, 90 dk, 37°C)<br>MSTFA + %1 TMCS<br>(40 µL, 60 dk, 37°C)  | 70°C (3 dk)<br>→ 5°C / dk<br>→ 300°C (5 dk)             | Bölmeli<br>1 : 10              | MS-EI                              | Nitel  | (53)         |
| GLU       | Rtx-5MS ergitilmiş silika<br>kapiler kolon<br>(30 m x 250 µm, 0,25 µm) | Helyum / 1   | MeOX / piridin<br>(15 µL)<br>BSTFA + %1 TMCS<br>(35 µL)                            | 80°C<br>→ 8°C / dk<br>→ 200°C<br>→ 30°C / dk<br>→ 300°C | Bölmesiz<br>1 : 20             | MS-EI                              | Nitel<br>LOD: 0,01-4,23<br>mmol / L<br>LOQ : 0,02-7,07<br>mmol/L<br>GK: % 129,40 | (54)         |
| GLU       | DB-1 kapiler kolon<br>(30 m x 250 µm, 0,25 µm)                         | Helyum / 1   | HFBA<br>(50 µL, 20 dk, 60°C)<br>BSTFA + %1 TMCS<br>(80 µL, 120 dk, 70°C)           | 80°C<br>→ 15°C / dk<br>→ 250°C                          | Bölmesiz                       | MS-EI                              | Nitel<br>GK: % 100   | (55)         |
| GLU       | DB-5MS kapiler kolon<br>(30 m x 250 µm, 0,25 µm)                       | Helyum   | MeOX / piridin<br>(20 µL, 20 dk, 80°C)<br>MSTFA                                    | 60°C (1 dk)<br>→ 10°C / dk<br>→ 325°C (10 dk)           | Bölmesiz                       | MS-EI                              | Nitel  | (56)         |

| Metabolit | Analitik Kolon<br>Fonksiyonel Grup                                    | Hareketli Faz /<br>Akış Hızı<br>(mL dk <sup>-1</sup> ) | Türevlendirme  | Fırın Sıcaklık Programı   | Enjeksiyon<br>Türü ve<br>Oranı | Detektör ve<br>İyonizasyon<br>Türü | Nitel-Nicel | Kaynak<br>No |
|-----------|---|--|--|---|--------------------------------|------------------------------------|-------------|--------------|
|           | HP-5<br>(30 m x 320 µm, 0,25 µm)                                      |  | (91 µL, 20 dk, 80°C)   | 70°C (4 dk)<br>→ 20°C / dk<br>→ 300°C (5 dk)                          |                                |                                    |             | (56)         |
| GLU       | HP-1<br>(30 m x 0,2 mm, 0,11 µm)                                      | Helyum / 1   | MeOX / piridin<br>(80 µL, 90 dk, 30°C)<br>MSTFA + %1 TMCS<br>(80 µL, 60 dk, 70°C)  | 80°C (2dk)<br>→ 10°C / dk<br>→ 230°C<br>→ 40°C / dk<br>→ 310°C (3 dk) | Bölmeli<br>1 : 10              | MS                                 | Nitel       | (57)         |
| GLU       | DB5-MS ergitilmiş silika<br>kapiler kolon<br>(10 m x 180 µm, 0,18 µm) | - / 1  | MeOX / piridin<br>(30 µL, 960 dk, 25°C)<br>MSTFA + %1 TMCS<br>(30 µL, 60 dk, 25°C) | 70°C (2 dk)<br>→ 35°C / dk<br>→ 310°C(2 dk)                           | -                              | -                                  | Nitel       | (58)         |

EI: Elektron yakalama, CI: Kimyasal iyonizasyon, NCI: Negatif kimyasal iyonizasyon, DB-5: %5 fenil- %95 metilpolisiloksan, DB-17: %17 fenil-%93 metilpolisiloksan, DB-5MS: %5 difenil çapraz bağlı %95 dimetilpolisiloksan, Ultra-2: %5 difenil çapraz bağlı %95 dimetilpolisiloksan, HP-1: %100 dimetilsiloksan, HP-5: : %5 fenil- %95 metilpolisiloksan, HP-5MS: %5 difenil çapraz bağlı %95 dimetilpolisiloksan, CP-Sil: Organik karışım, CP Sil-19CB:%14 siyanopropil fenil-%86 dimetilpolisiloksan, ZB-5MS:%5 fenil ariyen-%95 dimetilpolisiloksan, SPB-20: %20 fenil-%80 dimetilpolisiloksan, DBWAX:Polietilen glikol, Rtx-5MS: difenil dimetilpolisiloksan, DB-1: dimetilpolisiloksan, MeOX: Metoksiamin hidroklorür, BSTFA:N,O-bis(trimetilsilil)trifluoro-asetamit, TMS:Trimetilsilil, MTBSTFA:N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroasetamit, MSTFA:N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroasetamit, TMCS:Trimetilklorosilan, TFA:Trifluoroasetik asit anhidriti, BTFMBzBr:3, 5-bis(trifluorometil)benzil bromit, HFBA:Heptafluobutirik anhidrit, LOD: Gözlenebilirlik sınırı, LOQ:Alt tayin sınırı, FID: Alev iyonizasyon dedektörü



## 2.5. Kromatografi

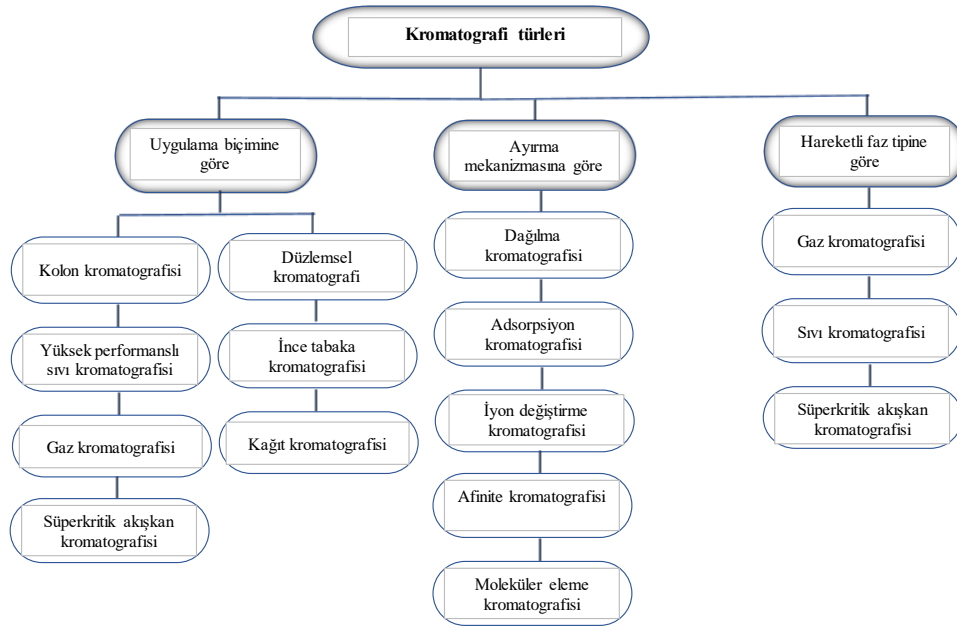
Kromatografi, bir karışımdaki bileşenlerin bir kolonun iç yüzeyine veya düz bir yüzeye tutturulmuş olan sabit fazda, sabit fazın arasından ve üzerinden geçen hareketli faz yardımıyla farklı hızlarla sürüklenmeleri veya hareket etmeleri sonucunda birbirlerinden farklı bantlar veya bölgeler oluşturarak ayrılmasıdır (59). Kromatografide hareketli faz gaz, sıvı veya süperkritik bir akışkan olabilirken; sabit faz katı ya da katı bir destek materyaline emdirilmiş sıvıdır. Kromatografik analiz, kimyasal bileşimlerin belirlenmesinde, ayrılmasında, saflaştırılmasında ve tayin edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir analitik tekniktir (60).

### Kromatografide Kullanılan Hareketli ve Sabit Fazlar

Kromatografide sabit faz olarak kullanılan dolgu maddeleri yüzey alanını artırır. Yüzeyi asidik özellik gösteren silikajel en sık kullanılan sabit fazdır. Bunu sırasıyla yüzeyi bazik olan alümina ve nötral olan kömür takip eder (60). Sabit faza örnek olarak florisil, kalsiyum karbonat ve kalsiyum oksit, magnezyum karbonat ve magnezyum oksit, fullerler, diatome toprakları, poliamitler, nişasta, toz şeker, talk da verilebilir. Sıvı hareketli faz olarak su başta olmak üzere tüm organik çözücüler ve tüm çözücülerin farklı oranlardaki karışımları ile gaz ve süperkritik çözücüler kullanılabilir.

#### 2.5.1. Kromatografi Türleri

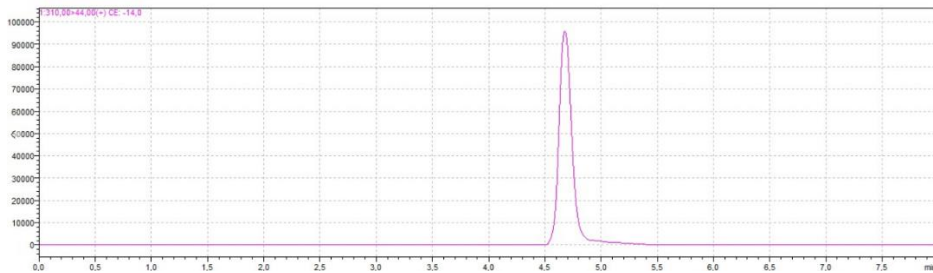
Kromatografik yöntemler, sabit faz ile hareketli faz arasındaki fiziksel etkileşim incelenerek uygulama biçimine, hareketli faz tipine ve ayırma mekanizmasına göre olmak üzere üç farklı şekilde sınıflandırılır. Kromatografinin sınıflandırma biçimi Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



**Şekil 2.6.** Kromatografinin sınıflandırılması

### Kromatogramlar

Kolon çıkışına, çözünen maddeyi algılamaya uygun bir dedektör yerleştirilirse detektör sinyali elde edilir. Bu sinyal zamana karşı grafiğe geçirilirse pik elde edilmiş olur. Oluşan bu grafiğe kromatogram adı verilir (Şekil 2.7). Karışımda bulunan her madde için farklı bir pik bulunur. Pikin oluşma zamanı hangi maddeye ait olduğunu, pikin alanı ise o bileşenin miktarını gösterir.

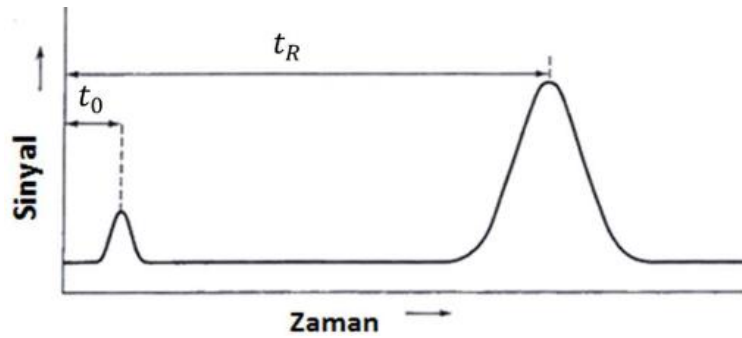


**Şekil 2.7.** Tek bir standart madde için örnek kromatogram

## 2.5.2. Kromatografik Parametreler (59, 61)

### Alıkonma Zamanı

Bir maddenin kolona enjekte edilmesinden numune pikinin dedektöre ulaşmasına kadar geçen süreye alıkonma zamanı denir ve  $t_R$  sembolü ile gösterilir, Şekil 2.8’de ilk oluşan küçük pik kolonda alıkonulamayan tür içindir ve  $t_0$  sembolü ile gösterilir.  $t_0$  değeri hareketli faz moleküllerinin ortalama hızını gösterir. Numune veya hareketli fazda kolonda alıkonulamayan bir madde yoksa çözeltiye bilinen bir tür eklenir. Bu türün dedektöre ulaşması için geçen zamana ölü zaman denir ve  $t_M$  sembolü ile gösterilir.



Şekil 2.8. Tek bir numune için alıkonma zamanı ve ölü zaman

### Alıkonma Hacmi

Bir maddenin enjeksiyonundan sonra sabit fazdan elüe olması için harcanan hareketli faz hacmine alıkonma hacmi denir,  $V_R$  sembolü ile gösterilir ve hacimsel akış hızı ( $F$ ) ile alıkonma zamanından hesaplanabilir (Eşitlik 2.1).

$$V_R = t_R F \quad (2.1)$$

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

$$V_R = V_M + K V_S \quad (2.2)$$

$K$  değeri ise Eşitlik 2.3 ile hesaplanır.

$K = \text{sabit fazdaki madde derişimi} / \text{hareketli fazdaki madde derişimi}$

$$K = (C_S) / (C_M) \quad (2.3)$$

### **Kapasite Faktörü**

Kapasite faktörü  $k'$  sembolü ile gösterilir ve çözünen maddelerin göç hızlarını tanımlar. Alıkonma hacmi ve ölü hacim kullanılarak Eşitlik 2.4 ile hesaplanabileceği gibi, eğer elüsyon sırasında  $F$  değeri sabit ise alıkonma zamanı ve ölü zaman kullanılarak Eşitlik 2.5 ile de hesaplanabilir.

$$k' = (V_R - V_0) / V_0 \quad (2.4)$$

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.5)$$

Aynı zamanda  $k'$ , Eşitlik 2.6 ile de tanımlanır.

$$k' = K \times V_S / V_M \quad (2.6)$$

Kapasite faktörü her madde için farklı bir değerdir. Maddeye özgü bir değer olduğundan bir maddeyi tanımlamak için kullanılan önemli bir kromatografik parametredir.

Kapasite faktörü genellikle hareketli faz bileşimi değiştirilerek ayarlanabilir.  $k' < 1$  olursa madde kolondan çok hızlı elüe olur, alıkonma zamanı düşer, madde piki çözücü piki ya da matriksle karışabilir.  $k' > 10$  olursa madde kolondan çok uzun sürede elüe olur. İdeal bir ayırım için kapasite faktörü  $1 < k' < 5$  aralığında olmalıdır.  $k' = 0$  ise kromatografik bir ayırım söz konusu değildir.

### **Seçicilik**

Bir karışımdaki bileşenlerin kapasite faktörleri arasındaki oran seçicilik ( $\alpha$ ) veya ayırım faktörü olarak adlandırılır ve Eşitlik 2.7 ile verilir.

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = (t_{r2} - t_0) / (t_{r1} - t_0) \quad (2.7)$$

$k'_1$ : Kolondan erken elüe olan, alıkonma zamanı kısa olan maddenin kapasite faktörü

$k'_2$ : Kolondan geç elüe olan, alıkonma zamanı uzun olan maddenin kapasite faktörü

$\alpha = 1$  olduğunda iki madde birbirinden ayıramaz. Kromatografik bir ayırım olabilmesi için  $\alpha > 1$  olmalıdır.

### **Kolon Etkinliği (Verimliliği)**

Kolon etkinliği pik genişliği ile ifade edilir. İyi bir ayırım sağlanmış ise, bir kromatogramda dar bir kromatografik bant elde edilmelidir. Kolon etkinliği, kolonun teorik tabak sayısı (N) ile verilir ve hesaplanması için Eşitlik 2.8 veya 2.9 kullanılır.

$$N = 16(t_R/w)^2 \quad (2.8)$$

$$N = 5,54(t_R/w_{1/2})^2 \quad (2.9)$$

w: Pik yüksekliğinin %10'undaki pik taban genişliği

$w_{1/2}$ : Pik yüksekliğinin yarısındaki pik taban genişliği

Kolon etkinliği kolonun teorik tabaka sayısı (N) ile de gösterilebilir ve kolon uzunluğunun (L) eşdeğer tabaka yüksekliğine (H) bölünmesiyle hesaplanır (Eşitlik 2.10).

$$N = L/H \quad (2.10)$$

1950'li yıllarda Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter kendi adıyla anılan kromatografik kolonda ayırım için bir eşitlik bulmuştur. Bu matematiksel yaklaşım aşağıda verilmiştir (Eşitlik 2.11).

$$H = A + B/u + C u \quad (2.11)$$

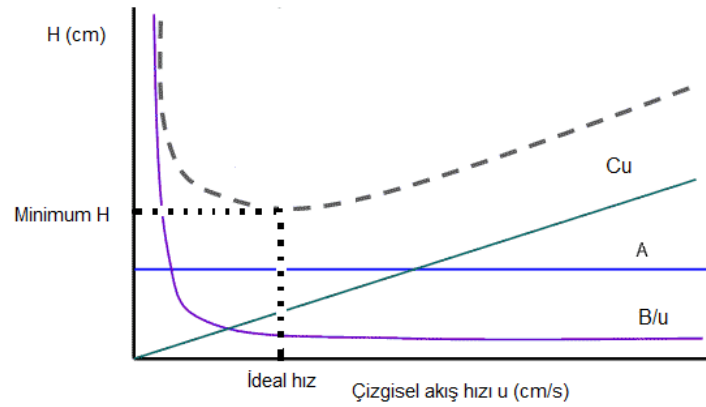
H: Teorik tabaka yüksekliği (cm)

A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu

B: Boyuna difüzyon

C: Fazlar arasındaki kütle aktarımı

u: Çizgisel hız



**Şekil 2.9.** Van Deemter eğrisi

Bir kromatografi kolonunun etkinliğinin sağlanması için öncelikle optimum akış hızı belirlenmelidir. H değeri küçültülerek kolonun etkinliği artırılabilir (Şekil 2.9). Eşitlik 2.11'deki A değeri akış hızından bağımsızdır ve madde molekülleri kollonda farklı yollar izledikçe artar. Farklı uzunluktaki yolları izleyen madde moleküllerinin kolondaki hızları da farklı olur. Bütün moleküller kolon boyunca ilerlerken kromatografik bantta genişleme gözlenir ve bu olaya Eddy difüzyonu denir. Kolon dolgu maddesi çok küçük boyutlu olursa yüzey alanı genişler ve A değeri küçültülebilir. B değeri boyuna difüzyon terimi olup özellikle akış hızının düşük olduğu durumlarda önem kazanır. B değerinin eşitliğe katkısı, bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artar. Aynı zamanda B'nin değeri kolon sıcaklığının düşürülmesi ve kolona basınç uygulanması ile azalır. Eşitliğin üçüncü terimi olan C değeri yüksek akış hızında önem kazanan kütle aktarım terimidir. Akış hızının artmasıyla bileşenlerin iki faz arasında dağılma dengesine ulaşabilmesi için gereken süre azalır ve dağılma dengesine tam olarak ulaşamaz.

### Ayırıcılık

Kromatografik bir analizde asıl amaç, bir karışımdaki maddelerin birbirinden ayrılmasıdır. Ayırıcılık ( $R_S$ ), kolonun iki analiti birbirinden ne derece ayırabildiğinin bir ölçüsü olup kolon ve çözücü etkinliğinden etkilenir (Eşitlik 2.12).

$$R_S = 2(t_{RB} - t_{RA}) / (W_A + W_B) \quad (2.12)$$

$t_{RA}$ : A maddesi için alıkonma zamanı

$t_{RB}$ : B maddesi için alıkonma zamanı

$w_A$ : A maddesi için elüsyon pik yüksekliğinin %10'undaki pik taban genişliği

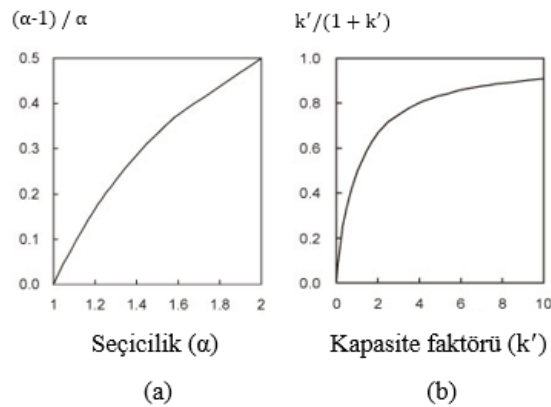
$w_B$ : B maddesi için elüsyon pik yüksekliğinin %10'undaki pik taban genişliği

$R_S=1.5$  olması iki pikin birbirinden tamamen ayrıldığını ifade eder. Nicel analizlerde  $R_S \geq 1.5$  olması beklenmektedir.  $k'$ ,  $\alpha$  ve  $N$  ayırıcılığı etkisi Eşitlik 2.13 ile verilir.

$$R = \frac{1}{4} \times \left[ \frac{\alpha-1}{\alpha} \right] \left[ \frac{k'}{k'+1} \right] \times \sqrt{N} \quad (2.13)$$

Eşitlik 2.13'e göre ayırıcılığın seçicilik arttıkça artması gerekmektedir. Ancak belli bir seçicilik değerinden sonra toplam ayırıcılıkta düzgün bir iyileştirme olmadan farklı alıkonma sürelerine sahip pikler elde edilebilir. Eşitlikteki diğer terimler sabit kabul edilip seçiciliğe karşı ayırıcılık grafiğe geçirilirse bu davranış açık bir biçimde gözlemlenebilir (Şekil 2.10.a).

Kapasite faktörünün ayırıcılığa etkisi seçicilik faktörünükine benzer.  $k'$  dışındaki bütün terimler sabit tutulduğunda  $k'$  nün toplam ayırıcılığa etkisi Şekil 2.10.b'de görülmektedir.  $k'$  değeri arttıkça  $k'/k'+1$  değeri bire yaklaşır ve kapasite faktöründeki artışın toplam ayırıcılığa etkisi kalmaz.



**Şekil 2.10.** Ayırıcılığın  $\alpha$  (a) ve  $k'$  (b) ile değişimi

$N$ , etkinlik faktörü olarak da tanımlanabilir ve akış hızı, kolon uzunluğu veya dolgu maddesinin tanecik boyutu ile değişir.  $N$  değeri pik genişliği ile ilgilidir ve

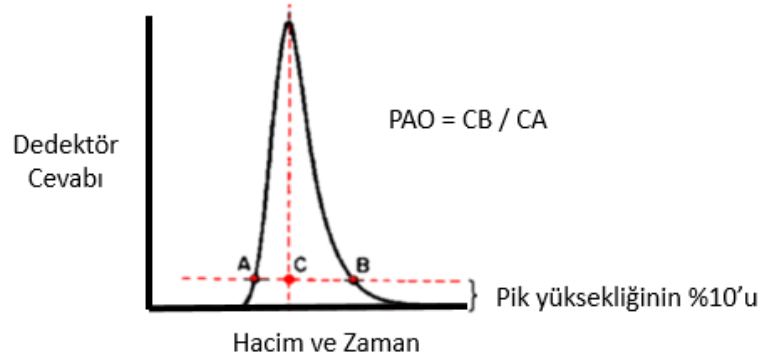
ayırıcılık bu değerin karekökünün bir fonksiyonu olduğu için N'deki büyük artışlar ayırıcılıkta küçük değişimlere neden olur.

### Pik Simetrisi

Pik simetrisinin belirlenmesinde pik asimetri oranı kullanılır ve Eşitlik 2.14 ile hesaplanır.

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

CA ve CB uzunlukları Şekil 2.11'de tanımlanmış olup, iyi bir ayırma işleminde PAO değerinin 1,00 ile 1,25 arasında olması istenir (62).



**Şekil 2.11.** Pik asimetri oranının hesaplanması

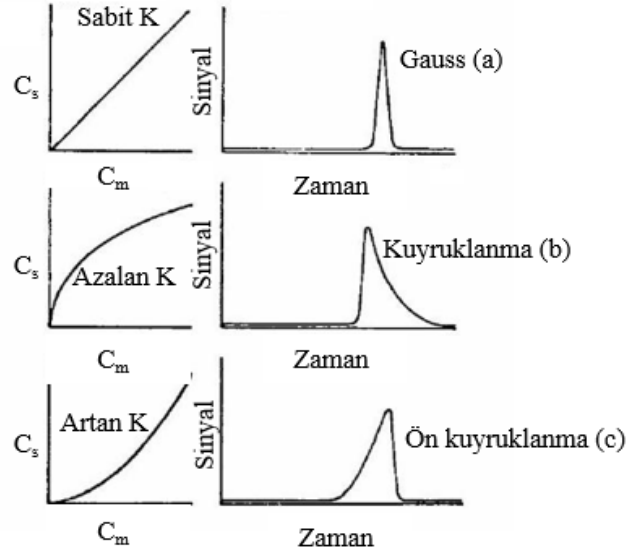
Bir analizde kromatografik koşullar simetrik elüsyon piki sağlanacak şekilde düzenlenmelidir.

Bir kromatografik ayırmada hareketli fazın denge derişimi ( $C_M$ ) sabit fazın denge derişimine ( $C_S$ ) karşı grafiğe geçirilir ve çeşitli izotermler elde edilir.  $K = C_S / C_M$  ideal koşullarda sabit bir değerdir ve kromatografik bant tüm derişimlerde aynı hızda hareket eder. Simetrik (Gauss eğrisi) bir elüsyon piki elde edilir ve  $PAO = 1$  olur. (Şekil 2.12.a).

Eğer kolonda fazla miktarda madde varsa sabit fazdaki madde-madde etkileşimleri madde-çözücü etkileşimlerinden daha baskındır. Bu durumda K değeri artar, doğrusal olmayan bir izoterm elde edilir ve aşırı yüklenme olur. Elüsyon eğrisinin önünde oluşan alan ön kuyruklanma olarak adlandırılır ve  $PAO < 1$ 'dir (Şekil 2.12.b).



Moleküller arası kuvvetler maddeyi sabit faz üzerinde bir katman oluşturacak şekilde tutarsa izoterm içbükey olur ve elüsyon eğrisinde pik kuyruklanması gözlenir ve  $PAO > 1$ 'dir (Şekil 2.12.c).



Şekil 2.12. Elüsyon izotermi ve pik şekilleri

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

Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) iki güçlü analitik cihazın kombinasyonudur. GC-MS karışım içindeki bileşenlerin yüksek verimle gaz fazında ayırımı için gaz kromatografisi ile hem bileşenlerin kimliklerinin doğrulanması hem de bilinmeyen maddelerin kimlik tespitinin yapılması için kütle spektroskopisinin kullanıldığı kombine bir tekniktir.

### Tarihçe

Gaz kromatografisi (GC) ilk kez 1952 yılında James and Martin tarafından (63) küçük karboksilli asit karışımının ayırımı ile tanımlanmıştır. Başlangıçta, dolgulu GC kolonlar ile uygulanmıştır. GC'nin gücü 1958 yılında Golay tarafından kapiler kolonların kullanılmasıyla artmıştır (64). Birçok analizde, ince cam kapiler kolonlar uygulanmıştır. 1976 yılında Dandeneau ve Zerenner'in (65) ortaya çıkardığı ergitilmiş silika kapiler kolon GC'nin gelişiminde ana buluş olarak kabul edilebilir.

Kütle spektroskopisinin (MS) tarihi, 1912 yılında Thomson'ın (66) O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub> ve COCl<sub>2</sub> gibi bileşiklerin kütle spektrumlarının elde etmesiyle başlamıştır. Bu buluşlar Goldstein'in (1886) pozitif iyonları erken keşfine ve Wien'in (1898) iyonların manyetik alandan sapması olayına bağlıdır. Dempster (67) ve Aston (68) ilk manyetik sektör aletini tanımlamışlardır. Organik analizlerde kullanılan ilk ticari aletler II. Dünya Savaşı boyunca üretilmiştir. İlk ana uygulama alanı petrokimya sektörü olmuştur.

1958 yılında, ilk defa GC-MS aletleri internet üzerinden tanıtılmış, 1964'de Ryhage (69) jet ayırıcı vasıtasıyla yapılmıştır. GC ve MS'i bağlamak oldukça basitleşmiş ve GC-MS'de ilk veri işleme 1968 yılında yapılmıştır (70). 1975 yılında, ilk kapiler kolonlu ticari GC-MS aleti tanıtılmış ve ergitilmiş silika kapiler kolonlar 1981 yılında GC-MS'de kullanılmaya başlanmıştır (71).

### **2.6.1. Gaz Kromatografisi (GC) (59, 72-78)**

GC, karışımdaki bileşenleri bir hareketli faz (inert taşıyıcı gaz) ile bir sabit faz (mevcut kolon kaplama parçacıkları ya da kolon iç duvarı olabilir) üzerinde fiziksel olarak seçici bir ayırma tekniğidir. Bu kromatografik süreç, analitin taşıyıcı gaz tarafından sabit faz üzerindeki hareketi boyunca absorpsiyon ya da desorpsiyon basamaklarının tekrarlanan sonuçlarından meydana gelir. Karışımdaki bileşenlerin karakteristik özelliklerinin farklılıklarına bağlı olarak ayırım gerçekleşir. GC tekniğinde öncelikle analitlerin uçucu olması gerekir.

GC'de ayırım dolgu kolonlarda gerçekleştirildiği gibi kapiler kolonlarda da gerçekleştirilebilir.

Gaz- katı ve gaz-sıvı olmak üzere iki çeşit GC vardır.

#### **Gaz-Katı Kromatografisi**

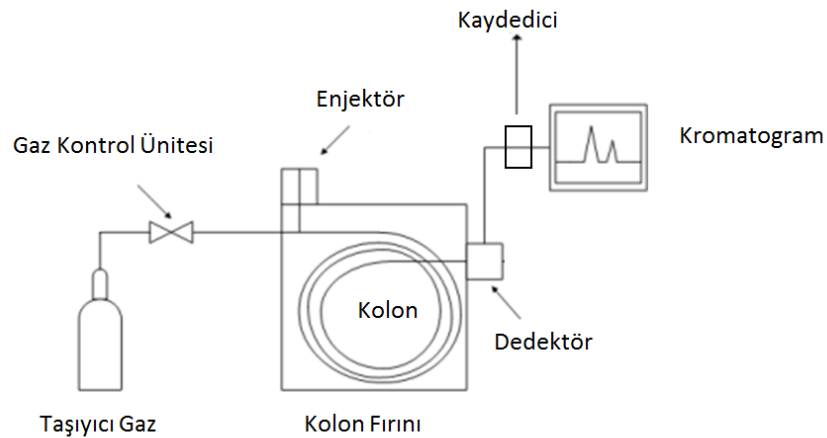
Gaz-katı kromatografisinin temeli, analiz edilecek maddenin, katı sabit faz üzerine fiziksel olarak tutundurulmasına dayanmaktadır.

## Gaz-Sıvı Kromatografisi

Gaz-sıvı kromatografisinin temeli, analizi gerçekleştirilecek maddenin, gaz olan hareketli faz ile bir katının yüzeyine tutturulmuş sabit sıvı faz arasında dağılması esasına dayanmaktadır.

## Gaz Kromatografi Cihazı

Gaz kromatografi cihazı, gaz kontrol ünitesi, bir örnek tanıtım sistemi ya da enjektör, ayırımın gerçekleştiği kolon, kolonun bulunduğu ve sıcaklığı programlayan kolon fırını, madde sinyalini algılayan dedektör ve sonuçları kaydedip kromatograma dönüştürecek veri sistemi ve/veya kütle spektroskopisine yönlendiren ara yüzden oluşmaktadır (Şekil 2.13).

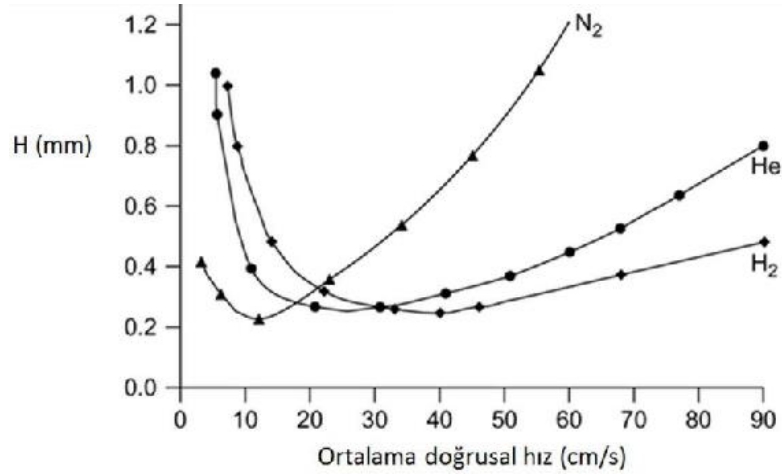


**Şekil 2.13.** Gaz kromatografisi cihazının temel kısımları

## Taşıyıcı Gaz

Gaz kontrol ünitesi, akış hızı ya da enjektör boyunca gaz akışının basınç kontrolünü, kolon ve dedektördeki taşıyıcı gazın ve gerekirse yardımcı gazların tespitini yapar. Taşıyıcı gaz hidrojen, helyum, azot gibi inert bir gaz olmalıdır. Şekil 2.14'de, en yüksek verimliliği minimum tabaka yüksekliğinde  $N_2$  gazının verdiği; ancak  $N_2$  gazının doğrusal hızının artmasıyla H değerin düşüğü görülmektedir (75).  $H_2$  gazı geniş doğrusal hız aralığına sahiptir fakat patlayıcı özelliği nedeniyle tercih

edilmez. N<sub>2</sub> gazına göre daha iyi doğrusal hız aralığına sahip olan He gazı en çok kullanılan taşıyıcı gazdır.



**Şekil 2.14.** GC’de kullanılan taşıyıcı gazlara ait Van Deemter grafikleri

Taşıyıcı gaz kullanımdan önce oksijen, su ve hidrokarbonları uzaklaştırmak için nem ve oksijen ayırıcı tarafından temizlenmelidir. Taşıyıcı gaz içindeki oksijen varlığı GC kolondaki sabit faza zarar verici bir etkiye sahiptir. Taşıyıcı gaz tipik olarak 0,3 MPa altındaki basınçta uygulanır. Akış hızı, dolgu kolon için yaklaşık olarak 20 mL dk<sup>-1</sup> ve açık kapiler kolon için 1 mL dk<sup>-1</sup>’dir.

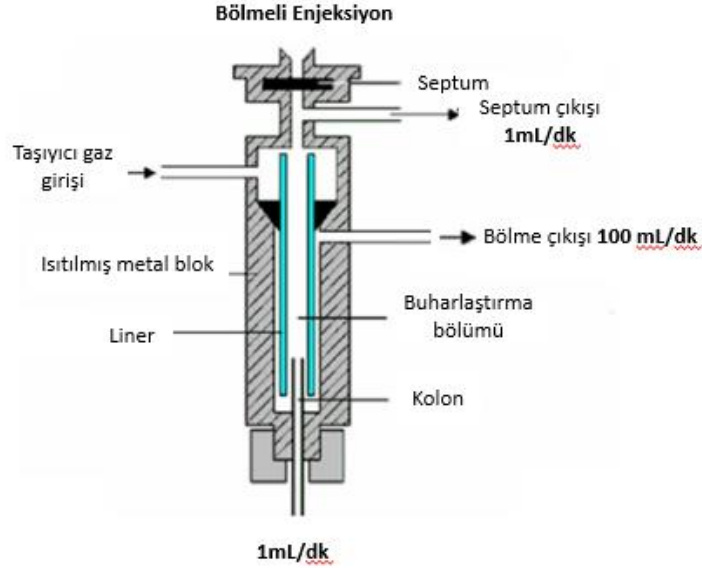
### Enjeksiyon Türleri

GC’de numune girişi çok kritik bir basamaktır. Numunenin kolona tek seferde verilmesi ve analitin tamamının detektöre ulaşması gerekmektedir. Bu süreçte termal bozunma olmamalı ve/veya uçuculuk farklılıklarından dolayı bileşenlerin ayrılmaması gibi durumlar ortaya çıkmamalıdır. Ayrıca, numunenin yavaş verilmesi pik genişlemesine ve düşük ayırma gücüne neden olur. En yaygın uygulanan enjeksiyon teknikleri bölmeli, bölmesiz ve kolona enjeksiyondur.

### Bölmeli Enjeksiyon

Bölmeli enjeksiyonda numunenin bölünmesi nedeniyle (tipik olarak 1:10 ile 1:100 oranında bir aralıkta, iç çapı daha küçük kolon için en yüksek bölme oranı kullanılır), nispeten daha büyük bir numune hacmi, 1 ile 5 µL, enjekte edilebilir. Bölme oranı kolona enjekte edilen madde miktarını belirler. Genellikle sıvı olan

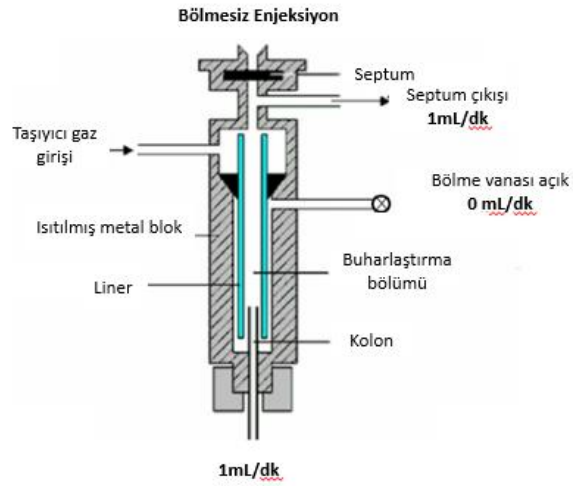
numune buharlaşmanın olduğu 'liner' denilen kısma enjekte edilir. Hızla buharlaşan numune bu bölgede taşıyıcı gaz ile karışır ve hızlı bir şekilde kolonun girişine taşınır. Ancak, büyük bir kısmı bölme çıkışı kısmından dışarı atılır (Şekil 2.15).



**Şekil 2.15.** Bölmeli enjeksiyon bloğu

### **Bölmesiz Enjeksiyon**

Bölmesiz enjeksiyonda numune hacmi daha küçüktür. Bölmesiz enjeksiyonda bölme vanası 50 ile 120 s arasında belirtilen zaman (numune kolona girene kadar geçen süre) için kapatılır. Bundan sonra, bölme vanası açılır, enjektörden artan çözücü ve numune temizlenir (Şekil 2.16). Bölmesiz enjeksiyonda ilk kolon sıcaklığı kritik bir parametredir, analitlerin çözünmesi için kullanılan çözücünün kaynama noktasına bağlıdır.



**Şekil 2.16.** Bölmesiz enjeksiyon bloğu

Bu iki enjeksiyon tekniğinin karşılaştırılması Tablo 2.3’de verilmiştir.

**Tablo 2.3.** GC için numune enjeksiyon tekniklerinin önemli özelliklerinin karşılaştırılması

|                                    | <b>Bölmeli enjeksiyon</b>   | <b>Bölmesiz enjeksiyon</b>                                      |
|------------------------------------|---|---|
| <b>Uygulama</b>                    | Temel bileşenler  | Yan ve temel bileşenler   |
| <b>Maksimum enjeksiyon miktarı</b> | Bölünme oranına bağlı   | Her bileşen için 50 ng  |
| <b>Enjeksiyon hassasiyeti</b>      | Zayıf   | İyi   |
| <b>Enjektör sıcaklığı</b>          | 250-320°C   | 200-280°C   |
| <b>İlk kolon sıcaklığı</b>         | Yok   | Numune bileşeninde yer alan kaynama noktasının 20-40 °C altında |
| <b>Avantajlar</b>                  | Bölme oranındaki varyasyon aşırı yüklenmeyi önler                                 | Doğrudan miktar tayini  |
| <b>Dezavantajlar</b>               | Numune kaybı; numune ayırımı; yan bileşen analizi ve doğrudan miktar tayini zayıf | Sınırlı uygulanabilir çözücü                                    |

## **Gaz Kromatografisinde Kullanılan Kolonlar**

GC'de kolon, sıcaklığı programlanabilir kolon fırınının içine yerleştirilir. Kromatografik ayırım boyunca, fırın sıcaklığı tipik olarak dakikada 4-20°C oranında düzenli olarak artar. Sonuç olarak, daha yüksek kaynama noktası ve/veya sabit fazda daha güçlü alıkonma ile bileşenler başarılı bir şekilde ayrılır. Sabit faza bağlı olarak maksimum sıcaklık uygulanır. Maksimum çalışma sıcaklığında, kolonun çalışması kolon kanamasına neden olur ve MS iyon kaynağı daha hızlı kontamine olur. Kolon kanaması, destek katısı üzerine adsorplanmış sıvı sabit fazın, hareketli faz tarafından kolayca sürüklenip götürülmesidir. Bunun sonucunda, adsorplanan sıvı materyalin miktarı zamanla değişir ve kolonda yapılan ayırımın tekrarlanabilirliği düşer, bir süre sonra da kolon kullanılamaz duruma gelir. Kolon kanamasını engellemek için sabit faz katı destek materyalin üzerine kimyasal olarak bağlanmaktadır.

GC kolonun çalışma aralığındaki yetersiz uçuculuğa sahip bileşenlerin analizi uçucu türevleri oluşturularak yapılabilir.

GC-MS uygulamalarında dolgulu ve kapiler kolon olmak üzere iki tip kolon kullanılmaktadır. Son yıllarda en sık kullanılan kolon kapiler kolondur.

Standart bir kolonun iç çapı 0,25 ile 0,53 mm, sabit faz film kalınlığı da 0,1 ile 2 µm aralığındadır. GC-MS'de daha çok 0,25 mm iç çapa sahip kolonlar kullanılır. Bu kolonlar optimum doğrusal gaz akış hızına ve ideal pompalama kapasitesine sahiptir (yaklaşık 300 mm s<sup>-1</sup> helyum, yaklaşık 1 mL dk<sup>-1</sup>'ya eşdeğerdir). Daha iyi doygunluk ve/veya yüksek numune kapasitesi gösteren geniş-delik 0,53 mm iç çaplı kolonlar jet ayırıcı ile birlikte kullanılır. Isıya duyarlı ve yüksek kaynama noktalı bileşikler için ise daha ince film kullanılırken düşük kaynama noktasına sahip bileşikler için kalın film daha iyidir.

### **Dolgulu Kolonlar**

170-260 µm çapında ince taneli katı dolgu materyali ile 2-3 m uzunluğa ve 2-4 mm iç çapına sahip 0,05-1 µm ince bir sabit faz ile kaplanmış cam veya metalden yapılmış kolonlar doldurularak oluşturulur. Bu kolonların etkinliği kapiler kolonlara göre daha düşüktür.

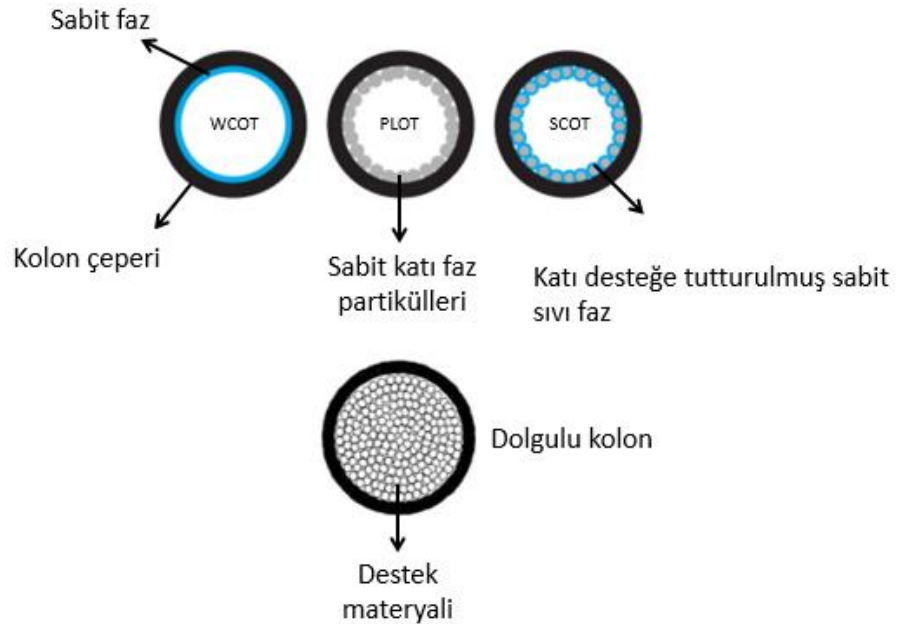
## Açık Kapiler Kolonlar

Tipik bir açık kapiler kolon dışı polimid kaplı ergitilmiş silikadan yapılmaktadır. Klasik bir kolonun uzunluğu uygulamaya bağlı olarak 10 ile 100 m arasındadır. Isıya duyarlı ve yüksek kaynama noktalı bileşikler gibi hızlı analiz gereken durumlarda daha kısa kolonlar kullanılır. Uzun kolonlar ise yüksek çözünürlüklü ayırım gerçekleştirmek için kullanılır.

Sabit faz kolon duvarına farklı yollarla uygulanması ile oluşan destek kaplı açık kapiler (SCOT), çeperi kaplı açık kapiler (WCOT), gözenekli katmanlı açık kapiler (PLOT) ve çeperi kaplı yüksek kapasiteli açık kapiler (WSCOT) kolonlar kullanılmaktadır (Şekil 2.17).

### Destek Kaplı Açık Kapiler Kolonlar (SCOT)

SCOT kolonda kolon duvarı sabit sıvı faza destek olan küçük partiküllerle ince tabaka halinde kaplanmıştır. Sabit sıvı faz bu destek materyalinin iç duvarına tutturulmuştur. SCOT kolonlar ayırma verimliliğini düşürürken yüksek numune kapasitesi sağlar.



Şekil 2.17. WCOT, PLOT, SCOT ve Dolgulu kolonlar



- **Çeperi Kaplı Açık Kapiler Kolonlar (WCOT)**

WCOT kolonlarda ince hareketsiz film gibi sabit sıvı faz uygulanır ve kolonun iç duvarına tutundurulur. En sık kullanılan kolon tipidir.

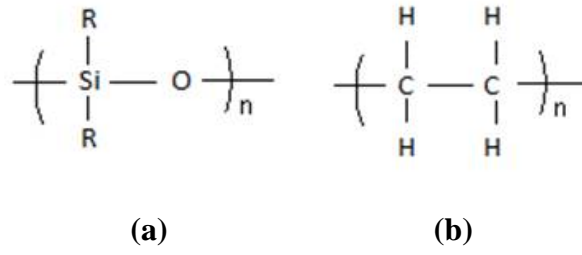
- **Çeperi Kaplı Yüksek Kapiteli Açık Kapiler Kolonlar (WSCOT)**

WSCOT kolonlarda kalın sabit faz filmi kullanılır. Bunlar kolon duvarının daha yüksek numune kapasitesine sahip olmasını sağlar.

- **Gözenekli Katmanlı Açık Kapiler Kolonlar (PLOT)**

PLOT kolonlarda ise gaz-katı kromatografisini gerçekleştirmek amacıyla kapiler kolonun dış çeperinde kullanılan kaynama noktası yüksek sıvılarla kaplanmış katı destek materyal sabit katı faza tutundurulur.

Sabit fazın polaritesi birçok parametre ile karakterize edilebilir. Bu amaç için 1966'da Rohschneider ve 1970'de McReynolds sabit faz ve analit grupları arasında etkileşimleri belirlemek için birçok test tasarlamışlardır. Alıkonma faktöründen yola çıkarak benzen, 1-bütanol, 2-pentanon, nitropropan ve piridinin farklı sabit fazlar üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. GC kolon üreticisi Chrompack firması McReynolds'ın yöntemine dayanarak sabit fazın polaritesini ifade eden CP indeksi oluşturmuştur. Buna göre, alıkonma faktörü ve polarite arasındaki ilişkiyi yola çıkarak sabit fazın polaritesine göre 0-100 arası bir değer belirlenmiştir. Bu değer 0 olduğu sabit faz aşırı apolar, 100 olduğu ise çok fazla polardır. (79). Günümüzde GC'de en sık kullanılan apolar sabit fazlar, polisiloksanlar ve sübstütientleridir. Bu kolonların kararlılıkları R grupları yerine metil, fenil, siyanopropil, trifloropropil grupların getirilmesiyle değişkenlik gösterir (Şekil 2.18.a). En çok kullanılan polar sabit faz ise polietilen glikoldür (Şekil 2.18.b).



**Şekil 2.18.** Polisisiloksan (a) ve polietilen glikol (b) kolonların yapısı

Günümüzde en çok kullanılan sabit fazlar Tablo 2.4’de verilmiştir.

**Tablo 2.4.** GC’de kullanılan sabit fazlar (80, 81)

| CP indeks | Fazlar*                                     | Bileşim   | Maksimum çalışma sıcaklığı (°C) |
|-----------|---|---|---------------------------------|
| 2         | CP-Sil 2                                    | Benzer organik karışım                              | 200                             |
| 5         | CP-Sil 5<br>DB-1<br>HP-1<br>SPB-1           | Dimetilpolisiloksan                                 | 325                             |
| 8         | CP-Sil 8<br>DB-5<br>HP-5<br>SPB-5           | %5 fenil-%95 dimetilpolisiloksan                    | 325                             |
| 19        | CP-Sil 19<br>DB-1701<br>HP-1701<br>SPB-1701 | %14 siyanopropil fenil-<br>%86 dimetil polisiloksan | 275                             |
| 24        | CP-Sil 24<br>DB-17<br>HP-50<br>SPB-50       | %50 fenil-%50 dimetilpolisiloksan                   | 280                             |
| 43        | CP-Sil 43<br>DB-225                         | %25 siyanopropil-<br>%25 fenil-                     | 200                             |

|    |   |   |     |
|----|---|---|-----|
|    | HP-225  | %50<br>dimetilpolisiloksan                          |     |
| 52 | CP-Wax 52<br>DB-Wax<br>HP-INNOWax<br>Supelcowax | Polietilen glikol                                   | 250 |
| 58 | CP-Wax 58<br>DB-FFAP<br>HP- FFAB<br>Nukol       | Polietilen glikol<br>nitroter-fitalik asit<br>ester | 250 |

\*Farklı üreticiler tarafından farklı adlandırılan benzer fazlar bulunmaktadır. Chrompack fazları (CP-Sil), J&W (DB), Agilent teknolojileri (HP), Supelco (SPB) olarak kodlama yapılmıştır.

### **Dedektörler**

GC’de kullanılan ideal bir dedektör,

- Yeterli duyarlılık,
- Yüksek kararlılık ve tekrarlanabilirlik,
- Geniş ve doğrusal çalışma aralığı,
- 400°C’ye kadar çalışma sıcaklığı,
- Yüksek güvenilirlik,
- Kullanım kolaylığı,
- Yüksek seçicilik gibi özelliklere sahip olmalıdır.

Gaz kromatografide en çok kullanılan detektörlere ilişkin karşılaştırmalar Tablo 2.5’de verilmiştir.

**Tablo 2.5.** GC’de kullanılan dedektörlerin karakteristik özellikleri (82)

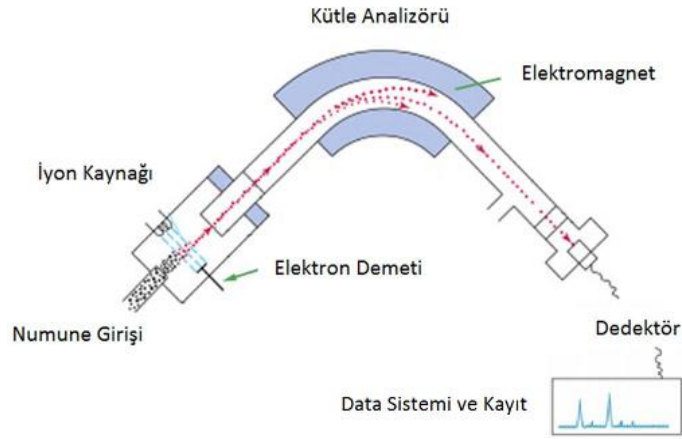
| <b>Dedektör</b>          | <b>Özgünlük</b>                      | <b>Alt tayin sınırı -<br/>Üst tayin sınırı</b>             |
|--------------------------|--------------------------------------|--|
| <b>Termal iletken</b>    | Özgün değil                          | $10^{-9}$ g/mL – $10^5$                                    |
| <b>Alev iyonizasyon</b>  | CH gruplara                          | $10^{-12}$ g/s - $10^7$                                    |
| <b>Elektron yakalama</b> | Elektronegatif<br>gruplara           | $10^{-14}$ g/mL – $10^5$                                   |
| <b>Termiyonik</b>        | P ve N                               | $10^{-12}$ g/s (P) - $10^5$<br>$10^{-12}$ g/s (N) - $10^5$ |
| <b>Alev fotometrik</b>   | P ve S                               | $10^{-13}$ g/s (P) - $10^4$<br>$10^{-12}$ g/s (N) – $10^3$ |
| <b>Kütle</b>             | Tüm iyonize<br>moleküler parçacıklar | $10^{-13}$ g – $10^6$                                      |

Bu tez çalışmasında kütle dedektörü kullanıldığından bu dedektör ayrıntılı olarak incelenecektir.

### 2.6.2. Kütle Spektroskopisi (MS) (83-86)

MS’in çalışma prensibi gaz fazındaki iyonların kütle/yük (m/z) oranına göre ayrılarak tespit edilmesidir. Elde edilen kütle spektrumu iyonların m/z oranının bir fonksiyonu olarak her iyonun bağlı çokluğunu gösterir. Nicel analiz için son derece önemli seçicilik elde edilir.

Bir kütle spektrometresi numune girişi, iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör ile veri kayıt sistemi olmak üzere beş kısımdan oluşur (Şekil 2.19). Modern kütle spektrometrelerinin çeşitli kısımları bilgisayar üzerinden kontrol edilebilmektedir.



**Şekil 2.19.** Kütle spektrometresinin temel kısımları

### Numune Giriş Kısmı

GC-MS sisteminde numune girişi açık kapiler kromatografik kolondan ya doğrudan ya da açık bölmeli ara bağlantı yoluyla gerçekleştirilir.

### Vakum Sistemleri

GC-MS sistemlerde, analit iyonizasyonu, kütle analizi ve iyon belirleme yüksek basınç altında yapılır. Bir pompalama kısmının bulunduğu vakum sistemi küçük turbo moleküler pompa ile boşaltılır, mekanik yangın pompası tarafından desteklenir. İyon ve molekül arası oluşabilecek tepkimeleri, iyonların dağılmasını ve nötralizasyonunu en aza indirerek kütle spektrometrelerinin en yüksek verimde çalışması için  $10^{-4}$  ile  $10^{-7}$  torr ( $10^{-2}$ - $10^{-5}$  Pa) basınç uygulanır. Hem daha büyük sistemler hem de modern araştırma dereceli kütle spektrometreleri genellikle pompalamanın yapıldığı iki farklı vakum kısmı içerir. Bunlar iyon kaynağı ve analizör bölgesidir.

### İyonizasyon Teknikleri

Kütle spektroskopisinde analitlerin iyonizasyonu ile farklı teknikler gerçekleştirilir. Birçok teknikte bir molekül bir elektron kaybederek pozitif yüklü bir iyon ( $M^+$ ) oluşturur. Bunun yanında iyon ve molekül tepkimesi sonucu  $MH^+$  şeklinde iyonların oluştuğu başka teknikler de vardır. Hangi tekniğin seçileceği, analitin gaz,

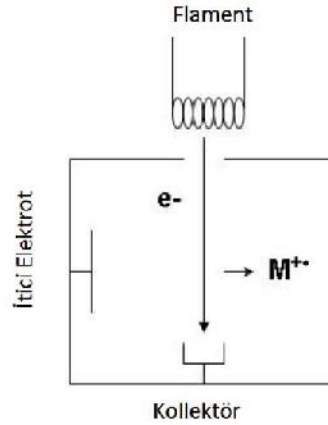
sıvı ve katı gibi fiziksel durumuna ve iyonlaşma enerjisine göre belirlenir. Kütle spektrometrelerinde kullanılan iyonizasyon teknikleri aşağıda verilmiştir;

- Elektron çarpışma tekniği
- Kimyasal iyonizasyon tekniği
- Alan iyonlaştırma tekniği
- Alan desorpsiyon tekniği
- Hızlı atom bombardımanı tekniği
- İkincil iyon kütle spektrometresi tekniği
- Elektrospray iyonlaştırması tekniği
- Matriks yardımcı desorpsiyon/iyonlaştırma tekniği
- Plazma desorpsiyon tekniği
- Termospay iyonlaştırma tekniği

Günümüzde en sık kullanılan iyonlaştırma teknikleri elektron çarpışma ve kimyasal iyonizasyon tekniğidir. Tez çalışmasında elektron çarpışma tekniği kullanıldığından bu teknik ayrıntılı olarak incelenecektir.

### **Elektron Çarpışma Tekniği (EI)**

En eski ve en sık kullanılan iyonlaştırma tekniğidir. Gaz fazındaki molekül, yüksek enerjili elektronlar ile bombardıman edilir (Şekil 2.20). Flamentten akım geçirilerek oluşturulan elektron bombardımanındaki elektronların çoğu homojen dağıtılmıştır, diğerleri analit molekülleri ile etkileşime girerek elektron uyarılmasına neden olur. Molekülden bir elektron kopararak pozitif yüklü iyon oluşturur. Bu iyon radikal bir katyondur ve genellikle  $M^+$  ile gösterilir.  $M^+$  iyonu moleküler iyon olarak adlandırılır. Moleküler iyonun  $m/z$  oranı analitin molekül kütlelerine karşılık gelir. EI sonucu oluşan iyonlar enerji dağılımı ile karakterize edilir. Bu enerji ortalama 2 ile 6 eV arasındadır. EI'de uygulanarak yüksek vakumlu iyon kaynağı kullanılır (genellikle  $\leq 10^{-2}$  Pa). Elektron iyonizasyon spektrumu yüksek tekrarlanabilirliğe sahiptir.



**Şekil 2.20.** Elektron çarpışma tekniği

### Kütle Analizörü

İyon kaynağında oluşturulan iyonlar, elektrik alan kullanılarak kütle analizörüne yönlendirilir. Kütle analizörü, iyonları zaman veya alan içindeki  $m/z$  oranlarına göre ayırır. En çok kullanılan kütle analizörleri aşağıda verilmiştir.

- Kuadrapol
- Magnetik sektörlü
- Uçuş zamanlı
- İyon tuzaklı
- İyon siklotron rezonans

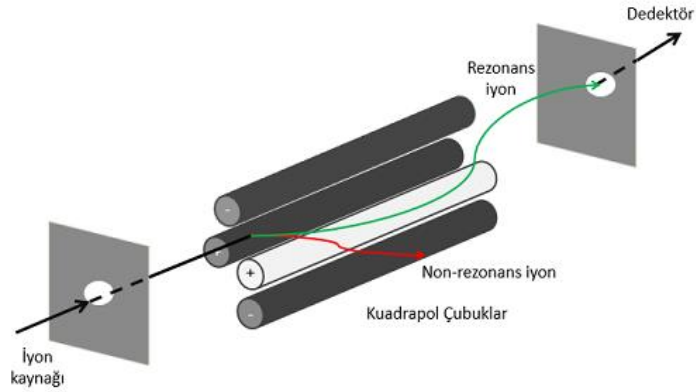
GC-MS cihazlarında en çok kuadrapol ve magnetik sektörlü kütle analizörleri kullanılmaktadır. Tez çalışmasında kuadrapol kütle analizörü kullanıldığından bu analizör ayrıntılı olarak incelenecektir.

### Kuadrapol Kütle Analizörleri

Kuadrapol kütle analizörü bir kütle filtresidir. Dört hiperbolik çubuk radyal dizi içine paralel yerleştirilir (Şekil 2.21). Çubukların karşısına pozitif veya negatif doğru akım (DC), titreşen radyo frekansı (RF) ve alternatif akım (AC) voltajı uygulanır. İyonlar kuadrapole 5-10 V' luk hızlandırıcı potansiyel uygulanarak gönderilir. İyonlar çubuk uzunluğuna dik düzlemde salınmaya başlar. Kuadrapol filtresi boyunca çapraz hareket ederler. Özel bir  $m/z$  oranına sahip iyonların yörüngeleri sabittir. Bu iyonlar detektöre doğru yönlendirilirler. Diğer  $m/z$  oranına sahip iyonların sabit bir yörüngeleri yoktur ve kütle filtresini geçemezler. Çünkü onların salınımlarının genliği

sonsuz olur. Farklı  $m/z$  oranına sahip iyonlar oranları ve salınım frekansları sabit tutulurken DC ve AC potansiyeli uzaklaştırıldığı zaman analizörden detektöre doğru ardışık olarak gönderilebilirler. Ayırım DC ve AC voltajlarının oranına bağlıdır.

Kuadrapol kütle analizörleri bileşiklerin kütlelerinin ve fragment iyonların belirlenmesi için uygundur. Kullanımı kolay olup hızlı tarama sağlar.



**Şekil 2.21.** Kuadrapol kütle analizörü

### Dedektör

Kütle analizöründen sonra iyonlar toplayıcı bir elektrot üzerine düşerek elektron çoğaltıcı detektöre geçer, iyon akımı oluşur ve digital sinyal olarak data sistemine aktarılır.

Dizi diyot elektron çoğaltıcı ve devamlı diyot elektron çoğaltıcı dedektörler kütle spektrometresinde en sık kullanılan dedektör çeşitleridir. Sinyali arttırarak çok düşük iyon akımlarının bile kaydedilmesini sağlarlar.

Kütle spektrometresinde SCAN, SIM ve tek iyon taraması olmak üzere 3 tip iyon tarama şekli vardır.

**SCAN:** Analiz sırasında hiçbir ayırım yapmadan tüm iyonlar belirlenen atomik kütle birimlik (akb) alanda taratılırlar.

**SIM:** Bulunması beklenen bileşik için en spesifik, kararlı ve bolluğu fazla olan  $m/z$  değerleri seçilir ve tarama bu değerlere göre gerçekleştirilir.

**Tek iyon taraması:** Tek iyon taratılır. Çok hassas sonuçlar verir.



## Veri Sistemi

Anlamlı sonuçlar elde edebilmek için çok fazla veri kütle spektrometresinin veri sistemi tarafından oluşturulur. Özellikle internet üzerinden kromatografi ile kombinasyon programları kullanılması oldukça önemlidir. Bu ileri seviye bilgisayar programları verileri işlemek, yorumlamak ve raporlamak için kullanılmaktadır.

### GC-MS Sisteminin Ayarlanması (Otomatik ayar)

GC-MS sisteminde iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektör kısımlarının analize başlamadan önce ve belirli aralıklarla kalibrasyonunun yapılması gerekmektedir. Böylece bu kısımlarda meydana gelebilecek sorunların önüne geçilmiş olur. Ayrıca yüksek vakum altındaki sistemde kaçak olup olmadığının kontrolü de gerçekleştirilmiş olur. Bu işlem yüksek uçuculuk ve kararlılığa sahip perfluorotributilamin (PFTBA) ile sistemde otomatik ayar yapılarak gerçekleştirilir. Molekülde hidrojen olmadığı için kütle hatalarına neden olmaz. Bu maddenin parçalanmasıyla oluşan 69, 219, 502 m/z oranına sahip iyon piklerinin bağıl bollukları kullanılarak kalibrasyon gerçekleştirilir. Tablo 2.6'da verilen kabul kriterleri analize başlamadan elde edilmelidir. Şekil 2.22'de GC-MS cihazından alınan bir otomatik ayar çıktısı yer almaktadır.

**Tablo 2.6.** PFTBA molekülüne ait parçalanma iyonlarının bağıl bollukları (87)

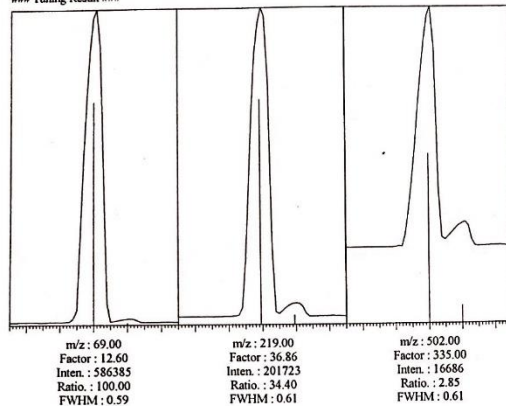
| Kütle | Bağıl bolluk (%) | İzotop kütlesi | İzotop oranı |
|-------|------------------|----------------|--------------|
| 69,0  | 100              | 70,0           | 0,5 – 1,6    |
| 219,0 | >35              | 220,0          | 3,2 – 5,4    |
| 502,0 | >1               | 503,0          | 7,9 – 12,3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

6/12/2017 08:33:41

C:\GCMSolution\SystemTune\20170509a.qgt

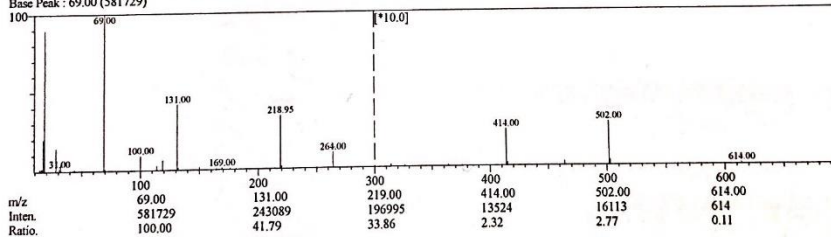
### Tuning Condition ###  
 Resolution Adjustment : YES  
 FWHM of Peak Profile : 0.6  
 Sensitivity Adjustment : YES  
 Target Mass Adjustment : 264.00  
 Mass Calibration : YES  
 Mass Pattern Adjustment : NO

### Tuning Result ###



MS : GCMS-QP2010 Ultra  
 Ionization Mode : EI  
 Tuning Date : 6/12/2017 8:33:39 AM  
 Filament# : 1  
 Lens1 : -2.0 V  
 Lens2 : -35.0 V  
 Lens3 : -0.6 V  
 Lens4 : -50.0 V  
 RF Gain : 4972  
 RF Offset : 4929  
 Pre-rod : -3.5 V  
 Detector : 0.92 kV  
 Ionization voltage : 70 V  
 Emission current : 60 uA  
 Main-rod : -3.5 V  
 Conversion dynode : 10 kV  
 IonSourceTemp : 230 °C  
 Low Vacuum : 1.0e+001 Pa  
 High Vacuum : 2.3e-004 Pa  
 Interface Temp. : 289 °C  
 Oven Temp. : 60 °C  
 Column Pressure : 207 kPa  
 Column Flow : 2.8 mL/min  
 Column Diameter : 0.25 mm  
 Column Length : 40.0 m

Scan Range: 10.00 - 700.00 Scan Speed: 156  
 Base Peak: 69.00 (581729)



Şekil 2.22. Otomatik ayar çıktısı

### 2.6.3. Türevlendirme Teknikleri

Sınırlı ısıl kararlılığa ya da yetersiz uçuculuğa sahip bileşikler GC için uygun değildir. Bu bileşikler türevlendirilerek uygun hale getirilir. Ayrıca türevlendirme basamağı, analiz edilecek karışımda kuyruklanmayı azaltıp pik şeklini düzeltmek, seçiciliği ve ayırıcılığı arttırmak için de kullanılmaktadır. Türevlendirmede genel hedef, analitin aktif protonunun kimyasal yer değiştirmesiyle polaritesinin azaltılmasıdır. MS’de türevlendirme moleküler iyon yoğunluğunu arttırabilir, parçalanmayı doğrudan etkileyebilir ya da iyonizasyon verimini geliştirebilir. Asetilleme, alkilleme ve sililleme en sık kullanılan türevlendirme teknikleridir.

#### Asetilleme

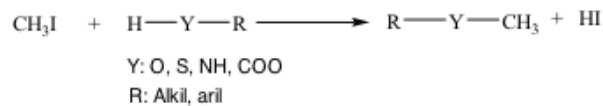
Asetilleme, alkol ve fenol hidroksil grubu ya da amin ve amid grubundaki aktif hidrojen ile bir asetil grubunun yer değiştirmesi ile oluşur. Asetilleme tepkimesinde asetik anhidrit, asetilimidazol, asetil klorür veya asetilaminler kullanılır (Şekil 2.23). En çok kullanılan bir asetilimidazol türevi olan N-metil-bis (trifluoroasetamid) (MBTFA)’dır.



Şekil 2.23. Asetilleme tepkimesi

#### Alkilleme

Alkillemede, analiz edilecek moleküldeki aktif hidrojen bir alkil veya bir aril grubu ile yer değiştirir (Şekil 2.24).

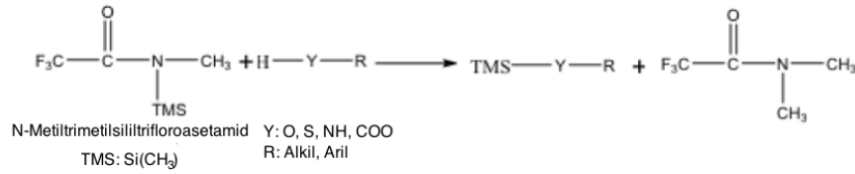


Şekil 2.24. Alkilleme tepkimesi

Bir alkilleme tepkimesi olan metilleme yönteminde bir metil grubu aktif hidrojen ile yer değiştirir. Metillemenin dezavantajı, tepkimenin tamamlanması için 2-24 saatlik bir süre gerekli olmasıdır. Son yıllarda mikrodalga tekniği uygulanarak bu süre kısaltılabilmektedir.

### Sililleme

GC-MS analizlerinde yaygın olarak kullanılan sililleme tekniğinde alkol, aminoasitler, karbonhidratlar, steroidler ve amino alkollerde bulunan aktif hidrojenle bir alkilsilil grubu yer değiştirir (Şekil 2.25). En çok trimetilsilil (TMS) türevi oluşturulur. Özellikleri değişkenlik gösteren birden fazla TMS reaktifi vardır.

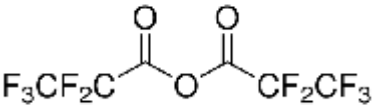
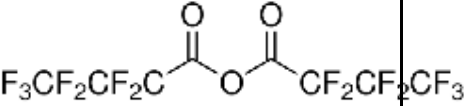
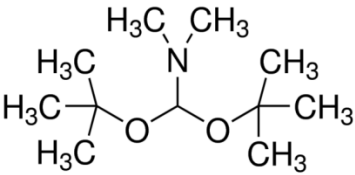
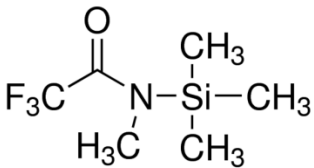
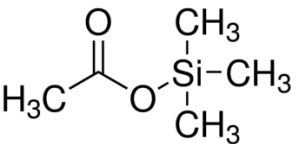
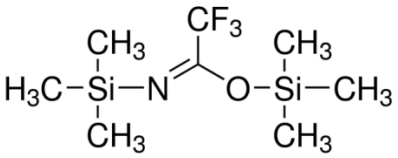


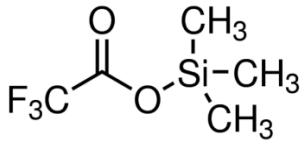
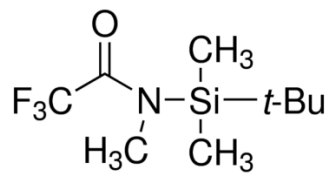
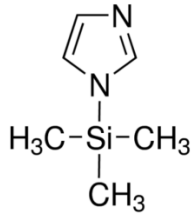
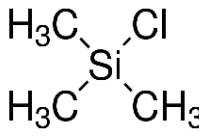
Şekil 2.25. Sililleme tepkimesi

En çok kullanılan türevlendirme reaktifleri Tablo 2.7’de verilmiştir.

Tablo 2.7. Türevlendirme reaktifleri

| Kimyasal adı                           | Kimyasal formülü | Türevlendirme tekniği |
|--|------------------|-----------------------|
| N-Metil-bis(trifluoroasetamid) (MBTFA) |                  | Asetilleme            |
| Trifluoroasetik asit anhidriti (TFA)   |                  | Asetilleme            |

|   |  |            |
|---|--|------------|
| Pentafluoropropiyonik anhidrit (PFPA)                               |    | Asetilleme |
| Heptafluobutirik anhidrit (HFBA)                                    |    | Asetilleme |
| <i>N,N</i> -Dimetilformamidedi- <i>tert</i> -bütil asetat           |    | Alkilleme  |
| Bor triflorür metanol   | $\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$   | Alkilleme  |
| Metil iyodür  | $\text{CH}_3\text{I}$  | Alkilleme  |
| <i>N</i> -Metil- <i>N</i> -(trimetilsilil)trifluoroasetamit (MSTFA) |  | Sililleme  |
| Trimetilsilil asetat  |  | Sililleme  |
| <i>N,O</i> -Bis(trimetilsilil)trifluoroasetamit (BSTFA)             |  | Sililleme  |

|  |  |           |
|--|--|-----------|
| Trimetilsilil trifluoroasetat  |  | Sililleme |
| <i>N-tert</i> -Butildimetilsilil- <i>N</i> -metiltrifluoroasetamit (MTBSTFA) |  | Sililleme |
| <i>N</i> -Trimethylsililimidazol (TMSI)                                      |   | Sililleme |
| Klorotrimetilsilan (TMCS)  |  | Sililleme |

#### 2.6.4. Numune Hazırlama

Numune hazırlama basamağı, analitik kimyada nicel analizler için en önemli işlemdir. Numune analizi, genellikle kan, plazma, idrar gibi bulunması istenen madde dışında birçok bileşenin yer aldığı karışık bir matriksten yapılır (88). Numune hazırlama basamağında, analiti deriştirmek ve numuneyi istenmeyen bileşenlerden temizleme işlemleri de bulunmaktadır. Bu yüzden analize başlamadan ön numune hazırlama işlemi uygulanması gerekir. Bu işlem için yöntem seçiminde,

- Analiz edilecek maddenin özellikleri,
- Çalışılan matriks,
- Yöntemin kolay uygulanabilirliği,
- Yöntemin ucuzluğu gibi parametreler önemli birer etkidir (89).

Bir karışımdan bir bileşiği uygun bir çözücü yardımıyla ayırma işlemine tüketme denir. Sıvı-sıvı tüketme ve katı faz tüketme teknikleri ile yapılan ön hazırlama işlemi maddelerin biyolojik materyalden analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır.

### 2.6.5 Sistem Uygunluk

Sistem uygunluk testi (SUT) analiz işlemine ya da gerçek numune çalışmasına başlamadan önce, analiz sırasında analitik sistemin uygunluğundan emin olmak için sistemin referans standart madde ile kontrol edilmesidir. Sıvı ve gaz kromatografisi için çok önemli bir faktördür.  $k'$ , enjeksiyon kesinliği,  $R_s$ , kuyruklanma faktörü (T) ve N değerleri Tablo 2.8'da belirtilen sınırlar içinde olmalıdır.

**Tablo 2.8.** SUT için geçerli parametreler ve değerleri

| Parametre            | Sınırlar                |
|----------------------|-------------------------|
| $k'$                 | $k' > 2$                |
| Enjeksiyon kesinliği | $n > 5$ ve $BSS < \% 1$ |
| $R_s$                | $R_s > 1.5$             |
| PAO                  | $PAO < 1.5$             |
| N                    | $N > 2000$              |

n: Enjeksiyon sayısı, BSS: Bağıl standart sapma

### 2.6.6. Analitik Yöntem Validasyonu (90, 91)

Analitik yöntem validasyonu, bir analizde bilimsel bütünlük ve uygunluğun sağlanması ile amaçlanan kullanım için yöntemin kesinliğinin, güvenilirliğinin ve kalitesinin belirlenen koşullara uygun olduğunun gösterilmesinde kullanılır. Bir analitik yöntemin, rutin kullanıma uygulanmadan önce, farklı cihaz, farklı matris gibi valide edilmiş yöntemin koşullarında herhangi bir değişiklik olduğunda, yöntem değiştirildiğinde ve değişiklik yöntemin orijinal kullanımını dışında ise valide edilmeye veya tekrar validasyona ihtiyacı vardır.

#### Validasyon Parametreleri

Yöntem validasyon değerlendirilmesi için validasyon parametreleri kullanılır. Bu parametrelerin analizi için farmakopeler veya Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Uygulamaları Kurumu (US FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi yasal kuruluşların hazırladığı kılavuzlar kullanılır.

Biyoanalitik yöntem validasyonu için incelenmesi gereken parametreler US FDA tarafından aşağıda şekilde sıralanmıştır (92).

- Kararlılık
- Özgünlük (Seçicilik)
- Doğrusallık
- Doğruluk
- Kesinlik
- Duyarlılık (Gözlenebilme sınırı (LOD) ve Alt tayin sınırı (LOQ))
- Sağlamlık
- Tutarlılık
- Sistem uygunluk
- Geri kazanım

### **Kararlılık**

Standart ve plazma numuneleri saklama, hazırlama, analiz sürecinde bozunmaya uğrayabilir. Bu numunelerin aşağıda belirtilen koşullarda kararlılığı incelenmelidir.

- Kısa dönem kararlılık
- Uzun dönem kararlılık
- Oto örnekleyici kararlılığı
- Donma ve çözme kararlılığı

Her koşul sonunda taze hazırlanmış çözeltinin çalışma koşullarındaki kararlılığı ile beklemiş numunelerin kararlılıkları istatistiksel hesaplamalar ile karşılaştırılır. Aralarında %2'den fazla fark bulunmaması istenir. Kararlılık çalışmalarında, taze hazırlanmış stok çözelti ve analit içermeyen, girişim yapmayan bir biyolojik matriks kullanılır. Analitin uygun şartlarda hazırlanan stok çözeltisinin derişimi bilinmelidir.

**Kısa dönem kararlılık;** Yüksek ve düşük derişimdeki standart çözeltiler ve plazma numunesi oda sıcaklığına getirilir, 4-24 saat süresince (çalışma sırasında kullanılan süreye göre) oda sıcaklığında tutulur ve aralıklarla analiz edilir.



**Uzun dönem kararlılık;** Yüksek ve düşük derişimdeki standart çözeltiler ve plazma örneği aynı şartlar altında saklanır (en fazla ilk alınan numune ile son numunenin analizi arasında geçen süre kadar) ve belirli aralıklarla analiz edilir.

**Oto örnekleyci kararlılığı;** Hazırlanan standart çözeltiler ve plazma numunelerinin, oto örnekleycide bekleme süresince kararlı olup olmadıkları incelenir.

**Donma-çözme kararlılığı;** 3 donma-çözme döngüsü uygulanır. Hazırlanan yüksek ve düşük derişimdeki en az 3'er standart çözeltiler ve plazma numuneleri belirlenen saklama sıcaklığında dondurulur ve en az 24 saat bekletilir ve oda sıcaklığında çözünür. Numuneler tamamen çözündükten sonra tekrar aynı koşullarda 24 saat boyunca dondurulur. Bu döngü toplamda 3 kez tekrarlanır ve döngü sonunda analiz edilir.

### **Özgünlük**

Yöntemin sadece hedeflenen bileşen veya bileşenleri, ortamda bulunan diğer bileşenlerden kaynaklanan girişim olmadan tayin edebilme yeteneğidir. Sayısal bir değeri yoktur. US FDA biyoanalitik yöntem kılavuzuna göre seçicilik için en az altı farklı biyolojik materyalden analiz yapılmalıdır ve herhangi bir girişim olup olmadığı kontrol edilmelidir. Bir biyolojik matrikste girişim yapabilecek maddeler aşağıda verilmiştir;

- Biyolojik matriksteki endojen bileşikler
- Metabolitler
- Ayrışma ürünleri ve bozunma ürünleri
- Safsızlıklar
- Yardımcı maddeler
- İlaçların birlikte uygulanması

Eğer yöntem birden fazla maddeyi analiz etmek için kullanılacak ise tayin edilecek maddeler de birbirleri ile girişim yapmamalıdır.

### **Doğrusallık**

Doğrusallık, bilinen analit derişimi ile ölçülen sinyalin doğru orantılı sonuç sağlayabilme yeteneğidir. Derişime karşı sinyal grafiğe geçirilerek kalibrasyon

doğrusu elde edilmiş olur. Daha sonra hazırlanan standart çözeltilerin analizi yapılır ve sonuçlar bu kalibrasyon doğrusu verileri ile hesaplanır ve hazırlanan analit derişimine karşı bulunan standart derişimi grafiğe geçirilerek, doğrusallığı irdelenir. Doğrunun eğimi, y eksenini kestiği nokta ve korelasyon katsayısı belirtilerek regresyon analizi ve gerekli istatistiksel değerlendirmeler yapılmalıdır.

US FDA biyoanalitik yöntem geçerliliği kılavuzuna göre, alt tayin sınırı (LOQ) dahil en az beş nokta seçilir ve bu noktadaki gerçek derişim ile bulunan derişim arasında standart sapması, LOQ seviyesinde %20 diğer derişimlerde %15'e kadar olanlar kabul edilir.

### **Doğruluk**

Bir yöntemin doğruluğu kullanılan yöntem ile elde edilen sonuçların gerçek değere ne kadar yakın olduğunu gösterir. Doğruluk üç farklı şekilde belirlenebilir.

- I. Bilinen derişimlerdeki standartların analizleri, 3 farklı derişimde en az 3 tekrarlı aynı gün içinde (intra-day) ve 6 farklı günde (inter-day) yapılarak bulunan değerlerle gerçek değerler karşılaştırılır. Sonuçlar % bağıl hata (bias) ile değerlendirilir.
- II. Kullanılan yöntemle bulunan değerler kaynaklarda bulunan geçerliliği kanıtlanmış yöntemle karşılaştırılır.
- III. Standart ekleme tekniği ile geri kazanım değerleri hesaplanır.

### **Kesinlik**

Bir analitik yöntemin kesinliği, sonuçların tekrarlanabilirliğini gösterir. Farklı derişimlerdeki standartların tekrarlı analizleri yapılarak bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplanır ve standart sapmanın ortalamaya göre % kaçlık değişim gösterdiği bulunur.

Doğrusal aralıkta bulunan 3 derişim değerinde hazırlanan numunelere gün içi ve günler arası analizler uygulanır ve BSS hesaplanır. Kesinliği belirlemede sistem (enjeksiyon) tekrarlanabilirliği de kontrol edilir. Sistem tekrarlanabilirliğinde doğrusal aralıkta bulunan bir derişim değerinde hazırlanan bir numuneden arka arkaya 10 enjeksiyon yapılarak bağıl standart sapma hesaplanır.

Doğrusal aralıkta bulunan 3 derişim değerinde hazırlanan numunelere gün içi ve günler arası analizler uygulanır ve BSS hesaplanır.

### **Duyarlılık**

Gözlenebilme sınırı (LOD), analitin bir analitik yöntemle nitel olarak tayin edilebilen nicel olarak bir anlam ifade etmesinin gerekmediği derişimdir. LOD'yi saptamada üç farklı yaklaşım vardır.

- I. Sinyal/gürültü (S/G) oranı: Analitik yöntemde zemin gürültüsü varsa S/G oranından yararlanır. Derişimi (düşük) bilinen numunelerden ölçülen değer, kör numunelerinki ile karşılaştırılır ve tayin edilebilecek en düşük derişim belirlenir.  $S/G = 3$  olduğu değer LOD değeri olarak kabul edilir. Ancak bu değer alet, matriks gibi değişkenlere göre farklılık gösterir.
- II. Görsel değerlendirmeye dayanır: Bilinen derişimdeki analitten güvenilir bir şekilde en düşük derişimin saptanmasıdır.
- III. Sinyalin standart sapması (s) ve kalibrasyon doğrusunun eğimi (S) ile hesaplanır:  $LOD = 3,3 s/S$  olarak bulunur.

Bir analitik yöntemde alt tayin sınırı (LOQ), analitin kabul edilebilir nicel sonuç verebilen uygun kesinlik ve doğrulukta tayin edilebilecek en düşük derişimidir. LOQ'yu saptamada üç farklı yaklaşım vardır.

- i. Sinyal/gürültü (S/G) oranı: Zemin gürültüsü veren analitik bir yöntemde S/G oranı düşük derişimlerde hazırlanan analitin sinyalinin kör çözelti sinyaliyle karşılaştırılmasıyla bulunur. S/G oranınının 10:1 olduğu değer LOQ değeri olarak kabul edilir.
- ii. Görsel değerlendirmeye dayanır: Bilinen derişimdeki analitten doğru ve kesin bir şekilde en düşük derişimdeki miktarının bulunmasıdır.
- iii. Sinyalin standart sapması (s) ve kalibrasyon doğrusunun eğimi (S) ile hesaplanır:  $LOQ = 10 s/S$  olarak bulunur.

### **Sağlamlık**

Sağlamlık, yöntem parametrelerine uygulanan kasıtlı küçük değişimlerden yöntemin güvenilirliğinin etkilenmeden kalabilme kapasitesini gösterir. Örneğin,

hareketli faz bileşimi, akış hızı, pH gibi parametrelerde küçük değişiklikler yapılır ve sonuçlara ait BSS değerleri karşılaştırılır.

### **Tutarlılık**

Bir analitik yöntemin tutarlılığı, yöntemin farklı analizci, farklı cihaz veya farklı laboratuvar gibi değişikliklerde yeniden üretilebilirliğinin derecesidir. Her bir durumda elde edilen sonuçlar arasında fark olup olmadığı istatistiksel olarak gösterilir.

### **Geri Kazanım**

Analitin geri kazanımı, plazma, idrar gibi biyolojik matrikse eklenen ve çeşitli tüketme yöntemlerinden sonra analitin analiz sonunda verdiği cevap ile saf standart çözeltinin analizinden elde edilen cevabın karşılaştırılmasıdır. Analitin geri kazanım sonucunun kesin, doğru ve verimli olması istenir. Geri kazanım çalışmasında numuneler düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı derişimde hazırlanır, tüketme işleminden sonra alınan cevap ile tüketilmeyen standart maddenin cevabı karşılaştırılır.

### 3. DENEYSEL KISIM

#### 3.1. Kullanılan Cihazlar

- Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra MSD
- Vakumlu santrifüj Hermle Z 233 M-2 (15000 dev dk<sup>-1</sup>)
- 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+tri-metil-klorosilan (MSTFA + %1 TMCS) Thermo
- N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroasetamit+tert-bütildimetilklorosilan (MTBSTFA + %1 TBDMSCI) Sigma
- N-metil-bis(trifluoroasetamit) (MBTFA) Sigma
- Piridin(≥ %99,5) Sigma
- Aseton Sigma
- 2-hidroksi bütirik asit (2-HB) Sigma
- 3-hidroksi bütirik asit (3-HB) Sigma
- β-hidroksi izovalerik asit (β-HIVA) Sigma

- Urasil (URA) Sigma
- L-glutamik asit (GLU) Sigma
- Maltoz monohidrat (MAL) Sigma
- D-(+)-melezitoz hidrat (MEL) Sigma
- Miristik asit-d27 (İS) Sigma
- Asetonitril ( $\geq$  %99,5) Sigma
- Metanol ( $\geq$  %99,5) Sigma
- İsopropil alkol Sigma
- Helyum gazı (%99,9) Ankara Gaz

### 3.3. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler

- DB5-MS kolon (30 m  $\times$  0,25 mm, 0,25  $\mu$ m + ön kolon 10 m) Agilent
- 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  $\mu$ L
- Mikropipet ucu Isolab  
0,1-10, 10-100, 100-1000,  
1000-5000  $\mu$ L
- Balon joje 5-50 mL pyreks®

### 3.4. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

**2-HB stok çözeltisi (2000 µg mL<sup>-1</sup>):** 10,0 mg standart 2-HB tartılıp 5 mL'lik balon jøjeye alınmış üzerine yaklaşık 2 mL MeOH:su (1:1) (h:h) karışımı eklenerek ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandıktan sonra aynı çözücü karışımı ilave edilerek hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. 2-HB çalışma standartları bu stok çözeltiden MeOH:su (1:1) (h:h) ile uygun seyreltmeler yapılarak günlük olarak hazırlanmıştır.

**3-HB stok çözeltisi (2000 µg mL<sup>-1</sup>):** 10,0 mg standart 3-HB tartılıp 5 mL'lik balon jøjeye alınmış üzerine yaklaşık 2 mL MeOH:su (1:1) (h:h) karışımı eklenerek ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandıktan sonra aynı çözücü karışımı ilave edilerek hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. 3-HB çalışma standartları bu stok çözeltiden MeOH:su (1:1) (h:h) ile uygun seyreltmeler yapılarak günlük olarak hazırlanmıştır.

**β-HIVA stok çözeltisi (2000 µg mL<sup>-1</sup>):** 10,0 mg standart β-HIVA tartılıp 5 mL'lik balon jöje içerisinde yaklaşık 2 mL MeOH:su (1:1) (h:h) karışımı ile çözünmesi sağlandıktan sonra aynı çözücü karışımı ilave edilerek hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. β-HIVA çalışma standartları bu stok çözeltiden MeOH:su (1:1) (h:h) ile uygun seyreltmeler yapılarak günlük olarak hazırlanmıştır.

**URA stok çözeltisi (2000 µg mL<sup>-1</sup>):** 10,0 mg standart urasil tartılarak 5 mL'lik balon jøjeye alınmış, yaklaşık 2 mL distile su ile çözünmesi sağlandıktan sonra distile su ilave edilerek hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. URA çalışma çözeltileri bu stok çözeltiden distile su ile uygun seyreltmeler yapılarak günlük olarak hazırlanmıştır.

**GLU stok çözeltisi (2000 µg mL<sup>-1</sup>):** 10,0 mg standart GLU tartılarak 5 mL'lik balon jøjeye alınmış, yaklaşık 2 mL distile su ile çözünmesi sağlandıktan sonra distile su ilave edilerek hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. GLU çalışma çözeltileri bu stok çözeltiden distile su ile uygun seyreltmeler yapılarak günlük olarak hazırlanmıştır.

**MAL stok çözeltisi (2000 µg mL<sup>-1</sup>):** 10,0 mg standart maltoz tartılarak 5 mL'lik balon jøjeye alınmış, yaklaşık 2 mL distile su ile çözünmesi sağlandıktan sonra distile su ilave edilerek hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. MAL çalışma çözeltileri bu stok çözeltiden distile su ile uygun seyreltmeler yapılarak günlük olarak hazırlanmıştır.

**MEL stok çözeltisi (2000 µg mL<sup>-1</sup>):** 10,0 mg standart melezitoz tartılıp 5 mL'lik balon joje içerisinde yaklaşık 2 mL MeOH:su (1:1) (h:h) karışımı ile çözünmesi sağlandıktan sonra aynı çözücü karışımı ilave edilerek hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. MEL çalışma çözeltileri bu stok çözeltiden MeOH:su (1:1) (h:h) ile uygun seyreltmeler yapılarak günlük olarak hazırlanmıştır.

Kullanılan bütün stok çözeltiler 1000'er µL ependorf tüplere aktararak -20°C de saklanmıştır.

**Metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi (20 mg mL<sup>-1</sup>):** 5,0 mg metoksiamin hidroklorür katısı tartılarak viale alınır. Üzerine otomatik mikropipet (100-1000 µL) ile 250 µL piridin ilave edilir, tamamen çözünmesini sağlamak için vortekslenir. Her analiz öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.

**Miristik asit-d27 (İS) çözeltisi (2000 µg mL<sup>-1</sup>):** 2,0 mg standart miristik asit-d27 tartılarak 2 mL'lik ependorf tüpe alınmış, üzerine 1 mL metanol ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Miristik asit-d27 çalışma çözeltileri bu stok çözeltiden metanol ile seyreltmeler yapılarak hazırlanmıştır. Her analiz öncesinde taze hazırlanarak kullanılmıştır.

#### **Çalışma standartları:**

- a. Standart karışım çözeltisi (100 µg mL<sup>-1</sup>); Her bir metabolitin stok çözeltisinden (2000 µg mL<sup>-1</sup>) 50 µg mL<sup>-1</sup> alınmış ve 650 µL su ilave edilerek hacim 1 mL'ye tamamlanmıştır. Standart karışım çözeltisi günlük olarak hazırlanmıştır.
- b. Kalibrasyon doğrusu için çalışma standartları; İstenen derişimde çalışma standartı hazırlamak için standart karışım çözeltisinden uygun hacimlerde alınmış, kuruluğa kadar uçurulup, 20 µL metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi eklenmiş 90 dk 30°C'de bekletilmeyi takiben 60 µL MSTFA + %1 TMCS eklenmiş ve 25 dk 60°C'de bekletildikten sonra GC-MS viallerine aktarılmıştır.



### 3.5. Etik Kurul İzni

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan GO14/173 no'lu "Down Sendromunun Yüksek Seçicilikte Tanısı için Metabolomik Yaklaşımlar" isimli proje için alınan etik kurul izninin bu tez kapsamında da kullanılması 19.09.2014 tarihli etik kurul kararıyla uygun bulunmuştur (Ek 1).

### 3.6. Plazma Numunelerinin Alınması ve Saklanması

Numuneler, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Perinatoloji Bilim Dalı tarafından gebeliğin 11-22. hafta arasında CVS veya amniyosentez uygulanması sonucu invaziv plarental tanı konulan hasta gebelere ve sağlıklı gebelere ait plazma numuneleri alınmıştır.

Gebelerden EDTA'lı tübe alınan 5 mL tam kandan santrifüj sonrası elde edilen plazma numuneleri, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında -20°C'de analize kadar saklanmıştır.

### 3.7. Analiz Yöntemi

#### 3.7.1. Protein Çöktürmesi

100 µL boş plazma veya su üzerine standart karışım çözeltisinden belirlenen hacimlerde alınmış, 10 µL İS (100 µg mL<sup>-1</sup>) ve protein çöktürmesi için 790 µL asetonitril ilave edilmiştir. Toplam hacim 1 mL'ye su ile tamamlanmıştır. 1 dk vortekslenildikten sonra vakumlu santrifüj ile 15000 dev dk<sup>-1</sup>'de 10 dk santrifüjlenmiştir. 750 µL supernatant alınarak kuruluğa kadar uçurulmuştur.

#### 3.7.2. Türevlendirme

Ependorf tübün içerisine 10 µg mL<sup>-1</sup> standart karışım çözeltisi konulup 1 saat uçurulduktan sonra üzerine 20 µL metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi eklenmiş, 1 dk vortekslenip ve 30°C'de 90 dk etüvde bekletilmiştir. Etüvden çıkarılıp oda sıcaklığına getirildikten sonra üzerine 80 µL türevlendirme reaktifi (MSTFA + %1 TMCS, MTBSTFA + %1 TBDMSCI, BSTFA) eklenip maddenin farklı sıcaklıklarda (37, 50 ve 60°C) ve farklı zaman dilimlerinde (10, 15, 20, 25, 30 dk) türevlendirilmesi sağlanmıştır. MSTFA + %1 TMCS ve MTBSTFA + %1 TBDMSCI türevlendirme

reaktifleri için piridinli metoksiamin hidroklorür 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.

### 3.7.3. Kromatografik Koşullar

Analiz için Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra cihazı ve %5 difenil %95 dimetilpolisiloksan (30 m +10 m ön kolon; 0,25 mm iç çap ve 0,25 µm film kalınlığı) kapiler kolon kullanılmıştır. Fırın sıcaklık programı; 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 6 dk beklenir ve soğutulur. Kütle Seçici Dedektör (MSD) transfer bölmesi sıcaklığı 290°C'dir. Sabit faz helyum ve akış hızı 2,80 mL dk<sup>-1</sup>'dir. Enjeksiyon türü bölmeli ve oranı 1:10'dur. Çözücü gecikme süresi 5,90 dk ve toplam analiz süresi 25 dk olarak ayarlanmıştır. İç standart olarak miristik asit-d27 kullanılmıştır.

Günlük çalışmanın başlangıcında otomatik ayar yapılmış ve otomatik ayar şartları kaydedilmiştir. Her analiz öncesinde, yıkama çözeltileri olarak kullanılan aseton şişeleri yenilenmiştir. Türevlendirmenin vialle alındıktan sonra da bir süre devam ettiği varsayılarak ve cihazın dengelenmesi için her seri analizin başlangıcında en az 2 kere aseton enjeksiyonu yapılmıştır.

### 3.8. Sistem Uygunluk Testi (SUT)

SUT, 1 µg mL<sup>-1</sup> standart karışım çözeltisinin on tekrarlı enjeksiyonu yapılmış olup elde edilen veriler Amerika Farmakopesi'nde (USP) (93) belirtilen ve Tablo 2.9'da verilen enjeksiyon kesinliği, kapasite faktörü, ayırıcılık, teorik tabak sayısı ve pik asimetri oranına göre değerlendirilmiştir.

### 3.9. Yöntem Validasyonu (92)

Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmalarında, US FDA yönetmeliğinde yer alan biyolojik materyal analizi için kararlılık, özgünlük, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, duyarlılık, sağlamlık ve tutarlılık parametreleri incelenmiştir.

#### 3.9.1. Kararlılık

**Kısa dönem kararlılık;** 1 ve 10 µg mL<sup>-1</sup> derişimde metabolit standart karışım çözeltileri oda sıcaklığında 6, 12, 24 saat beklendikten sonra analiz edilmiştir (n = 3). Aynı derişimde taze hazırlanmış standart çözeltilerle karşılaştırılarak kalan miktarlar hesaplanmıştır.

**Uzun dönem kararlılık;** 1 ve 10 µg mL<sup>-1</sup> derişimde metabolit standart karışım çözeltileri -20<sup>0</sup>C'de (derin dondurucuda) 1 ay bekletilmiş ve oda sıcaklığına kadar ısınması beklendikten sonra analiz edilmiştir (n = 3). Aynı derişimde taze hazırlanmış standart çözeltilerle karşılaştırılarak kalan miktarlar hesaplanmıştır.

**Oto örnekleyci kararlılığı;** 1 ve 10 µg mL<sup>-1</sup> derişimde türevlendirilen standart ve plazma numune çözeltileri analiz edildikten sonra 24 saat oto örnekleyci de bekletilmiş ve tekrar analiz edilmiştir (n = 3).

**Donma-çözme kararlılığı;** 1 ve 10 µg mL<sup>-1</sup> derişimde derişimde metabolit standart karışım çözeltileri -20<sup>0</sup>C'de 24 saat dondurulmuş (n = 3), derin dondurucudan çıkarılıp oda sıcaklığına geldiği zaman analiz edilmiştir. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 döngü oluşturulmuştur. Aynı derişimde taze hazırlanmış standart çözeltilerle karşılaştırılarak kalan miktarlar hesaplanmıştır.

Ayrıca 10 µg mL<sup>-1</sup> 2-HB, 3-HB, URA, GLU, MAL ve MEL eklenmiş plazma numunelerinin oda sıcaklığında 6, 12, 24 saat beklendikten sonra, -20<sup>0</sup>C'de (derin dondurucuda) 1 ay bekletildikten sonra oda sıcaklığına getirilmiş ve analiz edilmiştir. Donma-çözme döngüsü 3 kez tekrarlanmıştır. Aynı derişimde taze hazırlanmış plazma numuneleri ile karşılaştırılarak kalan miktarları hesaplanmıştır (n = 3).

### 3.9.2. Özgünlük (Seçicilik)

Özgünlük, 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL'in çalışma standart çözeltilerinde derişim ile doğru orantılı pik alan artışı, alıkonma zamanlarında kayma olup olmadığı ve m/z değerlerinin irdelenmesi ile belirlenmiştir.

### 3.9.3. Doğrusallık

Doğrusallığın saptanması için 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 20 ve 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  aralığında 12 farklı derişim seviyesinde çalışma standart çözeltileri hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi, her bir standart maddenin pik alanının İS'nin pik alanına bölünmesiyle elde edilen değer derişime karşı grafiğe geçirilmesi ile oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi ve tanımlayıcılık katsayısı hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü ve korelasyon katsayısı önem kontrol testleri yapılmıştır. Ayrıca yöntemin doğrusallığının kontrolü için olması gereken derişime karşı kalibrasyon verileri kullanılarak bulunan derişimler grafiğe geçirilmiş ve oluşan eğrinin doğrusallığı incelenmiştir.

### 3.9.4. Doğruluk

Doğruluk, gün içi ve günler arası çalışmalar yapılarak belirlenmiştir. Gün içi çalışmalar, aynı gün içinde üç farklı derişimde (1, 5 ve 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) hazırlanan standart maddelerin analizlerinden elde edilen cevaplara ait % bağıl hata (BH) değerleri (n = 6), günler arası çalışmalar ise, üç farklı derişimde (1, 5 ve 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) hazırlanan standart maddelerin art arda 6 gün yapılan analizlerinden elde edilen cevaplara ait % bağıl hata (BH) değerleri (n=6), hesaplanması ile gösterilmiştir (Ek 2).

### 3.9.5. Kesinlik

Yöntemin kesinliği, gün içi ve günler arası çalışmalarla değerlendirilmiştir. Gün içi çalışmalarda, doğrusallık aralığında bulunan 3 farklı derişim (1, 5 ve 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) seviyesinde 6 seri çözeltiler hazırlanmış ve bu çözeltiler aynı gün içinde analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalar ise, doğrusallık aralığında bulunan 3 farklı derişim (1, 5 ve 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) seviyesinde hazırlanan 6 seri çözeltilerin 6 farklı günde analiz

edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Kesinlik sonuçları bağıl standart sapma (BSS) değerlerinin hesaplanması ile belirtilmiştir (Ek 2).

Sonuçlar pik alan oranlarının kalibrasyon doğrusu denkleminde hesaplanan derişim değerlerinin BSS'leri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

Enjeksiyon (cihaz) tekrarlanabilirliğini ölçmek için, doğrusal aralıktaki 1 µg mL<sup>-1</sup> standart karışım çözeltisi ve 1 µg mL<sup>-1</sup> İS içeren çözeltinin on tekrarlı enjeksiyonu yapılmış ve sistem uygunluk parametreleri değerlendirilmiştir.

### 3.9.6. Duyarlılık (Gözlenebilme ve Alt Tayin Sınırı)

Yöntemin duyarlılığı gözlenebilme sınırının (LOD) ve alt tayin sınırının (LOQ) saptanmasıyla değerlendirilmiştir. LOD, sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğunda ve LOQ, sinyal/gürültü (S/G) oranı 10 olduğunda belirlenebilen en küçük derişim olarak belirlenmiştir.

### 3.9.7. Sağlamlık ve Tutarlılık

Türevlendirici miktarı (58 – 60 µL), türevlendirme sıcaklığı (58 – 62°C) ve süresi (23 – 27 dk), fırın başlangıç sıcaklığı (58 – 62°C), akış hızı (2,6 – 2,8 µL) için optimum deney cihaz koşullarında küçük değişiklikler yapılarak, yöntemin sağlamlığı incelenmiştir. 1 µg mL<sup>-1</sup> derişimde standart karışım çözeltisi analiz edilmiştir. Bu değişikliklerin etkisi optimum deney koşullarında yapılan analizlerle karşılaştırılarak t-testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Tutarlılık, farklı analizci etkisi incelenerek değerlendirilmiştir. Analizci A ve analizci B olmak üzere iki farklı analizci tarafından aynı anda hazırlanan 1 µg mL<sup>-1</sup> derişimde metabolit içeren standart çözelti aynı optimum deney koşullarında analiz edilerek Mann-Whitney U Testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### 3.10. Geri Kazanım

Geri kazanım çalışmalarında, her bir standart için doğrusallık aralığına giren yedi farklı derişimdeki (0, 1, 2, 3, 5, 8, 10 µg mL<sup>-1</sup>) numuneler, plazmaya standart ekleme yapılarak Tablo 3.1' de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır.

**Tablo 3.1.** Geri kazanım için numune hazırlama

| Boş plazma (µL) | Çalışma standartından (10 µg mL <sup>-1</sup> ) eklenen miktar (µL) | Su (µL) | İç standart (µL) | Asetonitril (µL) | Son metabolit derişimi (µg mL <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|---|---------|------------------|------------------|---|
| 100             | 0   | 100     | 10               | 790              | 0   |
| 100             | 1   | 99      | 10               | 790              | 1   |
| 100             | 2   | 98      | 10               | 790              | 2   |
| 100             | 3   | 97      | 10               | 790              | 3   |
| 100             | 5   | 95      | 10               | 790              | 5   |
| 100             | 8   | 92      | 10               | 790              | 8   |
| 100             | 10  | 90      | 10               | 790              | 10  |

Hazırlanan numuneler 15000 dev dk<sup>-1</sup>'de 10 dk sanrifüjlendikten sonra 750 µL santrifüगत alınmış ve 25°C'de 5 saat uçurulmuştur. Uçurulan numuneler optimize edilen türevlendirme şartlarında türevlendirildikten sonra optimize edilmiş kromatografik şartlarda analiz edilmiştir.

Her metabolit için eklenen standart metabolit derişimine karşı metabolit alanının iç standart alanına oranının grafiğe geçirilmesiyle oluşan doğruların x eksenini kestiği noktadaki derişim değerleri, oluşan standart ekleme doğrusuna ait denklemde ( $y=ax+b$ ) y yerine 0 değeri konularak bulunmuştur (boş plazma içindeki metabolit miktarı). Daha sonra bilinen metabolit derişimleri aynı boş plazmaya eklenerek elde edilen çözeltilerin analizleri standart ekleme yöntemiyle yapılmış ve bulunan değerlerden boş plazmadan elde edilen metabolit değerleri çıkarılarak eklenen metabolit miktarları bulunmuştur. Çalışılan her derişime karşılık gelen geri kazanım değerleri bulunmuş ve her metabolit için ortalama geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (n=6).

### 3.11. Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması

Plazma numuneleri analiz edilmiş ve daha sonra üzerine 1, 2 ve 3 µg mL<sup>-1</sup> artan derişimde standart karışım çözeltileri eklenerek analizler tekrarlanmıştır. Plazma numunesindeki metabolit miktarları standart ekleme yöntemiyle bulunmuştur. Down Sendromu tanısı konmuş hasta ve sağlıklı gebelerden alınan 100 µL plazma üzerine, standart karışım çözeltilerinden (100 µg mL<sup>-1</sup>) sırasıyla 0, 10, 20 ve 30 µL hacimlerde

eklenmiş, 10 µL İS (100 µg mL<sup>-1</sup>) ve 790 µL asetonitril ilave edilmiştir. Toplam hacim 1 mL'ye su ile tamamlanmıştır. 1 dk vorteksledikten sonra vakumlu santrifüj ile 15000 dev dk<sup>-1</sup>'de 10 dk santrifüjlenmiştir. 750 µL supernatant alınarak kuruluğa kadar uçurulmuştur. 20 µL metoksiamin hidroklorür/piridin çözeltisi eklenerek, 30<sup>0</sup>C'de 90 dk ve daha sonra 60 µL MSTFA + %1TMCS eklenerek, 60<sup>0</sup>C'de 25 dk tutularak türevlendirme gerçekleştirilmiştir.

### 3.12. Kalite Kontrol Kartları

Kalite kontrol kartları (KKK), sistemin kalitesini izlemek için rutin analizlerde uygulanır. KKK, tek değişkenin takip edilmesi ile oluşturulmuş, analiz edilen kalite kontrol (QC) numunelerinin ortalama miktarlarının ve standart sapma (SS) değerlerinin hesaplanmasıyla düzenlenmiştir. Bu çalışmada, suya eklenmiş 1 µg mL<sup>-1</sup> derişimde standart karışım çözeltisi 20 gün boyunca her çalışma gününde ve çalışma öncesinde analiz edilmiş, analiz numarasına karşı derişim grafiğe geçirilerek kalite kontrol kartları oluşturulmuştur. Derişimlerin ortalama hedef değer, ortalama±2SS olduğunda uyarı, ortalama±3SS olduğunda ise kontrol sınırları saptanmıştır (94, 95). Kontrol kartlarında sistemin cevabı her bir QC için noktalar halinde sunulmuştur. Tüm QC cevaplarının ortalama değerleri çizgi kalınlaştırılarak belirginleştirilmiştir ve bu çizginin üzerinde ±2SS ve altında ±3SS çizgileri yer almıştır.

## 4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan yedi metabolitin analizi için yöntem optimize edildikten sonra valide edilmiş ve numunelere uygulanmıştır.

### 4.1. Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu

Türevlendirmede MSTFA + %1 TMCS, MTBSTFA + %1 TBDMSCI türevlendirme reaktif karışımları ile silil türevleri ve MBTFA türevlendirme reaktifi ile asetilimidazol türevleri oluşturulmuş ve optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Türevlendirme tepkimeleri farklı sıcaklıklarda (37, 50 ve 60 °C) ve farklı zaman dilimlerinde (10, 15, 20, 25, 30 dk) gerçekleştirilmiştir. Bu şartlar altında oluşan trimetilsilil türevleri içeren çözeltiler GC-MS cihazına enjekte edilmiş ve elde edilen pik alan değerleri değerlendirilmiştir.

MBTFA türevlendirme reaktifi kullanılarak tüm metabolitler için asetilimidazol türevinin oluşmaması nedeni ile analizlere MSTFA + %1 TMCS, MTBSTFA + %1 TBDMSCI türevlendirme reaktifleri kullanılarak sililleme tepkimesi üzerinden devam edilmiştir.

2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL standartlarının trimetilsilil türevlerinin (TMS) kütle spektrumunda seçilen iyon değerleri ve kromatografik ayırımında bulunan alıkonma zamanları Tablo 4.1’de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Metabolitlerin trimetilsilil türevlerine ait bilgiler (m/z) (n=10)

| Metabolit adı                  | Seçilen iyon (m/z) | Alıkonma zamanı* (dk) |
|--------------------------------|--------------------|-----------------------|
| <b>2-HB</b>                    | 131                | 7,46±0,02             |
| <b>3-HB</b>                    | 117                | 7,98±0,01             |
| <b><math>\beta</math>-HIVA</b> | 131                | 8,72±0,01             |
| <b>URA</b>                     | 241                | 10,55±0,02            |
| <b>GLU</b>                     | 246                | 14,16±0,02            |
| <b>MAL</b>                     | 361                | 19,70±0,01            |
| <b>MEL</b>                     | 361                | 24,29±0,02            |
| <b>İS</b>                      | 312                | 16,18±0,01            |

\* Alıkonma zamanı: Ortalama alıkonma zamanı ± Standart hata



Elde edilen pik şekilleri ve alan değerleri karşılaştırıldığında, en simetrik pikler ve en yüksek türevlendirme verimi MSTFA + %1 TMCS türevlendirme reaktifi kullanılarak, 60°C’de 25 dk türevlendirme şartlarında görülmüştür (Tablo 4.2). MSTFA + %1 TMCS türevlendirme reaktifi ile oluşan TMS türevleri Şekil 4.1’de, oluşan türevlerin kütle spektrumlarının parçalanma ürünleri ise Tablo 4.3.’de gösterilmiştir.

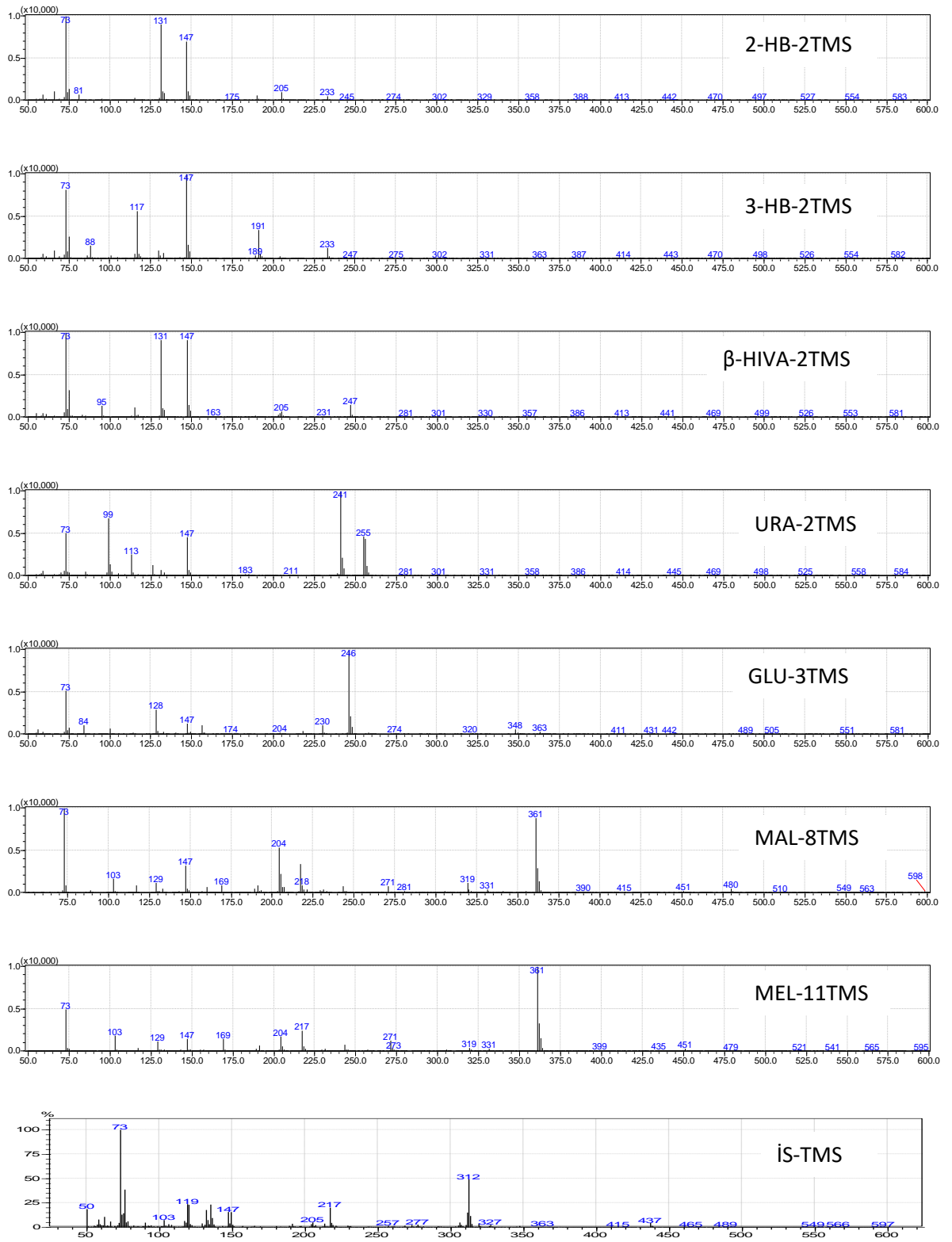
**Tablo 4.2.** MSTFA + %1 TMCS ile silil türevi oluşturulmasında türev sıcaklığı ve süresinin optimizasyonu\*

|      | Süre (dk) | 2-HB | 3-HB | $\beta$ -HIVA | URA | GLU | MAL | MEL |
|------|-----------|------|------|---------------|-----|-----|-----|-----|
| 37°C | 10        | 1,1  | 1,3  | 1,7           | 1,8 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
|      | 15        | 1,3  | 1,5  | 1,5           | 1,6 | 2,0 | 1,8 | 1,6 |
|      | 20        | 1,4  | 1,6  | 1,3           | 1,3 | 1,8 | 1,5 | 1,4 |
|      | 25        | 1,6  | 1,5  | 1,1           | 1,2 | 1,6 | 1,3 | 1,3 |
|      | 30        | 1    | 1,4  | 1             | 1,2 | 1,5 | 1,4 | 1,2 |

|      | Süre (dk) | 2-HB | 3-HB | $\beta$ -HIVA | URA | GLU | MAL | MEL |
|------|-----------|------|------|---------------|-----|-----|-----|-----|
| 50°C | 10        | 1,4  | 2,0  | 1,8           | 2,0 | 2,1 | 2,1 | 2,1 |
|      | 15        | 1,5  | 1,9  | 1,7           | 1,8 | 2,1 | 1,6 | 2,1 |
|      | 20        | 1    | 1,5  | 1,5           | 1,5 | 1   | 1,3 | 1   |
|      | 25        | 1,3  | 1,5  | 1,4           | 1,3 | 1,8 | 1,4 | 2,0 |
|      | 30        | 1,3  | 1,4  | 1,2           | 1,1 | 1,7 | 1,3 | 1,8 |

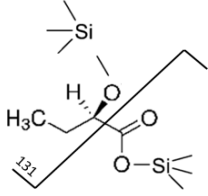
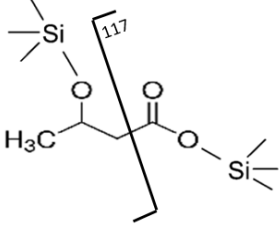
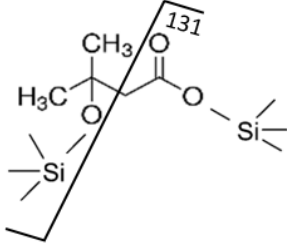
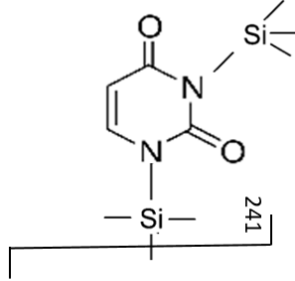
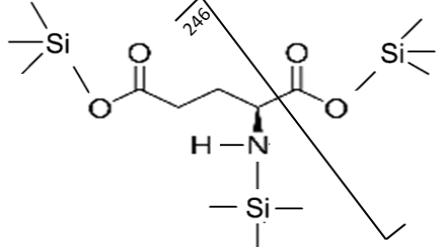
|      | Süre (dk) | 2-HB | 3-HB | $\beta$ -HIVA | URA | GLU | MAL | MEL |
|------|-----------|------|------|---------------|-----|-----|-----|-----|
| 60°C | 10        | 1,8  | 2,0  | 2,1           | 1,5 | 1,9 | 1   | 1,8 |
|      | 15        | 1,6  | 1,8  | 2,0           | 1,6 | 1,7 | 1,6 | 1,6 |
|      | 20        | 1,4  | 1,4  | 1,8           | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,6 |
|      | 25        | 1    | 1    | 1             | 1   | 1   | 1   | 1   |
|      | 30        | 1,2  | 1,1  | 1,2           | 1   | 1,2 | 1,1 | 1   |

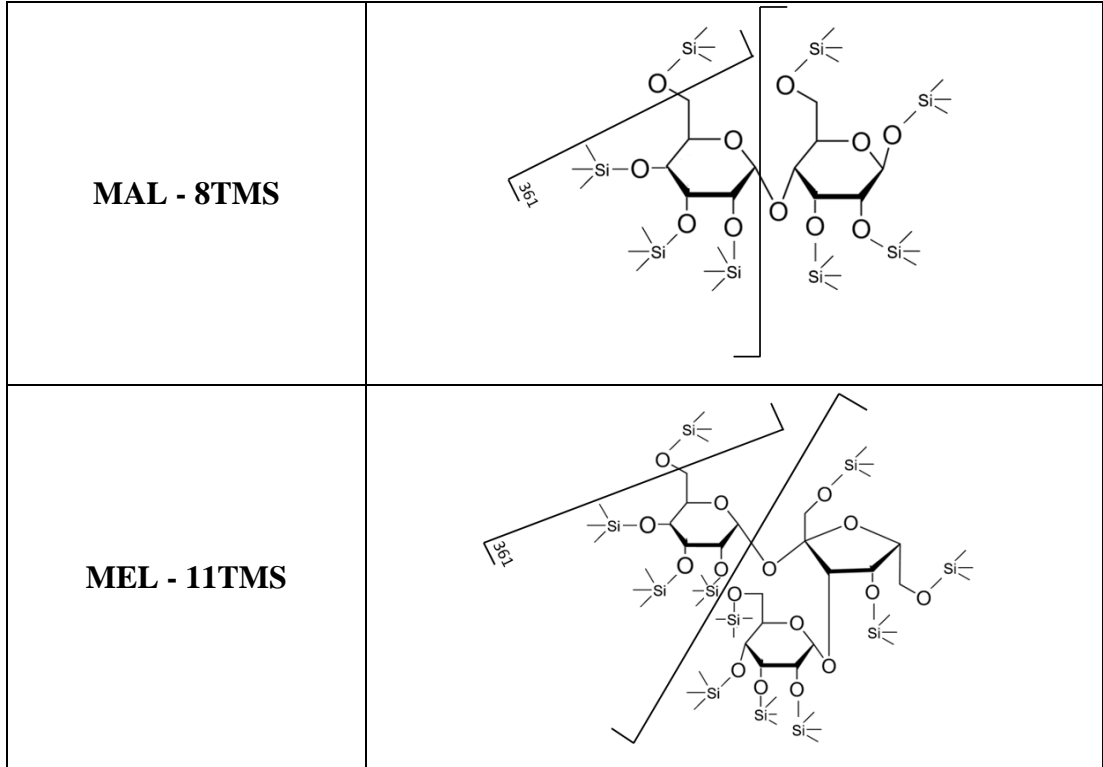
\* Değerler pik asimetri oranı olarak verilmiştir.



Şekil 4.1. Metabolitler ve iç standardın trimetilsilil türevlerine ait kütle spektrumları

**Tablo 4.3.** Metabolitlerin trimetilsilil türevlerine ait seçilen parçalanma ürünleri

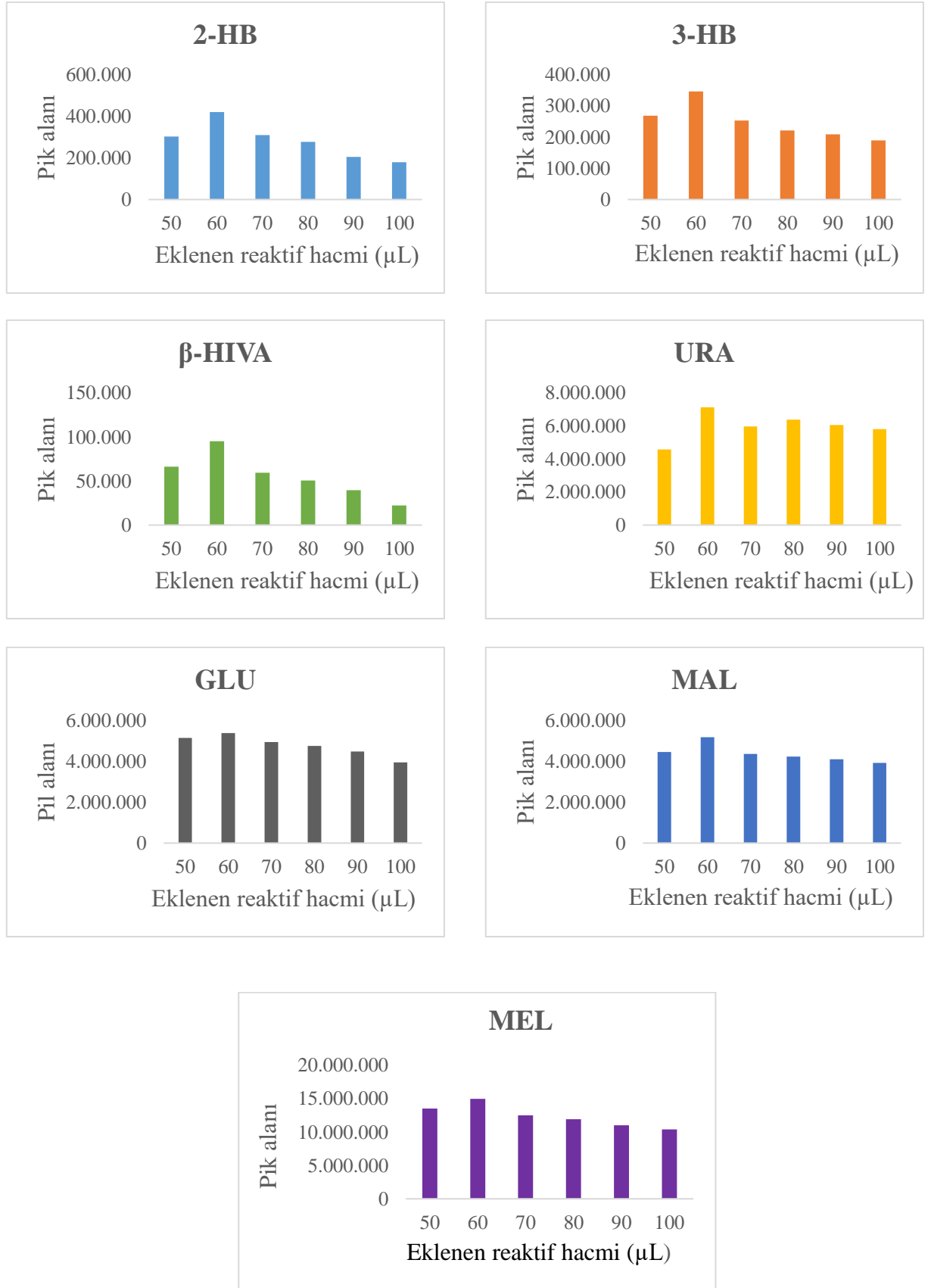
| Trimetil silil türevi | Seçilen parçalanma ürününün yapısı   |
|-----------------------|--|
| 2-HB - 2TMS           |    |
| 3-HB - 2TMS           |    |
| β-HIVA - 2TMS         |   |
| URA - 2TMS            |  |
| GLU - 3TMS            |  |



### Türevlendirme Reaktifi Miktarının Etkisi

Türevlendirme reaktifinin miktarının yeterli olup olmadığını belirlemek için MSTFA + %1 TMCS farklı miktarlarda (50, 60, 70, 80, 90 ve 100  $\mu$ L) ilave edilerek bir seri analiz yapılmıştır (Şekil 4.2).

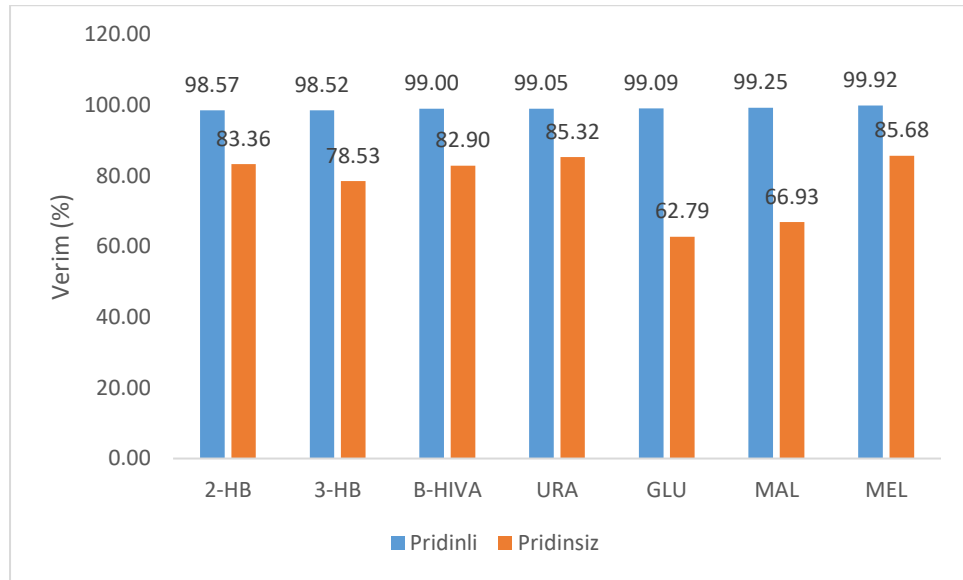
Pik alan değerlerinin, 60  $\mu$ L MSTFA + %1 TMCS kullanıldığında maksimum olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. MSTFA + %1 TMCS miktarının pik alanına etkisi

### Metoksiaminasyonun Etkisi

Türevlendime tepkimesine piridin katalizörü varlığında metoksiamin hidroklorür çözeltisinin etkisini belirlemek için piridinli metoksiamin hidroklorür çözeltisi ilave edildikten sonra ve ilave edilmeden türevlendirilmiş çözeltiler için bir seri analiz yapılmıştır. Piridin varlığında metoksiamin hidroklorür çözeltisi eklenerek hazırlanan çözeltilerin verimlerinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Piridinli metoksiaminasyonun etkisi

Elde edilen bu verilerin değerlendirilmesi sonucunda 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL'in GC-MS ile analizlerinde türevlendirme işleminin piridin katalizörü varlığında 20  $\mu$ L metoksiamin hidroklorür eklenip 30°C'de 90 dk bekletilmesinden sonra 60  $\mu$ L MSTFA + %1 TMCS ilave edilip 60°C'de 25 dk bekletilerek yapılmasına karar verilmiştir.

### 4.2. Kromatografik Yöntem Koşullarının Optimizasyonu

Kromatografik analizlerde %5 difenil %95 dimetilpolisiloksan (30 m  $\times$  0,25 mm i.ç., 0,25  $\mu$ m) kılcal kolon kullanılmıştır. 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL'in GC-MS ile analizinde en uygun sıcaklık programını belirlemek için farklı koşullarda çalışmalar yapılmıştır (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4.** Fırın sıcaklık programlarının koşulları

|                | Fırının baş.<br>sıcaklığı<br>(°C) | Bekleme<br>süresi<br>(dk) | Sıcaklık<br>artış oranı<br>(°C dk <sup>-1</sup> ) | Fırının son<br>sıcaklığı<br>(°C) | Bekleme<br>süresi<br>(dk) | Analiz<br>süresi<br>(dk) |
|----------------|-----------------------------------|---------------------------|---|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>Koşul 1</b> | 60                                | 1                         | 10  | 325                              | 10                        | 37,5                     |
| <b>Koşul 2</b> | 60                                | 1                         | 5<br>20   | 100<br>325                       | 5                         | 32,3                     |
| <b>Koşul 3</b> | 60                                | 1                         | 5<br>10<br>60                                     | 100<br>150<br>330                | 1                         | 18,0                     |
| <b>Koşul 4</b> | 60                                | 1                         | 10<br>60  | 120<br>300                       | 1                         | 11,0                     |
| <b>Koşul 5</b> | 60                                | 1                         | 10<br>5<br>10<br>1<br>30                          | 100<br>120<br>190<br>195<br>315  | 1                         | 26,0                     |
| <b>Koşul 6</b> | 60                                | 1                         | 10<br>30  | 200<br>320                       | 1                         | 20,0                     |
| <b>Koşul 7</b> | 60                                | 1                         | 10<br>30  | 200<br>320                       | 2                         | 21,0                     |
| <b>Koşul 8</b> | 60                                | 1                         | 10<br>30  | 200<br>320                       | 6                         | 25,0                     |

Denenen her koşul için sistem uygunluk parametrelerinden  $k'$ ,  $R_s$  ve PAO hesaplanmıştır (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** Farklı fırın sıcaklık programlarında sistem uygunluk parametreleri

| Koşul no | Sistem uygunluk parametresi | 2-HB | 3-HB | $\beta$ -HIVA | URA  | GLU   | MAL   | MEL   |
|----------|-----------------------------|------|------|---------------|------|-------|-------|-------|
| 1        | k'                          | 3,66 | 3,97 | 4,28          | 5,53 | 7,70  | 11,43 | 13,92 |
|          | R <sub>S</sub> *            | 2,00 | 4,00 | 4,00          | 7,00 | 12,00 | 12,00 | 4,00  |
|          | PAO                         | 1,0  | 1,1  | 1,0           | 1,4  | 1,2   | 1,0   | 1,1   |
| 2        | k'                          | 5,37 | 5,53 | 5,68          | 6,30 | 7,39  | 9,25  | 10,50 |
|          | R <sub>S</sub> *            | 1,00 | 2,50 | 2,00          | 3,50 | 6,00  | 4,00  | 15,00 |
|          | PAO                         | 1,2  | 1,0  | 1,4           | 1,3  | 1,1   | 1,2   | 1,0   |
| 3        | k'                          | 6,15 | 6,46 | 6,77          | 7,76 | 8,14  | 8,76  | 9,13  |
|          | R <sub>S</sub> *            | 2,00 | 4,20 | 3,20          | 1,20 | 2,00  | 1,20  | 19,40 |
|          | PAO                         | 1,2  | 1,1  | 1,0           | 1,0  | 1,3   | 1,2   | 1,1   |
| 4        | k'                          | 3,66 | 3,97 | 4,28          | 5,53 | 7,70  | 11,43 | 13,92 |
|          | R <sub>S</sub> *            | 2,00 | 5,00 | 4,00          | 7,00 | 12,00 | 8,00  | 4,00  |
|          | PAO                         | 1,0  | 1,2  | 1,1           | 1,3  | 1,0   | 1,0   | 1,1   |
| 5        | k'                          | 4,90 | 5,22 | 5,53          | 6,77 | 8,94  | 13,17 | 14,04 |
|          | R <sub>S</sub> *            | 2,00 | 5,00 | 4,00          | 7,00 | 13,60 | 2,80  | 3,60  |
|          | PAO                         | 1,2  | 1,0  | 1,5           | 1,0  | 1,3   | 1,2   | 1,1   |
| 6        | k'                          | 3,66 | 3,97 | 4,28          | 5,53 | 7,70  | 9,38  | 10,19 |
|          | R <sub>S</sub> *            | 2,00 | 5,00 | 4,00          | 7,00 | 5,40  | 2,60  | 16,00 |
|          | PAO                         | 1,0  | 1,3  | 1,2           | 1,1  | 1,2   | 1,4   | 1,0   |
| 7        | k'                          | 3,66 | 3,97 | 4,28          | 5,53 | 7,70  | 9,38  | 10,19 |
|          | R <sub>S</sub> *            | 2,00 | 5,00 | 4,00          | 7,00 | 5,40  | 2,60  | 16,00 |
|          | PAO                         | 1,1  | 1,0  | 1,0           | 1,1  | 1,2   | 1,0   | 1,2   |
| 8        | k'                          | 3,61 | 3,93 | 4,39          | 5,52 | 7,78  | 11,24 | 14,07 |
|          | R <sub>S</sub> *            | 7,04 | 2,54 | 5,14          | 3,63 | 7,25  | 11,13 | 9,1   |
|          | PAO                         | 1,0  | 1,0  | 1,0           | 1,0  | 1,0   | 1,0   | 1,0   |

\* Kendisinden bir sonra gelen pik ile komşu pik olarak değerlendirilmiştir.

Sistem uygunluk parametreleri değerlendirildiğinde en uygun fırın sıcaklık programının 60°C fırın başlangıç sıcaklığında 1 dakika bekletildikten sonra, dakikada 10°C artarak 200°C'ye ulaşan, daha sonra dakikada 30°C artarak 360°C'ye ulaşanve burda 6 dakika bekletilen Koşul 8 olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.4).

### 4.3. Protein Çöktürme Basamağının Optimizasyonu

Plazmadan metabolitlerin ayırımı için protein çöktürmesi uygulanmıştır. Protein çöktürmede uygun organik fazın seçilebilmesi için farklı çözücü veya çözücü karışımları denenmiştir. Bunlar, metanol, metanol:su (1:1) (h:h), asetonitril, izopropil alkol:asetonitril (1:1) (h:h), izopropil alkol:asetonitril:su (3:3:2) (h:h:h)'dur.



Metanol ve metanol:su (1:1) (h:h) çözücü karışımı ile çok düşük % geri kazanım sonuçları elde edilmiş; asetonitril içeren çözücü sistemleri ile elde edilen % geri kazanım değerleri Tablo 4.6' da verilmiştir.

**Tablo 4.6.** Asetonitril içeren çözücü sistemleri\* ile elde edilen geri kazanım değerleri (%)

|   | 2-HB   | 3-HB   | $\beta$ -HIVA | URA   | GLU    | MAL   | MEL    |
|---|--------|--------|---------------|-------|--------|-------|--------|
| 1 | 100,31 | 102,73 | 103.73        | 92,94 | 124.97 | 96,79 | 101,51 |
| 2 | 98,86  | 98,46  | 96.54         | 89,70 | 70.25  | 94,88 | 99,24  |
| 3 | 90,63  | 95,50  | 92.45         | 80,24 | 50,30  | 93.42 | 89,46  |

\*1:Asetonitril, 2:İzopropil alkol:asetonitril (1:1), 3:İzopropil alkol:asetonitril:su (3:3:2)

En yüksek geri kazanım değerlerinin elde edildiği asetonitril ile protein çöktürmesi yapılmıştır.

#### 4.4. Sistem Uygunluk Çalışması

2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL için USP tanımlamalarına göre elde edilen sistem uygunluk testine ilişkin bulgular Tablo 4.7' de verilmiştir.

**Tablo 4.7.** Sistem uygunluk testi bulguları

| Parametre Metabolit | t <sub>R</sub> (dak)* | k'*** | R <sub>s</sub> *** | N       | PAO |
|---------------------|-----------------------|-------|--------------------|---------|-----|
| 2-HB                | 0,73                  | 3,61  | 2,54               | 351412  | 1   |
| 3-HB                | 0,69                  | 3,93  | 5,14               | 402057  | 1   |
| $\beta$ -HIVA       | 0,43                  | 4,39  | 3,63               | 482080  | 1   |
| URA                 | 0,37                  | 5,52  | 7,25               | 705197  | 1   |
| GLU                 | 0,90                  | 7,78  | 11,13              | 1276719 | 1   |
| MAL                 | 0,95                  | 11,24 | 9,10               | 2481255 | 1   |
| MEL                 | 0,91                  | 14,07 | 3,52               | 3761117 | 1   |
| İS                  | 0,55                  | 9,05  | 7,04               | 1673401 | 1   |

\*Alıkonma zamanlarının BSS değeri verilmiştir (n=10), \*\*Ölü hacim, aynı koşullarda asetonitril enjeksiyonu yapılarak bulunmuştur ( t<sub>0</sub> = 1.609 dk) \*\*\* Kendisinden bir sonra gelen pik ile komşu pik olarak değerlendirilmiştir.

#### 4.5. Yöntem Validasyonu

Türevlendirme basamağı, kromatografik yöntem ve protein çöktürmesi şartları optimize edildikten sonra yöntemin validasyon çalışmaları Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu (US FDA)'nun biyoanalitik uygulamalar prosedürüne göre yapılmıştır (92).

Çalışmada miristik asit-d27 iç standart olarak kullanılmıştır.

#### Kararlılık

2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, Urasil, GLU, MAL ve MEL maddelerinin kararlılıkları hazırlanan 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  metabolit stok çözeltilerinin buzdolabında (+4°C) bir hafta, 1 ve 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişimdeki metabolit standart karışım çözeltilerinin derin dondurucuda (-20°C) 1 ay, oda sıcaklığında 6, 12, 24 saat, standart çözeltilerinin oto örnekleyicide 24 saat bekletildiğinde (n = 3) ve numunelerin 3 donma-erime döngüsü sonunda kalan analit miktarları ve yüzde değişim oranları hesaplanmıştır (Tablo 4.8-4.9).

Plazmaya eklenen 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, Urasil, GLU, MAL ve MEL maddelerinin kararlılıkları 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  standart karışım çözeltisi eklenmiş plazma numunelerinin buzdolabında (+4°C) bir hafta, derin dondurucuda (-20°C) 1 ay, oda sıcaklığında 6, 12, 24 saat, plazma numune çözeltilerinin oto örnekleyicide 24 saat bekletildiğinde ve numunelerin 3 donma-erime döngüsü sonunda kalan analit miktarları ve yüzde değişim oranları hesaplanmıştır (Tablo 4.10).

**Tablo 4.8.** 1 µg mL<sup>-1</sup> standart karışım çözeltisi için kararlılık testi sonuçları (n = 3)

|                                   | Süre    | 2-HB                                  |                  | 3-HB                                  |                  | β-HIVA                                |                  | URA                                   |                  | GLU                                   |                  | MAL                                   |                  | MEL                                   |                  |
|-----------------------------------|---------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|
|                                   |         | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) |
| <b>Kısa dönem (Oda sıcaklığı)</b> | 0 saat  | 1,00                                  | 100,13           | 1,00                                  | 99,64            | 1,00                                  | 99,57            | 1,01                                  | 100,72           | 1,00                                  | 100,13           | 1,00                                  | 100,45           | 1,00                                  | 100,38           |
|                                   | 6 saat  | 0,98                                  | 97,66            | 0,99                                  | 99,45            | 0,99                                  | 99,40            | 1,00                                  | 100,20           | 1,01                                  | 101,23           | 0,99                                  | 99,19            | 0,99                                  | 98,52            |
|                                   | 12 saat | 0,99                                  | 98,64            | 0,99                                  | 98,80            | 0,98                                  | 97,75            | 0,99                                  | 98,96            | 0,98                                  | 97,57            | 0,99                                  | 98,70            | 0,99                                  | 98,74            |
|                                   | 24 saat | 0,98                                  | 97,59            | 0,98                                  | 98,05            | 0,97                                  | 97,38            | 0,98                                  | 98,13            | 0,99                                  | 99,29            | 0,98                                  | 98,31            | 0,98                                  | 97,93            |
| <b>Uzun dönem (-20 °C)</b>        | 1 ay    | 0,98                                  | 97,50            | 0,99                                  | 98,97            | 0,98                                  | 98,07            | 1,00                                  | 99,81            | 0,88                                  | 87,53            | 1,00                                  | 99,81            | 1,00                                  | 99,51            |
| <b>Oto örnekleyici</b>            | 24 saat | 0,99                                  | 98,57            | 0,98                                  | 97,84            | 0,99                                  | 98,71            | 0,99                                  | 98,89            | 0,99                                  | 99,02            | 1,00                                  | 99,79            | 0,99                                  | 99,13            |
| <b>Donma erime döngüsü</b>        | 1       | 1,01                                  | 100,84           | 0,99                                  | 98,64            | 0,99                                  | 99,07            | 1,00                                  | 99,81            | 1,01                                  | 100,86           | 1,00                                  | 99,81            | 1,00                                  | 99,51            |
|                                   | 2       | 0,99                                  | 99,07            | 0,98                                  | 97,73            | 0,98                                  | 98,37            | 1,00                                  | 99,69            | 1,00                                  | 99,52            | 0,99                                  | 99,10            | 1,02                                  | 102,35           |
|                                   | 3       | 0,97                                  | 97,50            | 0,97                                  | 97,16            | 0,98                                  | 97,99            | 0,99                                  | 98,80            | 0,99                                  | 99,06            | 0,99                                  | 98,89            | 1,00                                  | 100,19           |

**Tablo 4.9.** 10 µg mL<sup>-1</sup> standart karışım çözeltisi için kararlılık testi sonuçları (n = 3)

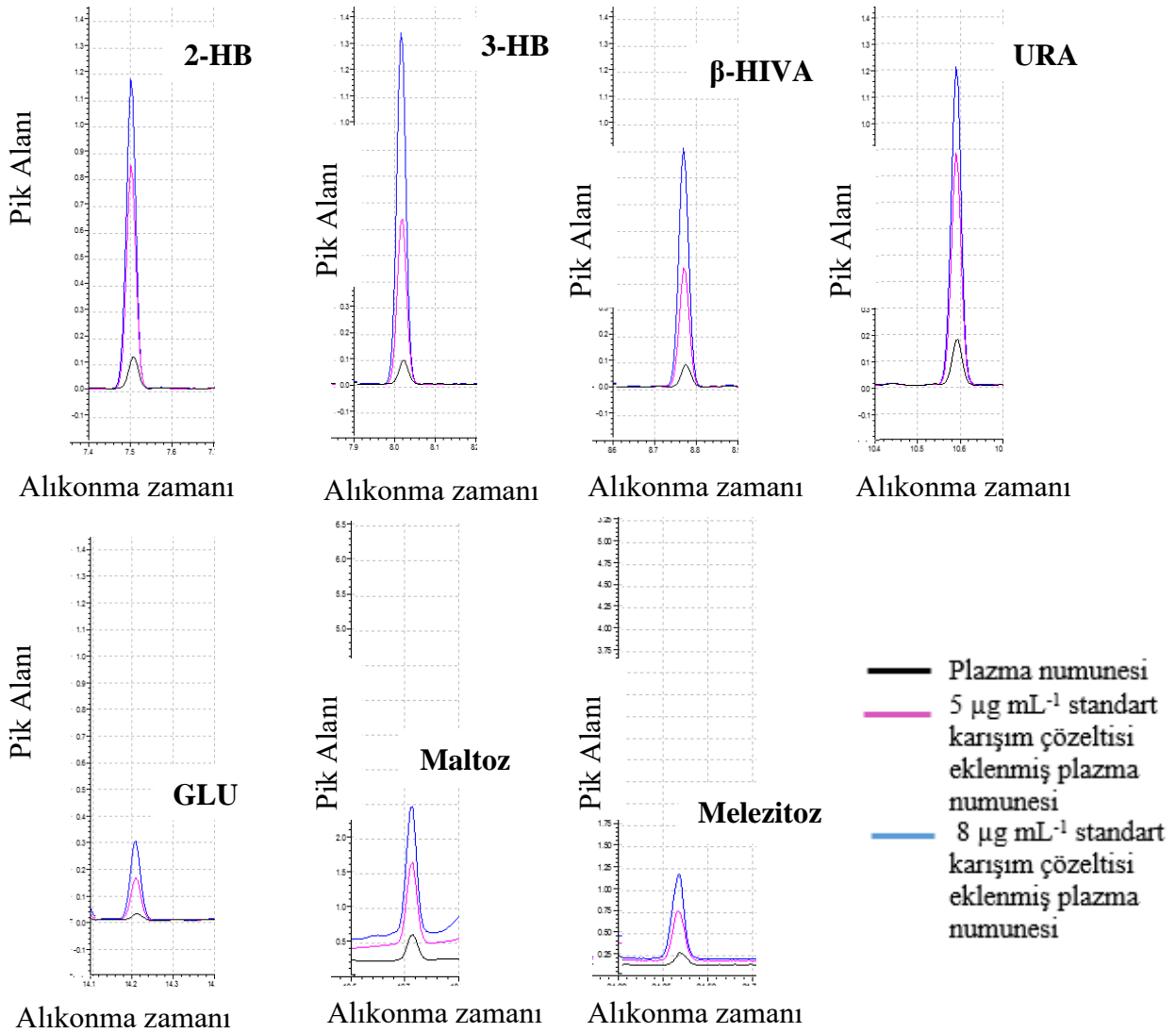
|                                   | Süre    | 2-HB                                  |                  | 3-HB                                  |                  | β-HIVA                                |                  | URA                                   |                  | GLU                                   |                  | MAL                                   |                  | MEL                                   |                  |
|-----------------------------------|---------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|
|                                   |         | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) |
| <b>Kısa dönem (Oda sıcaklığı)</b> | 0 saat  | 10,00                                 | 100,01           | 10,00                                 | 99,96            | 10,00                                 | 99,96            | 10,01                                 | 100,07           | 10,00                                 | 100,01           | 10,00                                 | 100,05           | 10,00                                 | 100,04           |
|                                   | 6 saat  | 9,98                                  | 99,77            | 9,99                                  | 99,94            | 9,99                                  | 99,94            | 10,00                                 | 100,02           | 10,01                                 | 100,12           | 9,99                                  | 99,92            | 9,99                                  | 99,85            |
|                                   | 12 saat | 9,99                                  | 99,86            | 9,99                                  | 99,88            | 9,98                                  | 99,77            | 9,99                                  | 99,90            | 9,98                                  | 99,76            | 9,99                                  | 99,87            | 9,99                                  | 99,87            |
|                                   | 24 saat | 9,98                                  | 99,76            | 9,98                                  | 99,80            | 9,97                                  | 99,74            | 9,98                                  | 99,81            | 9,99                                  | 99,93            | 9,98                                  | 99,83            | 9,98                                  | 99,79            |
| <b>Uzun dönem (-20 °C)</b>        | 1 ay    | 9,98                                  | 99,75            | 9,99                                  | 99,90            | 9,98                                  | 99,81            | 10,00                                 | 99,98            | 9,88                                  | 98,75            | 10,00                                 | 99,98            | 10,00                                 | 99,95            |
| <b>Oto örnekleyici</b>            | 24 saat | 9,99                                  | 99,86            | 9,98                                  | 99,78            | 9,99                                  | 99,87            | 9,99                                  | 99,89            | 9,99                                  | 99,90            | 10,00                                 | 99,98            | 9,99                                  | 99,91            |
| <b>Donma erime döngüsü</b>        | 1       | 10,01                                 | 100,08           | 9,99                                  | 99,86            | 9,99                                  | 99,91            | 10,00                                 | 99,98            | 10,01                                 | 100,09           | 10,00                                 | 99,98            | 10,00                                 | 99,95            |
|                                   | 2       | 9,99                                  | 99,91            | 9,98                                  | 99,77            | 9,98                                  | 99,84            | 10,00                                 | 99,97            | 10,00                                 | 99,95            | 9,99                                  | 99,91            | 10,02                                 | 100,23           |
|                                   | 3       | 9,97                                  | 99,75            | 9,97                                  | 99,72            | 9,98                                  | 99,80            | 9,99                                  | 99,88            | 9,99                                  | 99,91            | 9,99                                  | 99,89            | 10,00                                 | 100,02           |

**Tablo 4.10.** 10 µg mL<sup>-1</sup> plazma çözeltisi için kararlılık testi sonuçları (n = 3)

| Süre                              | 2-HB                                  |                  | 3-HB                                  |                  | β-HIVA                                |                  | URA                                   |                  | GLU                                   |                  | MAL                                   |                  | MEL                                   |                  |        |
|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|--------|
|                                   | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) | Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | Geri kazanım (%) |        |
| <b>Kısa dönem (Oda sıcaklığı)</b> | 0 saat                                | 10.00            | 100.01                                | 10.00            | 100.04                                | 10.00            | 99.98                                 | 10.00            | 100.03                                | 10.00            | 100.00                                | 10.00            | 100.04                                | 10.00            | 100.04 |
|                                   | 6 saat                                | 9.97             | 99.71                                 | 9.99             | 99.88                                 | 10.00            | 99.97                                 | 10.00            | 99.96                                 | 10.01            | 100.12                                | 9.99             | 99.91                                 | 9.99             | 99.87  |
|                                   | 12 saat                               | 9.98             | 99.83                                 | 9.98             | 99.82                                 | 9.98             | 99.76                                 | 9.98             | 99.84                                 | 9.99             | 99.93                                 | 9.98             | 99.84                                 | 9.99             | 99.87  |
|                                   | 24 saat                               | 9.99             | 99.93                                 | 9.97             | 99.74                                 | 9.97             | 99.74                                 | 9.98             | 99.84                                 | 9.99             | 99.91                                 | 9.98             | 99.83                                 | 9.98             | 99.83  |
|                                   | 1 ay                                  | 10.00            | 99.95                                 | 9.99             | 99.94                                 | 9.98             | 99.84                                 | 10.00            | 100.01                                | 10.01            | 100.09                                | 10.00            | 100.01                                | 10.00            | 99.98  |
| <b>Oto örnekleyici</b>            | 24 saat                               | 9.97             | 99.74                                 | 9.97             | 99.75                                 | 9.98             | 99.84                                 | 9.98             | 99.75                                 | 9.99             | 99.91                                 | 10.00            | 100.03                                | 9.99             | 99.93  |
| <b>Donma erime döngüsü</b>        | 1                                     | 9.99             | 99.95                                 | 9.99             | 99.86                                 | 9.99             | 99.91                                 | 10.00            | 99.97                                 | 10.01            | 100.05                                | 10.00            | 100.04                                | 10.00            | 99.99  |
|                                   | 2                                     | 9.99             | 99.91                                 | 9.98             | 99.77                                 | 9.98             | 99.81                                 | 9.99             | 99.94                                 | 10.00            | 99.97                                 | 9.99             | 99.94                                 | 10.00            | 99.96  |
|                                   | 3                                     | 9.98             | 99.81                                 | 9.97             | 99.74                                 | 9.98             | 99.81                                 | 9.99             | 99.91                                 | 9.99             | 99.88                                 | 9.98             | 99.84                                 | 9.99             | 99.90  |

### Özgünlük (Seçicilik)

2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL çalışma standart çözeltilerinin artan derişimlerinde piklerin alıkonma zamanlarında değişim gözlenmemiş olması (Şekil 4.4) ve standart ekleme ile yapılan numune analizlerinde aynı durumun geçerli olması yanısıra metabolitlerin trimetilsilil türevlerine için belirlenen m/z değerlerinin analiz sonucu çıkan kromatogramlara ait GC-MS kütüphanesindeki değerler ile eşleşmiş olması yöntemin seçiciliği konusunda yeterli bilgi sağlamıştır.



Şekil 4.4. GC-MS yöntemi ile analiz edilen plazma numunelerine ait kromatogramlar

### **Doğrusallık**

Kalibrasyon eğrilerinin, 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL için 0,5-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişim aralığında doğrusal olduğu bulunmuş (Şekil 4.5) ve yöntemin doğrusallığının kontrolü için kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıklarının kontrol grafikleri Şekil 4.6'de verilmiştir. Yedi metabolite ait kalibrasyon doğrularının ANOVA analiz sonuçları Tablo 4.11'de, aynı metabolitlerin doğrusallık kontrol grafikleri ile oluşan doğruların analiz sonuçları da Tablo 4.12'de gösterilmiştir.

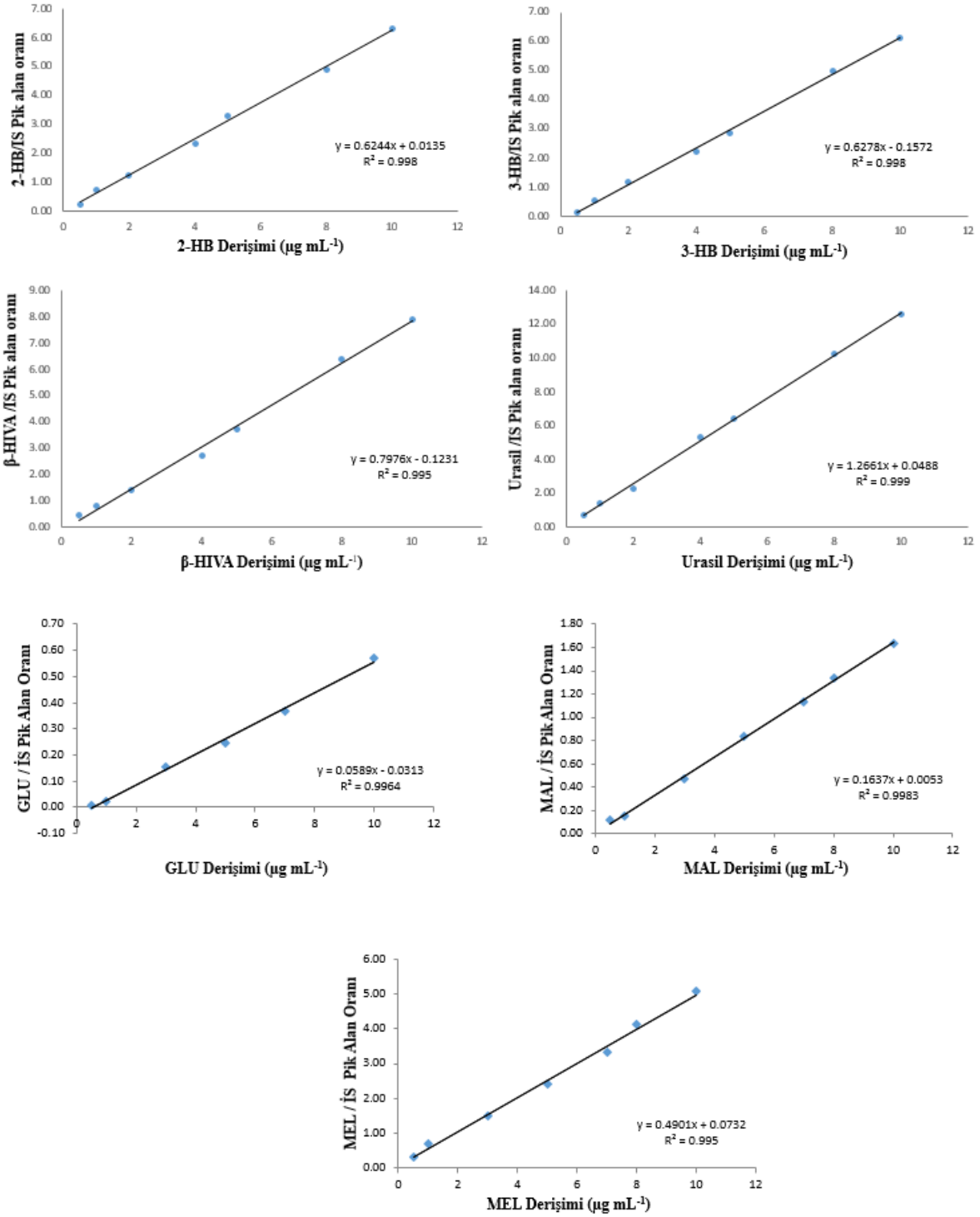
### **Doğruluk**

1, 5 ve 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  olmak üzere üç farklı derişimde altı farklı seride çalışma standartlarının analize ilişkin gün içi ve günler arası doğruluk çalışmalarından elde edilen veriler hazırlanan kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve BH değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.13 ve 4.14).

### **Kesinlik**

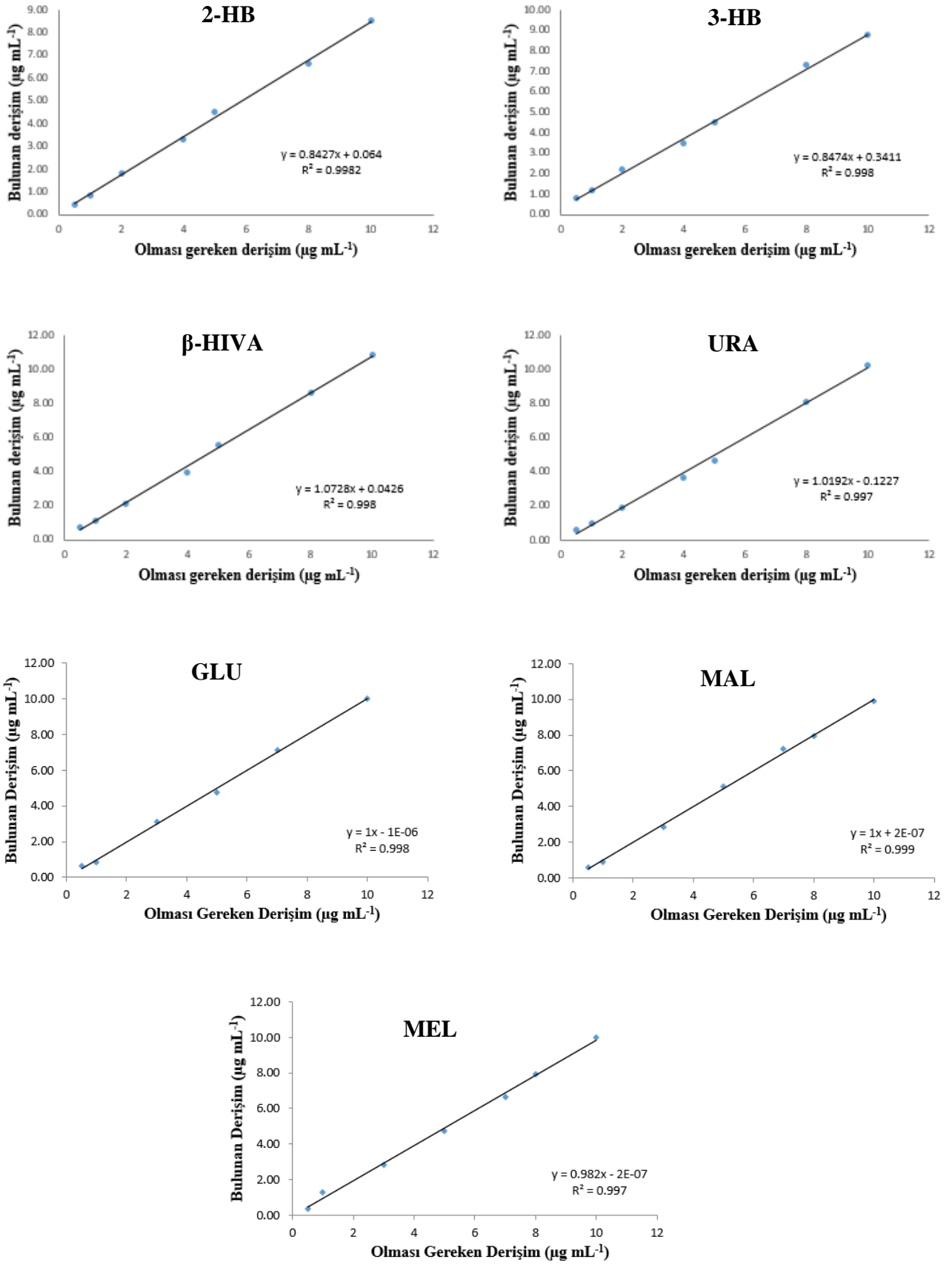
1, 5 ve 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  olmak üzere üç farklı derişimde altı farklı seride çalışma standartlarının analize ilişkin gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında elde edilen veriler hazırlanan kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.13 ve 4.14).

Enjeksiyon tekrarlanabilirliği için elde edilen veriler Tablo 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri





Şekil 4.6. Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile elde edilen doğrusallık kontrol grafikleri

**Tablo 4.11.** Metabolitlerin kalibrasyon doğrularının özellikleri

|                                | <b>a</b> | <b>b</b> | <b>p*</b> | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>F**</b> |
|--------------------------------|----------|----------|-----------|----------------------|------------|
| <b>2-HB</b>                    | 0,6739   | -0,1673  | 0,2134    | 0,998                | 2398,6     |
| <b>3-HB</b>                    | 0,7066   | - 0,4512 | 0,0924    | 0,992                | 748,6      |
| <b><math>\beta</math>-HIVA</b> | 0,8386   | - 0,2726 | 0,0869    | 0,998                | 3016,4     |
| <b>URA</b>                     | 1,2755   | - 0,273  | 0,2924    | 0,997                | 2217,9     |
| <b>GLU</b>                     | 0,0589   | - 0,0313 | 0,0329    | 0,996                | 1115,2     |
| <b>MAL</b>                     | 0,1637   | + 0,0053 | 0,7794    | 0,998                | 2934,8     |
| <b>MEL</b>                     | 0,4901   | + 0,0732 | 0,4660    | 0,995                | 989,0      |

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

**Tablo 4.12.** Metabolitlerin doğrusallık kontrol grafiklerine ilişkin özellikler

|                                | <b>A</b> | <b>B</b> | <b>p*</b> | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>F**</b> |
|--------------------------------|----------|----------|-----------|----------------------|------------|
| <b>2-HB</b>                    | 0,8693   | 0,000    | 1,0000    | 0,998                | 2733,2     |
| <b>3-HB</b>                    | 0,9096   | 0,117    | 0,6128    | 0,995                | 1310,9     |
| <b><math>\beta</math>-HIVA</b> | 1,0825   | -0,004   | 0,9671    | 0,999                | 8478,9     |
| <b>URA</b>                     | 0,9889   | -0,012   | 0,9247    | 0,999                | 4829,2     |
| <b>GLU</b>                     | 1,0000   | 0,000    | 1,0000    | 0,998                | 2071,8     |
| <b>MAL</b>                     | 1,0000   | 0,000    | 1,0000    | 0,999                | 3333,8     |
| <b>MEL</b>                     | 0,9820   | 0,000    | 1,0000    | 0,997                | 1437,5     |

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

**Tablo 4.13.** Gün içi kesinlik ve doğruluk verileri (n= 6)

| Derişim                                   |   | 2-HB            | 3-HB            | $\beta$ -HIVA   | URA             | GLU             | MAL             | MEL             |
|---|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>1 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> | Veri aralığı<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | 0,99-1,03       | 0,99-1,03       | 0,97-1,03       | 0,99-1,03       | 0,97-1,03       | 0,98-1,02       | 0,98-1,02       |
|   | $\bar{X}$                                 | 1,01 $\pm$ 0,01 | 1,01 $\pm$ 0,01 | 1,00 $\pm$ 0,01 | 1,01 $\pm$ 0,01 | 1,00 $\pm$ 0,01 | 1,00 $\pm$ 0,01 | 1,00 $\pm$ 0,01 |
|   | SS  | 0,01            | 0,02            | 0,02            | 0,02            | 0,02            | 0,01            | 0,01            |
|   | BSS (%)                                   | 1,30            | 1,52            | 2,07            | 1,73            | 2,31            | 1,35            | 1,36            |
|   | BH (%)                                    | -1,24           | -0,79           | -0,09           | -1,22           | -0,44           | -0,20           | -0,32           |
| <b>5 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> | Veri aralığı<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | 4,96-5,04       | 4,97-5,02       | 4,98-5,03       | 4,98-5,02       | 4,98-5,04       | 4,99-5,03       | 4,97-5,03       |
|   | $\bar{X}$                                 | 5,01 $\pm$ 0,01 | 4,99 $\pm$ 0,01 | 5,00 $\pm$ 0,01 | 5,00 $\pm$ 0,01 | 5,00 $\pm$ 0,01 | 5,01 $\pm$ 0,01 | 5,00 $\pm$ 0,01 |
|   | SS  | 0,03            | 0,02            | 0,02            | 0,02            | 0,02            | 0,01            | 0,02            |
|   | BSS (%)                                   | 0,58            | 0,36            | 0,33            | 0,36            | 0,44            | 0,30            | 0,40            |
|   | BH (%)                                    | -0,21           | 0,19            | 0,09            | 0,01            | -0,09           | -0,15           | -0,03           |
| <b>8 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> | Veri aralığı<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | 7,98-8,03       | 7,97-8,04       | 7,98-8,04       | 7,98-8,03       | 7,97-8,04       | 7,98-8,03       | 7,96-8,04       |
|   | $\bar{X}$                                 | 8,01 $\pm$ 0,01 | 8,01 $\pm$ 0,01 | 8,00 $\pm$ 0,01 | 8,01 $\pm$ 0,01 | 8,01 $\pm$ 0,01 | 8,00 $\pm$ 0,01 | 7,99 $\pm$ 0,01 |
|   | SS  | 0,02            | 0,03            | 0,02            | 0,02            | 0,02            | 0,02            | 0,03            |
|   | BSS (%)                                   | 0,27            | 0,36            | 0,28            | 0,25            | 0,31            | 0,24            | 0,37            |
|   | BH (%)                                    | -0,14           | -0,07           | 0,01            | -0,07           | -0,13           | -0,03           | 0,09            |

$\bar{X}$ : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS: Standart sapma, BSS: % Bağıl standart sapma ve BH: Bağıl hata  
Değerler Ek 2'e göre hesaplanmıştır

**Tablo 4.14.** Günler arası kesinlik ve doğruluk verileri (n=6)

| Derişim                                   |  | 2-HB            | 3-HB            | $\beta$ -HIVA   | URA             | GLU             | MAL             | MEL             |
|---|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>1 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> | Veri aralığı ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | 0,98-1,02       | 0,98-1,02       | 0,97-1,02       | 0,98-1,03       | 0,97-1,02       | 0,99-1,03       | 0,97-1,02       |
|   | $\bar{X}$                              | 1,00 $\pm$ 0,01 | 1,00 $\pm$ 0,01 | 1,00 $\pm$ 0,01 | 1,01 $\pm$ 0,01 | 0,99 $\pm$ 0,01 | 1,01 $\pm$ 0,01 | 1,00 $\pm$ 0,01 |
|   | SS                                     | 0,02            | 0,01            | 0,02            | 0,02            | 0,02            | 0,01            | 0,02            |
|   | BSS (%)                                | 1,50            | 1,28            | 1,70            | 2,23            | 1,89            | 1,37            | 1,84            |
|   | BH (%)                                 | -0,33           | -0,02           | 0,15            | -0,58           | 0,58            | -0,80           | 0,14            |
|   |  |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| <b>5 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> | Veri aralığı ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | 4,96-5,03       | 4,97-5,03       | 4,97-5,03       | 4,97-5,02       | 4,97-5,01       | 4,97-5,03       | 4,98-5,04       |
|   | $\bar{X}$                              | 5,00 $\pm$ 0,01 | 5,00 $\pm$ 0,01 | 5,00 $\pm$ 0,01 | 5,00 $\pm$ 0,01 | 4,99 $\pm$ 0,01 | 5,00 $\pm$ 0,01 | 5,01 $\pm$ 0,01 |
|   | SS                                     | 0,03            | 0,02            | 0,02            | 0,02            | 0,01            | 0,02            | 0,02            |
|   | BSS (%)                                | 0,57            | 0,45            | 0,48            | 0,38            | 0,30            | 0,39            | 0,39            |
|   | BH (%)                                 | 0,04            | 0,08            | -0,01           | 0,06            | 0,16            | -0,01           | -0,11           |
|   |  |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| <b>8 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> | Veri aralığı ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | 7,97-8,02       | 7,97-8,03       | 7,97-8,03       | 7,98-8,02       | 7,97-8,03       | 7,97-8,03       | 7,98-8,02       |
|   | $\bar{X}$                              | 8,00 $\pm$ 0,01 | 7,99 $\pm$ 0,01 | 8,00 $\pm$ 0,01 | 8,00 $\pm$ 0,01 | 8,00 $\pm$ 0,01 | 8,00 $\pm$ 0,01 | 8,00 $\pm$ 0,01 |
|   | SS                                     | 0,02            | 0,03            | 0,02            | 0,01            | 0,02            | 0,02            | 0,02            |
|   | BSS (%)                                | 0,26            | 0,32            | 0,27            | 0,18            | 0,27            | 0,26            | 0,21            |
|   | BH (%)                                 | 0,04            | 0,07            | 0,02            | -0,01           | -0,02           | 0,04            | -0,02           |
|   |  |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |

$\bar{X}$ : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS: Standart sapma, BSS: % Bağıl standart sapma ve BH: Bağıl hata Değerler Ek 2'e göre hesaplanmıştır.

**Tablo 4.15.** Enjeksiyon tekrarlanabilirliği verileri ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (n=5)

|                                |           |           |
|--------------------------------|-----------|-----------|
| <b>2-HB</b>                    | $\bar{X}$ | 1,00±0,01 |
|                                | SS        | 0,01      |
|                                | BSS (%)   | 0,73      |
| <b>3-HB</b>                    | $\bar{X}$ | 1,00±0,01 |
|                                | SS        | 0,02      |
|                                | BSS (%)   | 1,69      |
| <b><math>\beta</math>-HIVA</b> | $\bar{X}$ | 1,00±0,01 |
|                                | SS        | 0,01      |
|                                | BSS (%)   | 1,43      |
| <b>URA</b>                     | $\bar{X}$ | 1,00±0,01 |
|                                | SS        | 0,01      |
|                                | BSS (%)   | 1,37      |
| <b>GLU</b>                     | $\bar{X}$ | 1,00±0,01 |
|                                | SS        | 0,02      |
|                                | BSS (%)   | 1,90      |
| <b>MAL</b>                     | $\bar{X}$ | 1,00±0,00 |
|                                | SS        | 0,01      |
|                                | BSS (%)   | 0,95      |
| <b>MEL</b>                     | $\bar{X}$ | 1,00±0,01 |
|                                | SS        | 0,02      |
|                                | BSS (%)   | 1,77      |

$\bar{X}$ : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma.

### Duyarlılık

Gözlenebilme sınırı (LOD) sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim değeri ile alt tayin sınırı (LOQ) sinyal/gürültü oranının 10 olduğu derişim değeri olarak belirlenmiştir (Tablo 4.16).

**Tablo 4.16.** Duyarlılık testi sonuçları (n = 6)

|                                | LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | LOQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>2-HB</b>                    | 0,25                          | 0,83                          |
| <b>3-HB</b>                    | 0,08                          | 0,25                          |
| <b><math>\beta</math>-HIVA</b> | 0,20                          | 0,70                          |
| <b>URA</b>                     | 0,04                          | 0,12                          |
| <b>GLU</b>                     | 0,08                          | 0,27                          |
| <b>MAL</b>                     | 0,11                          | 0,35                          |
| <b>MEL</b>                     | 0,07                          | 0,22                          |

### **Sağlamlık ve Tutarlılık**

Optimum yöntem ve cihaz şartlarında yapılan küçük değişikliklerle (türevlendirici miktarı, türevlendirme sıcaklığı ve süresi, fırın başlangıç sıcaklığı, akış hızı) bulunan sonuçlar istatistiksel değerlendirmeleri ile Tablo 4.17’de verilmiştir.

Tutarlılık çalışması, iki farklı analizci tarafından optimize edilen yöntem koşullarında, 1 µg mL<sup>-1</sup> derişimde standart karışım çözelti için elde edilen analiz sonuçları Tablo 4.18’de karşılaştırmalı olarak verilmiş ve farkın anlamlılığı istatistiksel olarak gösterilmiştir (p < 0,05).

**Tablo 4.17.** Sağlık çalışmaları için bulgular (1 µg mL<sup>-1</sup>, n = 3)

|   |                        | <b>2-HB</b> | <b>3-HB</b> | <b>β-HIVA</b> | <b>URA</b> | <b>GLU</b> | <b>MAL</b> | <b>MEL</b> |
|---|------------------------|-------------|-------------|---------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Optimum koşullarda*</b>                  | Bulunan**              | 1,01        | 1,01        | 1,00          | 1,01       | 1,00       | 1,00       | 1,00       |
|   | BSS (%)                | 1,30        | 1,52        | 2,07          | 1,73       | 2,31       | 1,35       | 1,36       |
| <b>MSTFA+%1<br/>TMCS<br/>58 µL</b>          | Bulunan                | 0,99        | 0,99        | 0,99          | 0,99       | 1,00       | 1,00       | 1,02       |
|   | BSS (%)                | 2,18        | 0,32        | 0,44          | 1,42       | 1,11       | 0,02       | 0,01       |
|   | t <sub>Hesap</sub> *** | 0,32        | 0,28        | 0,42          | 0,46       | 1,4        | 0,34       | 0,36       |
| <b>MSTFA+%1<br/>TMCS<br/>62 µL</b>          | Bulunan                | 1,01        | 0,99        | 1,00          | 0,99       | 0,99       | 0,99       | 0,99       |
|   | BSS (%)                | 0,69        | 0,50        | 0,75          | 0,30       | 0,23       | 1,57       | 0,26       |
|   | t <sub>Hesap</sub>     | 0,36        | 0,26        | 0,44          | 0,43       | 1,3        | 0,35       | 0,36       |
| <b>Türevlendirme<br/>sıcaklığı<br/>58°C</b> | Bulunan                | 0,98        | 0,99        | 1,00          | 0,99       | 0,99       | 0,99       | 1,00       |
|   | BSS (%)                | 0,36        | 0,71        | 2,37          | 0,11       | 0,09       | 1,68       | 0,28       |
|   | t <sub>Hesap</sub>     | 0,24        | 0,30        | 0,36          | 0,25       | 0,94       | 0,42       | 0,40       |
| <b>Türevlendirme<br/>sıcaklığı<br/>62°C</b> | Bulunan                | 1,00        | 0,99        | 1,05          | 1,00       | 0,99       | 1,00       | 0,99       |
|   | BSS (%)                | 1,09        | 0,31        | 65,13         | 049        | 0,16       | 2,95       | 0,37       |
|   | t <sub>Hesap</sub>     | 0,26        | 0,28        | 0,30          | 0,27       | 0,88       | 0,36       | 0,40       |
| <b>Türevlendirme<br/>süresi<br/>23 dk</b>   | Bulunan                | 0,99        | 0,98        | 0,98          | 0,99       | 0,99       | 1,01       | 1,00       |
|   | BSS (%)                | 0,69        | 0,85        | 0,07          | 0,75       | 0,07       | 0,38       | 0,71       |
|   | t <sub>Hesap</sub>     | 0,22        | 0,20        | 0,24          | 0,30       | 0,62       | 0,24       | 0,26       |
| <b>Türevlendirme<br/>süresi<br/>27 dk</b>   | Bulunan                | 0,99        | 1,00        | 1,00          | 1,01       | 1,00       | 1,00       | 1,00       |
|   | BSS (%)                | 2,43        | 1,05        | 0,51          | 0,08       | 2,60       | 2,60       | 0,12       |
|   | t <sub>Hesap</sub>     | 0,22        | 0,21        | 0,28          | 0,32       | 0,66       | 0,22       | 0,24       |

|   |                    | 2-HB | 3-HB | $\beta$ -HIVA | URA  | GLU  | MAL  | MEL  |
|---|--------------------|------|------|---------------|------|------|------|------|
| <b>Fırın başlangıç sıcaklığı 58°C</b>   | Bulunan            | 0,98 | 0,98 | 1,00          | 1,00 | 0,98 | 0,99 | 1,00 |
|   | BSS (%)            | 0,95 | 0,11 | 2,30          | 0,18 | 0,50 | 0,18 | 1,55 |
|   | t <sub>Hesap</sub> | 0,32 | 0,30 | 0,46          | 0,54 | 0,98 | 0,38 | 0,42 |
| <b>Fırın başlangıç sıcaklığı 62°C</b>   | Bulunan            | 0,99 | 0,99 | 1,00          | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,94 |
|   | BSS (%)            | 0,87 | 0,32 | 0,18          | 0,24 | 0,35 | 0,71 | 1,21 |
|   | t <sub>Hesap</sub> | 0,30 | 0,32 | 0,50          | 0,58 | 1,02 | 0,46 | 0,50 |
| <b>Akış hızı 2,6 mL dk<sup>-1</sup></b> | Bulunan            | 0,99 | 0,99 | 0,99          | 1,00 | 0,98 | 0,99 | 1,00 |
|   | BSS (%)            | 0,09 | 0,73 | 0,51          | 0,06 | 0,42 | 0,11 | 0,57 |
|   | t <sub>Hesap</sub> | 0,24 | 0,28 | 0,44          | 0,64 | 0,92 | 0,34 | 0,34 |
| <b>Akış hızı 3,0 mL dk<sup>-1</sup></b> | Bulunan            | 0,99 | 1,00 | 1,01          | 0,99 | 1,00 | 0,99 | 0,99 |
|   | BSS (%)            | 0,47 | 0,97 | 0,52          | 0,86 | 1,58 | 0,44 | 0,48 |
|   | t <sub>Hesap</sub> | 0,22 | 0,30 | 0,46          | 0,62 | 0,94 | 0,36 | 0,36 |

\*Optimum koşullar; 60  $\mu$ L MSTFA + %1 TMCS, 60°C 25 dk; fırın başlangıç sıcaklığı 60°C; taşıyıcı gaz He, akış hızı 2,8 mL dk<sup>-1</sup>.

\*\*Bulunan: Bulunan metabolit derişimi ( $\mu$ g mL<sup>-1</sup>).

\*\*\*Sonuçlar tek tek optimum koşullarda elde edilen bulgular ile t-testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.  $t_{\text{Tablo}} = 2,77 > t_{\text{Hesap}}$  ( $p < 0,05$ ) olduğundan aralarındaki fark anlamsızdır.



**Tablo 4.18.** Tutarlılık çalışmalarına ait bulgular ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $n = 6$ )

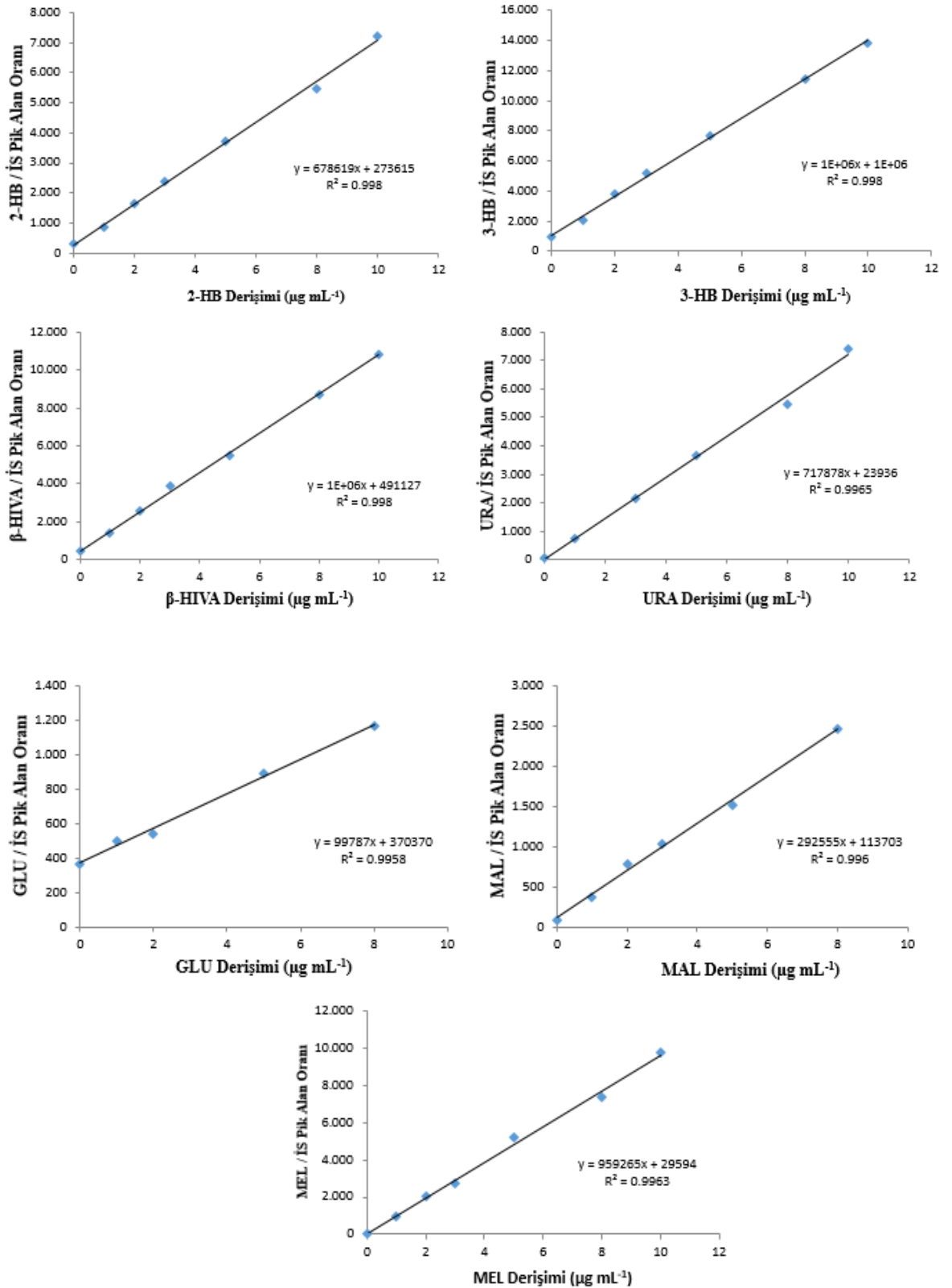
|   |           | 1. Analizci  | 2. Analizci  |
|---|-----------|--------------|--------------|
| <b>2-HB</b>   | $\bar{X}$ | $1 \pm 0,01$ | $1 \pm 0,01$ |
|   | SS        | 0,01         | 0,01         |
|   | BSS (%)   | 1,37         | 1,42         |
| <b><math>U_{\text{Hesap}} = 42 &gt; U_{\text{Tablo}}=29; p=0,458</math></b> |           |              |              |
| <b>3-HB</b>   | $\bar{X}$ | $1 \pm 0,00$ | $1 \pm 0,01$ |
|   | SS        | 0,01         | 0,02         |
|   | BSS (%)   | 0,70         | 1,61         |
| <b><math>U_{\text{Hesap}} = 32 &gt; U_{\text{Tablo}}=29; p=0,139</math></b> |           |              |              |
| <b><math>\beta</math>-HIVA</b>  | $\bar{X}$ | $1 \pm 0,01$ | $1 \pm 0,00$ |
|   | SS        | 0,01         | 0,01         |
|   | BSS (%)   | 1,38         | 1,11         |
| <b><math>U_{\text{Hesap}} = 39 &gt; U_{\text{Tablo}}=29; p=0,048</math></b> |           |              |              |
| <b>URA</b>  | $\bar{X}$ | $1 \pm 0,01$ | $1 \pm 0,00$ |
|   | SS        | 0,01         | 0,01         |
|   | BSS (%)   | 1,28         | 1,12         |
| <b><math>U_{\text{Hesap}} = 37 &gt; U_{\text{Tablo}}=29; p=0,186</math></b> |           |              |              |
| <b>GLU</b>  | $\bar{X}$ | $1 \pm 0,00$ | $1 \pm 0,01$ |
|   | SS        | 0,01         | 0,02         |
|   | BSS (%)   | 1,03         | 1,77         |
| <b><math>U_{\text{Hesap}} = 35 &gt; U_{\text{Tablo}}=29; p=0,191</math></b> |           |              |              |
| <b>MAL</b>  | $\bar{X}$ | $1 \pm 0,00$ | $1 \pm 0,00$ |
|   | SS        | 0,01         | 0,01         |
|   | BSS (%)   | 0,85         | 0,95         |
| <b><math>U_{\text{Hesap}} = 33 &gt; U_{\text{Tablo}}=29; p=0,238</math></b> |           |              |              |
| <b>MEL</b>  | $\bar{X}$ | $1 \pm 0,01$ | $1 \pm 0,01$ |
|   | SS        | 0,02         | 0,02         |
|   | BSS (%)   | 1,94         | 1,70         |
| <b><math>U_{\text{Hesap}} = 48 &gt; U_{\text{Tablo}}=29; p=0,742</math></b> |           |              |              |

$\bar{X}$ : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma

İstatistiksel hesaplar Mann Whitney U testi ile yapılmıştır.

### Geri Kazanım

Yedi metabolit için 0, 1, 2, 3, 5, 8, 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişimlerde plazmadan yapılan geri kazanım çalışmalarında elde edilen standart ekleme eğrileri Şekil 4.7'de ve ortalama geri kazanım değerleri Tablo 4.19'de verilmiştir.



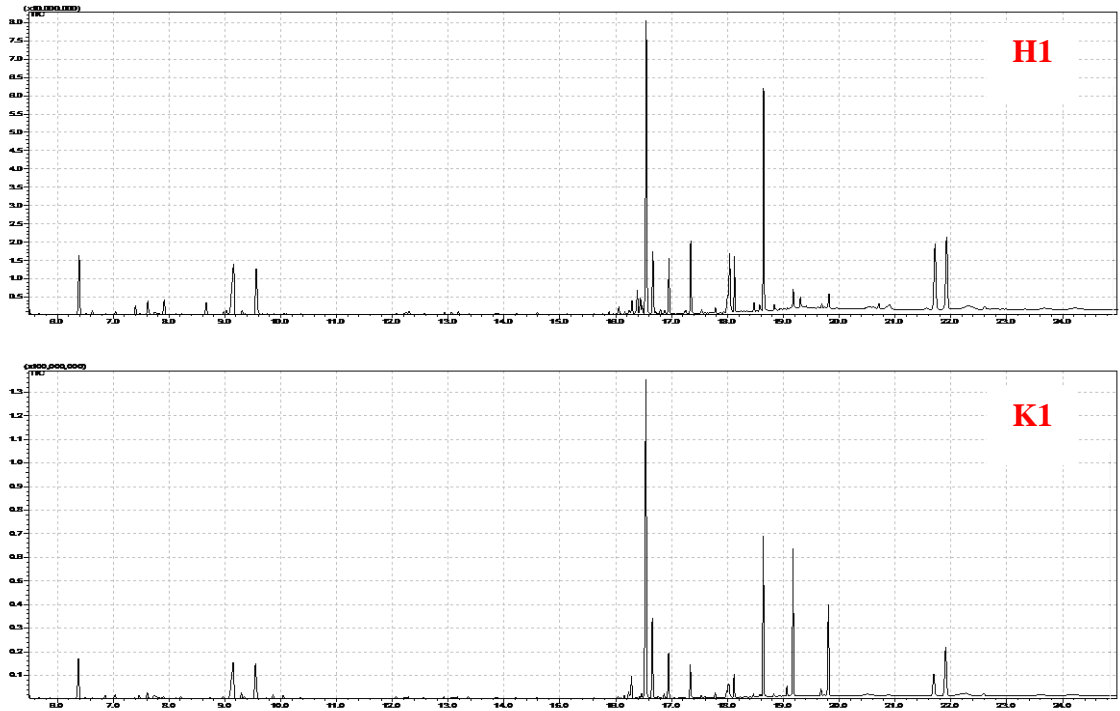
Şekil 4.7. Metabolitlerin GC-MS yöntemi ile elde edilen standart ekleme eğrileri

**Tablo 4.19.** Ortalama geri kazanım değerleri (%)

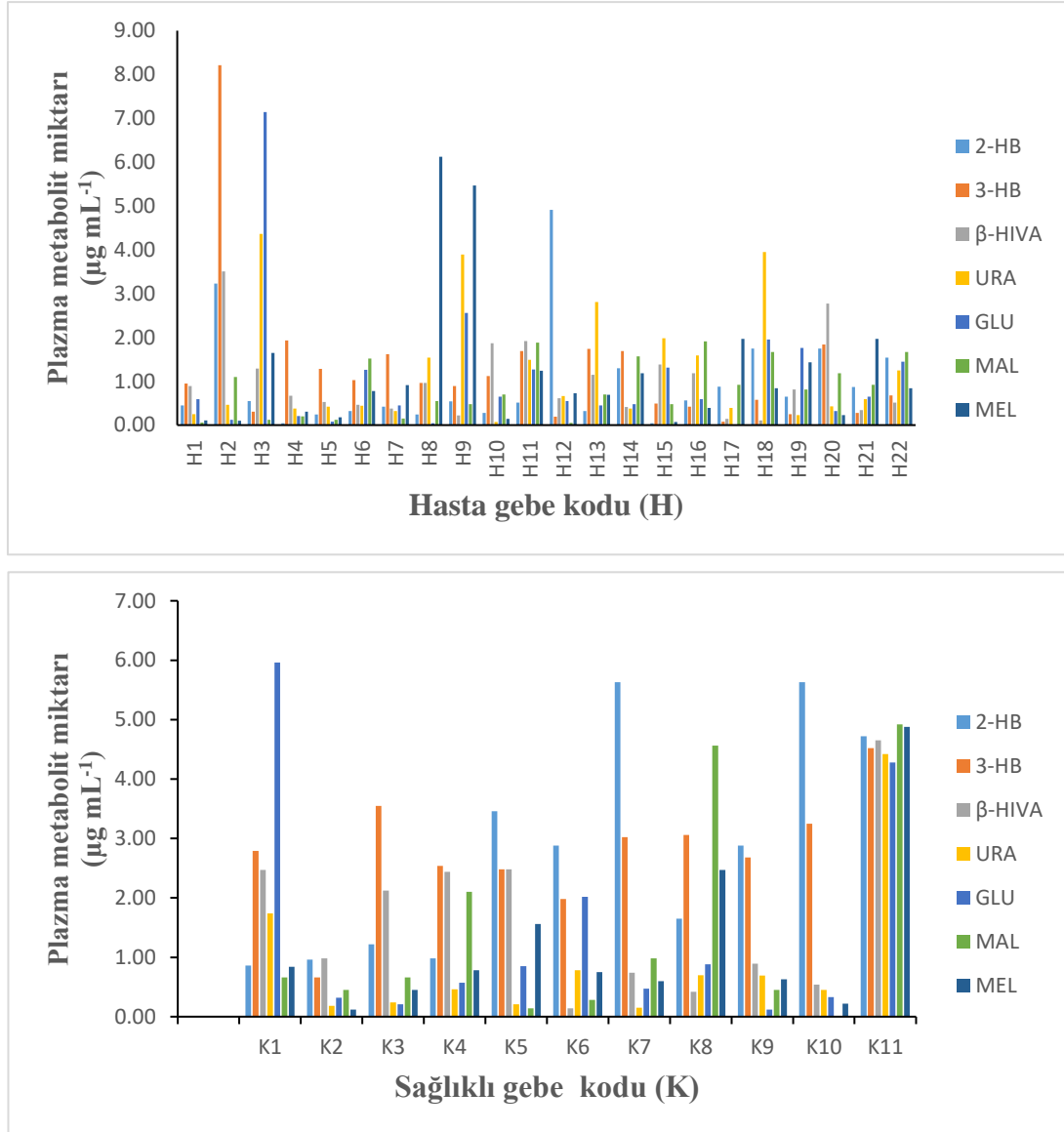
|               | Ortalama geri kazanım (%) |
|---------------|---------------------------|
| 2-HB          | 100,31                    |
| 3-HB          | 102,73                    |
| $\beta$ -HIVA | 103,73                    |
| Urasil        | 92,94                     |
| GLU           | 124,97                    |
| Maltoz        | 96,79                     |
| Melezitoz     | 101,51                    |

#### 4.6. Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması

Down Sendromu tanısı konmuş hasta ve sağlıklı gebelerden alınan plazma numuneleri, geliştirilen ve valide edilen GC-MS yöntemi ile Bölüm 3.8.11’de anlatıldığı gibi hazırlanıp analiz edilmiştir. Hasta ve sağlıklı gebeye ait birer örnek kromatogram Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Hasta ve sağlıklı gebelere ait plazma metabolit miktarları Şekil 4.9’de verilmiştir.

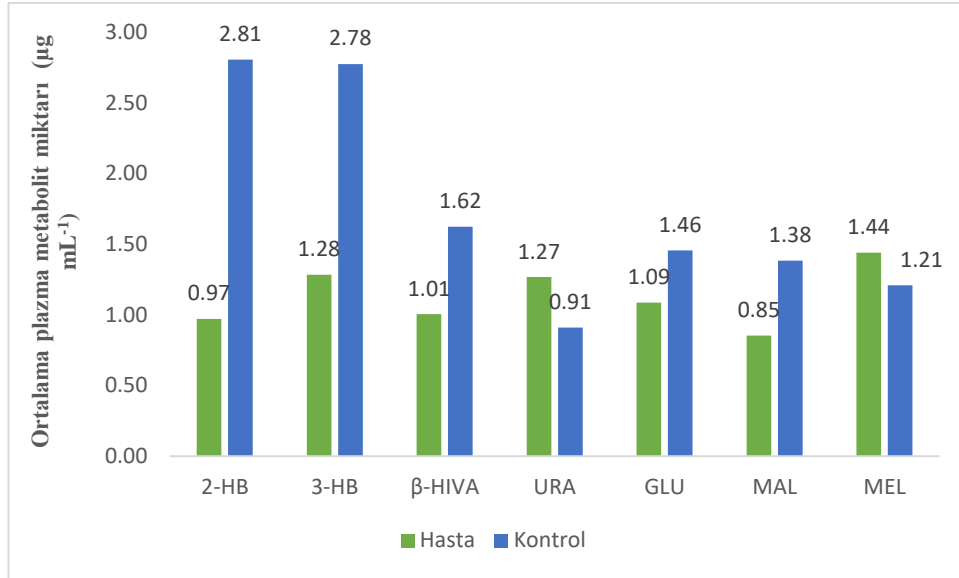
**Şekil 4.8.** Hasta ve sağlıklı gebe plazma analizine ait örnek kromatogramlar

(H1: Hasta gebeye ait K1: Sağlıklı gebeye ait)



**Şekil 4.9.** Hasta (H) ve sağlıklı (K) gebelere ait plazma metabolit miktarları  
( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Hasta ve sağlıklı gebelerde bulunan ortalama metabolit miktarları Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar t-testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiş ve hasta gebelere ait numunelerle sağlıklı gebelere ait numuneler arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (Tablo 4.20).



**Şekil 4.10.** Hasta (H) ve sağlıklı (K) gebelere ait ortalama metabolit miktarları  
(µg mL<sup>-1</sup>)

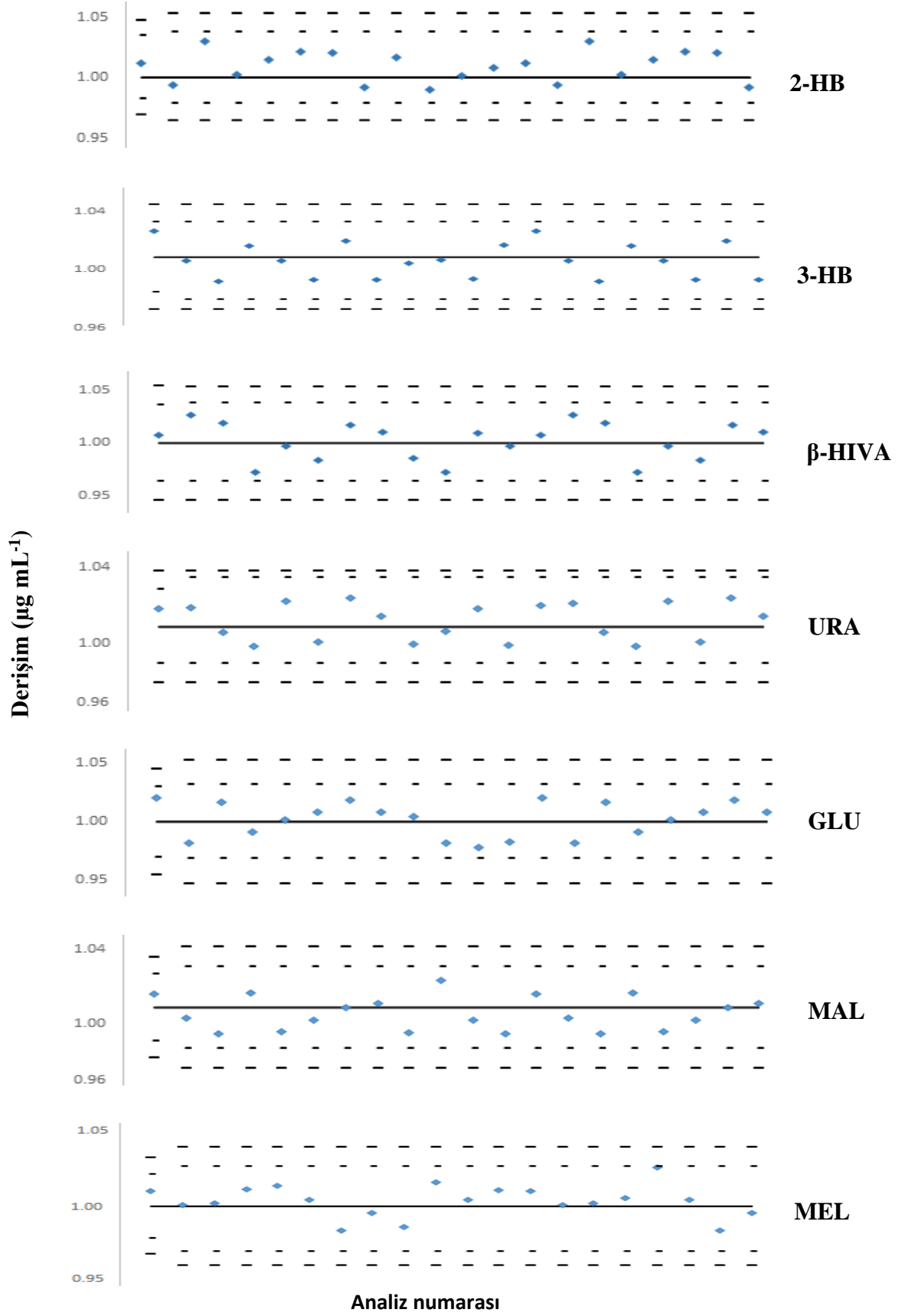
**Tablo 4.20.** Hasta (H) ve sağlıklı (K) gebelere ait karşılaştırmalı sonuçlar

|               | Grup | Ölçüm Sayısı | Ortalama | Standart Sapma | t <sub>Hesap</sub> | p     |
|---------------|------|--------------|----------|----------------|--------------------|-------|
| <b>2-HB</b>   | H    | 22           | 0.96     | 1.12           | -4.643             | 0.000 |
|               | K    | 11           | 3.20     | 1.61           |                    |       |
| <b>3-HB</b>   | H    | 22           | 1.35     | 1.84           | -2.539             | 0.041 |
|               | K    | 11           | 2.59     | 1.18           |                    |       |
| <b>β-HIVA</b> | H    | 22           | 1.01     | 0.81           | -4.463             | 0.000 |
|               | K    | 11           | 2.62     | 1.26           |                    |       |
| <b>URA</b>    | H    | 22           | 1.29     | 1.30           | -2.600             | 0.014 |
|               | K    | 11           | 2.55     | 1.31           |                    |       |
| <b>GLU</b>    | H    | 22           | 1.15     | 1.46           | -2.556             | 0.016 |
|               | K    | 11           | 2.46     | 1.19           |                    |       |
| <b>MAL</b>    | H    | 22           | 0.84     | 0.58           | -5.168             | 0.000 |
|               | K    | 11           | 2.66     | 1.45           |                    |       |
| <b>MEL</b>    | H    | 22           | 1.18     | 1.58           | -2.683             | 0.012 |
|               | K    | 11           | 2.66     | 1.31           |                    |       |

$t_{\text{Tablo}}=2,042 < t_{\text{Hesap}}$  olduğundan hasta ve sağlıklı gebelere ait plazma numunelerindeki metabolit derişimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur.

#### 4.7. Kalite Kontrol Kartları

Kalite kontrol kartları  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimdeki standart çalışma çözeltilerinin 20 gün boyunca yapılan analizleri süresince değerlendirilmesiyle oluşturulmuştur (Şekil 4.11). Bulunan derişim değerleri, analiz sonunda kalite kontrol kartlarına işlenmiş, alt-üst uyarı ( $\pm 2\text{SS}$ ) ve kontrol sınırları ( $\pm 3\text{SS}$ ) belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Kalite kontrol kartları (---2SS, ---3SS sınırı)

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, Down Sendromu'nun erken tanısında kullanılmak üzere seçilen 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL isimli metabolitlerin plazmadan aynı anda analizi için GC-MS yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin validasyon parametreleri değerlendirilmiş, Down Sendromu tanısı konulmuş hasta ve sağlıklı gebelerin plazmalarında söz konusu metabolitlerin miktar tayinleri yapılmıştır.

### Kromatografik Yöntem Optimizasyonu

2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL metabolitleri GC-MS ile türevlendirmeden analiz edildiğinde söz konusu metabolitlere ait pik gözlenmemiş bu nedenle metabolitleri uçucu hale getirmek ve kararlılıklarını artırmak için türevlendirme işlemi uygulanmıştır. Türevlendirme işlemi MBTFA, MTBSTFA + %1 TBDMSCI, MSTFA + %1 TMCS gibi farklı türevlendirme reaktifleri denenmiştir.

MBTFA ile yapılan asetilleme sonucunda tüm metabolitlerin asetilimidazol türevlerinin oluşmaması nedeniyle, türevlendirme için sililleme tepkimesi seçilmiştir. Metabolitlerin silillenmesi için MSTFA + %1 TMCS ve MTBSTFA + %1 TBDMSCI türevlendirme reaktif karışımları ile farklı sıcaklık ve türevlendirme süreleri çalışılmıştır. Silillenme ile hidroksil ve amin gruplarındaki aktif hidrojenlerin TMS ile yer değiştirmesi sonucu oluşan türevlere ait kütle spektrumları Şekil 4.1'de verilmiştir.

Analizler için URA, GLU ve MEL standartlarının trimetilsilil türevlerinin (TMS) kütle spektrumunda en yüksek bağıl bolluğa ( $m/z$ ) sahip olan iyon (temel pik) seçilmiştir. 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA ve MAL standartlarının trimetilsilil türevleri için ise kütle spektrumunda yer alan en yüksek bağıl bolluğa sahip olan iyona ait pik seçilmemiştir. Bunun nedeni; kütle spektrumunda yer alan 73 ve 147  $m/z$  değerlerinin MSTFA + %1 TMCS türevlendirme reaktifine ait pik değerleri olmasıdır. Standartlara ait seçilen iyon değerleri ve kromatografik ayırimda bulunan alıkonma zamanları Tablo 4.1'de verilmiştir.



Yapılan türevlendirmelerde 37, 50 ve 60°C türevlendirme sıcaklığı; 10, 15, 20, 25 ve 30 dk türevlendirme süreleri olarak denenmiştir, pik asimetri oranının en iyi olduğu MSTFA + %1 TMCS reaktifi ile 60°C' de 25 dk süreli türevlendirme koşulunda elde edilmiş ve bu koşul optimum koşul olarak seçilmiştir. Çalışılan metabolitler insan vücudunda da bulunduğu ve insan vücudunun ısısı yaklaşık 37°C derece olduğundan türevlendirmede 37°C'de denenmiştir. Türevlendirme için MSTFA + %1 TMCS reaktifinden 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL hacimlerde denenmiş ve 60 µL kullanılmasının yeterli olduğu görülmüştür. 60 µL'den az türevlendirme reaktifi kullanıldığında pik alanının daha düşük olduğu ve 60 µL'den fazla türevlendirme reaktifi kullanıldığında pik alanın daha fazla artmadığı gözlemlenmiştir ve bu durum artan hacime bağlı olarak seyrelme sonucu pik alan değerlerinde azalma olduğunu göstermektedir (Şekil 4.2). 60 µL türevlendirme reaktif hacmi olarak belirlenmiştir. Türevlendirme işlemi metabolitlerin standart çözeltileri ve plazma çözeltilisine uygulandığında, her iki matriks içinde türevlendirme koşullarının aynı olduğu bulunmuştur.

Sililleme ile yapılan türevlendirmede, keton ve aldehit içeren gruplar metoksiaminasyon (metoksiamin ile türevlendirme) ile korunmuştur. Bunun iki nedeni vardır; birincisi, keto grup korunmazsa, alfa-keto asitleri karboksil grupları karbondioksit olarak kimyasal kayba uğrama eğilimindedirler. İkincisi ise birçok metabolit, 2- oksoglutarat ve pürivat gibi alfa keto asit grupları içerdiğinden, türevlendirme nicel metabolit profillendirmesi için bir önlem adımıdır. Daha da önemlisi, birçok karbonhidrat döngüsel ve açık zincir (doğrusal) formunda bulunur, keto ya da aldehit grubunu karbonhidrat hidroksil grupları ile hemiketaller ya da hemiasetaller oluşturmak için merkez olarak kullanır. Anomerik karbonun hidroksil grupları alfa ya da beta pozisyonunda olabilir. Çeşitli formların her biri GC-MS'de farklı pikler verir. Buna karşın, keto veya aldehit gruplarının korunması olmaksızın, farklı piklerin oranları kontrol edilemeyebilir ve bu yüzden nicel analizde hatalar oluşabilir. Birçok durumda GC-MS'de iki ayrı pik oluşmasına sebep olan karbonil gruplar metoksiaminlendiğinde türeve ilişkin tek pik gözlenir (96-98). Bu amaçla, çalışmamızda piridin/metoksiamin çözeltisi eklenerek ve eklenmeden yapılan türevlendirmeler sonucunda piridinli analizlerin pik alanlarının daha iyi olduğu Şekil 4.3'e göre belirlenmiştir. Sonuçta 2-HB, 3-HB, β-HIVA, URA, GLU, MAL ve

MEL'in GC-MS ile analizi için silillemeden önceki basamakta piridin katalizörü varlığında 20 µL metoksiamin hidroklorür eklenip 30°C'de 90 dk bekletildikten sonra 60 µL MSTFA + %1 TMCS kullanılarak 60°C'de 25 dk trimetilsilil türevleri oluşturulmuştur.

2-HB-2TMS, 3-HB-2TMS, β-HIVA-2TMS, URA-2TMS, GLU-3TMS, MAL-8TMS ve MEL-11TMS türevlerinin çalışılan GC-MS sistemindeki alıkonma zamanlarından hareketle kaynama noktalarının sırasıyla 124,56 – 129,75 – 137,24 – 155,49 – 191,63 – 247,01 – 292,88°C olduğu bulunmuştur. Söz konusu metabolit türevlerinin molekül ağırlıkları sırasıyla 248 – 248 – 262 – 256 – 363 – 918 – 1296 olarak hesaplanmıştır. Metabolitlerin oluşan silil türevlerinin kaynama noktalarındaki artışının molekül ağırlıkları (URA hariç) ile orantılı olduğu görülmektedir. URA'nın molekül ağırlığının β-HIVA'nın molekül ağırlığından küçük olmasına rağmen kaynama noktasının daha yüksek olmasının sterik etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Metabolitlerin moleküler özellikleri göz önüne alınarak %5 difenil %95 dimetilpolisiloksan (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) dan oluşan kılcal kolon ile çalışılmıştır. Uygun fırın sıcaklık programını belirlemek için Tablo 4.4' de belirtilen sekiz farklı koşul denenmiştir. Fırın sıcaklık programı açısından denenen koşullar, analiz süresi, k', R<sub>s</sub>, PAO gibi sistem uygunluk parametreleri esas alınarak (Tablo 4.5) değerlendirildiğinde her metabolit için, k'nün 1.5'dan büyük, R<sub>s</sub>'nin 2'den büyük, PAO'nun 1 olduğu koşul 8, fırın başlangıç sıcaklığı 60°C (1 dk), 10°C dk<sup>-1</sup> artış ile 200°C, 30°C artış ile 320°C (6 dk), kolon fırın sıcaklık programı olarak seçilmiştir.

Kaynaklardaki çalışmalarda en iyi doğrusal hız aralığına sahip taşıyıcı gaz olan H<sub>2</sub> gazı patlayıcı özelliğe sahip olduğundan ikinci sırada yer alan taşıyıcı gaz He seçilmiştir (59). Ayrıca dedektörümüzün kütle spektrometresi olması nedeniyle He gazı taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz akış hızı olarak 2,0-3,2 mL dk<sup>-1</sup> akış hızları denenmiş ve uygun akış hızı 2,8 mL dk<sup>-1</sup> olarak seçilmiştir.

GC-MS çalışmalarında endojen olmayan ve toplam analiz süresinin ortasında kolonu terk eden radyo izotop işaretli miristik asit-d27 iç standart olarak seçilmiştir.

Belirlenen kromatografik şartlarda her metabolitin oluşan trimetilsilil türevine ilişkin alıkonma zamanları Tablo 4.1’de verilmiştir. İç standart olarak kullanılan miristik asit-d27’nin alıkonma zamanı  $16,17 \pm 0,01$  olarak bulunmuştur. Metabolitlerin ve iç standartın trimetilsilil türevlerine ait alıkonma zamanlarının standart hatalarının düşük olması (Tablo 4.1) yöntemin çevre şartlarından etkilenmediğini göstermektedir.

### **Protein Çöktürmesi Optimizasyonu**

Metabolitlerin plazmadan geri kazanımı için protein çöktürmesi işlemi plazma ve su üzerine standart karışım çözeltisi ilave edilerek gerçekleştirilmiştir. Proteinler çöktürüldükten sonra, plazma ve suda GC-MS yöntemi ile analizler gerçekleştirilmiş ve her ikisine eklenen metabolit miktarları arasında fark bulunmamıştır. Böylece analizlerde plazma proteinlerinin tamamen çöktürüldüğü sonucuna varılmıştır. Çözücü sistemi olarak metanol veya metanol:su (1:1) (h:h) kullanıldığında bazı metabolitler için çok düşük geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Asetonitril, izopropil alkol:asetonitril (1:1) (h:h), izopropil alkol:asetonitril:su (3:3:2) (h:h:h) karışımları denendiğinde en yüksek tüketim verimine asetonitril ile ulaşılmış, bu nedenle protein çöktürme işlemi için asetonitril seçilmiştir (Tablo 4.6).

### **Kromatografik Yöntem Validasyonu**

Metabolitlerin plazmadan miktar tayinleri için geliştirilen analiz yönteminin kararlılık, özgünlük, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, sağlamlık, tutarlılık ve sistem uygunluğu parametreleri incelenerek validasyonu gerçekleştirilmiştir.

$2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  metabolit stok çözeltilerinin  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ’de (buzdolabında) bir hafta içinde bozunmakta olduğu saptanmış ve stok çözeltiler  $-20^\circ\text{C}$ ’de bir ay bekletilerek kararlılıkları araştırılmıştır ve stok çözeltilerinin  $-20^\circ\text{C}$ ’de 1 ay boyunca kararlı olduğu bulunmuştur. Metabolitlerin standart çözeltilerinin ( $1,0$  ve  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) oda sıcaklığında 24 saat boyunca kararlı olduğu belirlenmiştir. Türevlendirilen standart ve numune çözeltilerinin oto örnekleyicide 24 saat boyunca dayanıklı oldukları gözlemlenmiştir. Kararlılık çalışmalarında plazma numunelerinin 3 donma-erime döngüsü boyunca bozunmadığı bulunmuştur. Tüm kararlılık çalışmalarında, yeni hazırlanan standarda göre karşılaştırma çalışmaları yapıldığında %2’den daha az

değişim bulunması sonucunda denenen koşullarda çözeltilerin kararlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.8 - 4.9 - 4.10). Kararlılık çalışmaları kapsamında denenen her bir koşulda bulunan sonuçlar, taze hazırlanmış çözeltinin analiziyle bulunan sonuç ile iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi uygulanarak karşılaştırılmıştır.  $\alpha = 0,05$  yanılma düzeyinde  $1, 10 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimdeki standart karışım çözeltisi ve plazmaya eklenen  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimdeki 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL metabolitleri için  $t_{\text{Hesap}} < t_{\text{tablo}} = 2,776$ ,  $p > 0,05$  bulunmuş ve iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir.

Metabolitlerin kalibrasyon eğrilerinin , , 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL için  $0,5-10 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5). Doğrusallıktan ayrılışın önemsiz ve korelasyon katsayısının önemli bir değer olduğu istatistiksel olarak bulunmuştur (Tablo 4.11). Metabolitlerin derişimi ile iç standarta göre pik alan oranları arasındaki doğrusal ilişkiden yararlanılarak, bulunan metabolit derişimleri olması gereken metabolit derişimine karşı grafiğe geçirildiğinde aradaki ilişkinin doğrusal olduğu bulunmuş (Şekil 4.6) ve bu doğrusallık Tablo 4.12'da gösterildiği gibi istatistiksel olarak kanıtlanmıştır.

Yöntemin doğruluğu üç farklı derişimde çalışma standardından hazırlanan altı bağımsız örneğin gün içi ve günler arası analizlerine ilişkin bulguların bağıl hata değerleri sırasıyla Tablo 4.13 ve Tablo 4.14'de değerlendirilmiştir. Bağıl hata değerleri gün içi %1,24 ve günler arası %0,80'den düşük bulunmuştur.

Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında doğrulukta yer alan bulguların bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Gün içi kesinlik çalışmalarında bağıl standart sapma değerleri %2,31 ve günler arasında da %2,23'ün altında bulunmuştur. Bu sonuçlar, biyolojik materyal analizlerinde kesinlik ve doğruluk için kaynaklarda belirtilen %15 sınırının altında bulunduğundan yöntemimizin kesin ve doğru olduğu gösterilmiştir (92).

Enjeksiyon tekrarlanabilirliği,  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  çalışma standardının beş tekrarlı enjeksiyonu ile test edilmiştir ve bağıl standart sapma değerlerinin %1,77'den düşük olduğu belirlenmiştir. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği çalışmaları beş kez ile sınırlandırılmıştır. Aynı numunenin altıncı kez enjeksiyonunda her metabolit için pik

alan değerlerinde önemli bozunma olduğu görülmüştür. Bu durumun hava ile temasın artması sonucu metabolit türevlerinin hidrolizinden kaynaklanmakta olduğu düşünülmektedir.

Yöntemin duyarlılığı araştırıldığında, sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim değeri LOD ve 10 olduğu derişim değeri LOQ olarak seçilmiştir. 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL için LOD değerleri sırasıyla 0,25-0,08-0,20-0,04-0,08-0,11-0,07  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ve LOQ değerleri 0,83-0,25-0,70-0,12-0,27-0,35-0,22  $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir. Bu değerlerin, farklı kaynaklarda GC-MS yöntemi ile yapılan analizler sonucunda bildirilen 3-HB için LOD 7,00-3,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ve LOQ 2,00-1,00-0,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; URA için LOD 0,1 – 0,08  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; GLU için LOD 0,02  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ve LOQ 0,01  $\mu\text{g mL}^{-1}$  plazma metabolit düzeyleri ile karşılaştırıldığında yöntemin yeterli duyarlılıkta olduğu görülmektedir (32, 33, 37, 47, 49, 54, 92).

Yöntemin sağlamlığı, türevlendirme reaktifi miktarı (MSTFA + %1 TMCS), türevlendirme sıcaklığı ve süresi, fırın başlangıç sıcaklığı ve akış hızı gibi yöntem ve cihaz şartlarında artma ve eksilme yönünde yapılan küçük değişiklikler sonucu elde edilen değerlerin optimize koşullarda elde edilen değerler ile iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi uygulanarak karşılaştırılması sonucu bulunmuştur.  $t_{\text{Hesap}}$  değerleri  $t_{\text{tablo}}=2,776$  değerinden küçük bulunduğundan yapılan değişikliklerin yöntemin sağlamlığını etkilemediği istatistiksel olarak gösterilmiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.17).

Yöntemin tutarlılık çalışması kapsamında, 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde standart karışım çözeltisinin iki farklı analizci tarafından elde edilen bulgularına Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL metabolitleri için  $U_{\text{Hesap}}$  değerleri sırasıyla 42, 32, 39, 37, 35, 33, 48 bulunmuştur.  $U_{\text{Hesap}}>U_{\text{Tablo}}=29$  ve  $p>0,05$  olduğundan iki farklı analizciye ait sonuçlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı ve yöntemin tutarlı olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 4.18).

2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL metabolitleri için geliştirilen GC-MS yönteminin sistem uygunluğu alıkonma zamanlarının tekrarlanabilirliği,  $k'$ ,  $R_s$ ,  $N$  ve PAO açısından değerlendirildiğinde sırasıyla  $BSS \leq 1$ ,  $k'>2$ ,  $R_s> 1,5$   $N \geq$

2000, PAO < 1,5 bulunduğundan ve bu değerler kabul sınırları içinde olduğundan (Tablo 4.7) GC-MS sisteminin söz konusu metabolitlerin analizlerini gerçekleştirmek için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Miktar tayinleri yapılacak olan metabolitlerin endojen metabolitler olması nedeniyle geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemiyle yapılmıştır. Geri kazanım değerleriyle 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL için sırasıyla 100,31 - 102,73 - 103,73 - 92,94 - 124,97 - 96,79 ve 101,51'dir. Kaynaklarda da GC-MS ile yapılan GLU analizlerine ilişkin geri kazanım çalışmalarında %129,7 geri kazanım değeri bulunmuş olup, sonuçlar benzerlik göstermektedir (54).

### **Yöntemin Uygulanması**

Geliştirilen ve valide edilen GC-MS yöntemi ile Down Sendromu tanısı konmuş hasta 22 gebe ve sağlıklı 11 gebeden alınan plazma numunelerinin analizleri yapılmıştır. Hasta gebe ve sağlıklı gebelere ait plazma metabolit miktarları Şekil 4.9'da verilmiştir.

Hasta ve sağlıklı gebe grubunu oluşturan plazma numunelerinin analizi sonucun bulunan 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL değerleri t-testi ile karşılaştırıldığında  $t_{\text{Hesap}}$  değerleri sırasıyla -4.643, -2.539, -4.463, -2.600, -2.556, -5.168, -2.683 bulunmuştur.  $t_{\text{Tablo}}=2,042 < t_{\text{Hesap}}$  olduğundan hasta ve sağlıklı gebelere ait plazma numunelerindeki metabolit miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ( $p < 0.05$ ).

Kalite kontrol kartlarında, her bir metabolite ait  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimdeki standart çalışma çözeltisinin 20 gün boyunca analizleri yapılmış ve bulunan derişim değerlerinin rastgele bir dağılım gösterdiği ve alt-üst uyarı sınırlarını aşmadığı saptanmıştır (Şekil 4.11).

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kaynaklarda Down Sendromu'nun erken tanısı için yapılan metabolomik analizler sonucunda dört adet metabolitin, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, kaproik asit tuzu ve androsteron sülfatın, Down Sendromu'nun erken tanısı için kullanılabileceği belirtilmiştir. Bu metabolitlerden kaproik asit ve androsteron sülfatın analizlerinde mevcut GC-MS sistemi ile cevap alınamadığından çalışma dışı bırakılmıştır. GO14/173 nolu "Down Sendromunun Yüksek Seçicilikte Tanısı İçin Metabolomik Yaklaşımlar" isimli Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen projesi kapsamında belirlenen kırk beş yeni metabolit arasından  $p > 0,05$  ve artış oranının ikiden fazla farklılaştığı 2-HB, URA, GLU, MAL ve MEL metabolitleri de tez kapsamına dahil edilmiştir. Sonuçta, seçilen yedi metabolitin plazmadan aynı anda analizleri için GC-MS yöntemi geliştirilmiştir.

Metabolitlerin GC-MS ile kromatografik ayırımında %5 difenil %95 dimetilpolisiloksan (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu$ m) kapiler kolon kullanılmıştır. Fırın sıcaklık programı 60°C'de 1 dk bekletilerek başlatılmış, dakikada 10°C artış ile 200°C'ye sonra dakikada 30°C artış ile 320°C ulaşılmış ve bu sıcaklıkta 6 dk bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Kütle dedektör transfer bölmesi sıcaklığı da 290°C'dir. Hareketli faz He olup gazın akış hızı 2,80 mL dk<sup>-1</sup>'dir. Enjeksiyon türü bölmeli olup oranı 1:10'dur. İç standart olarak miristik asit-d27 kullanılmıştır. Belirlenen optimum koşullarda analiz GC-MS ile 25 dk'da gerçekleştirilmiştir.

Standart ekleme yöntemi ile gerçekleştirilen analizler sonucunda geri kazanım değerleri 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL için sırasıyla 100,31 - 102,73 - 103,73 - 92,94 - 124,97- 96,79 ve 101,51 bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemin biyoanalitik validasyon parametreleri değerlendirildiğinde yöntemin yedi metabolitin plazmadan analizleri için kararlı, özgün, doğrusal, doğru, kesin, duyarlı, sağlam ve tutarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Alt tayin sınırı 2-HB, 3-HB,  $\beta$ -HIVA, URA, GLU, MAL ve MEL için sırasıyla 0,25 - 0,08 - 0,20 - 0,04 - 0,08 - 0,11 ve 0,07  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Geliştirilen GC-MS yöntemiyle GC-MS için kaynaklarda belirtilen tayin sınırlarından daha düşük derişimlere inildiği görülmektedir.

Yöntem, Down Sendromu tanısı konmuş hasta ve kontrol grubu olarak sağlıklı gebelerden alınan plazma numunelerine uygulandığında her metabolit için sağlıklı ve hasta gebe plazmalarındaki metabolit miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular ile çalışılan populasyonun genişletilmesi sonucunda Down Sendromu tanısını koymada bu metabolitlerin etkinliğinin kesinleştirilmesi ve böylece anne sağlığının korunup sağlıklı bireylerin doğmasına katkıda bulunarak toplum sağlığının korunması hedeflenmektedir. Bu yolda söz konusu metabolitlerin aynı anda duyarlı analizlerinin GC-MS ile yapılabilirliğinin gösterilmesi önemli bir adımdır.



## 7. KAYNAKLAR

1. Hecht CA, Hook EB. Rates of Down syndrome at livebirth by one-year maternal age intervals in studies with apparent close to complete ascertainment in populations of European origin: A proposed revised rate schedule for use in genetic and prenatal screening. *American Journal of Medical Genetics*. 1996;62(4):376-85.
2. Evans MI WR. Invasive prenatal diagnostic procedures *Semin Perinatol*. 2005;29:215-8.
3. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature protocols*. 2007;2(11):2692-703.
4. Nemutlu E ZS, Gupta A, Juranic NO, Macura SI, Terzic A, et al. . Dynamic phosphometabolomic profiling of human tissues and transgenic models by  $^{18}\text{O}$ -assisted  $(3)(1)\text{P}$  NMR and mass spectrometry. *Physiol Genomics*. 2012;44:386-402.
5. Nemutlu E ZS, Juranic NO, Terzic A, Macura S, Dzeja P. .  $^{18}\text{O}$ -assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croat Med J*. 2012;53:529-34.
6. Nemutlu E, Juranic N, Zhang S, Ward LE, Dutta T, Nair KS, et al. Electron spray ionization mass spectrometry and 2D  $^{31}\text{P}$  NMR for monitoring  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  isotope exchange and turnover rates of metabolic oligophosphates. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*. 2012;403(3):697-706.
7. Bahado-Singh RO AR, Mandal R, Dong E, Xia J, Kruger M, et al. . Metabolomic analysis for firsttrimester Down syndrome prediction. *Am J Obstet Gynecol*. 2013.
8. Gall WE, Beebe K, Lawton KA, Adam K-P, Mitchell MW, Nakhle PJ, et al.  $\alpha$ -Hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLOS ONE*. 2010;5(5):e10883.
9. 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.
10. Landaas S, Pettersen JE. Clinical conditions associated with urinary excretion of 2-hydroxybutyric acid. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 1975;35(3):259-66.
11. Figen Gürdöl EA. *Biyokimya: Nobel Tıp Kitabevleri*; 2013.
12. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00357>. [Internet]. [Mayıs 2015].
13. Stenberg M, Marko-Varga G, Öste R. Enantioseparation of d- and l-amino acids by a coupled system consisting of an ion-exchange column and a chiral column and determination of d-aspartic acid and d-glutamic acid in soy products. *Food Chemistry*. 2002;79(4):507-12.
14. Moldoveanu S, Scott W, Zhu J. Analysis of small carbohydrates in several bioactive botanicals by gas chromatography with mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2015;38(21):3677-86.

15. Wang S, Fan L, Cui S. CE-LIF chiral separation of aspartic acid and glutamic acid enantiomers using human serum albumin and sodium cholate as dual selectors. *Journal of Separation Science*. 2009;32(18):3184-90.
16. Horvath T, Matthews N, Stratton S, Mock D, Boysen G. Measurement of 3-hydroxyisovaleric acid in urine from marginally biotin-deficient humans by UPLC-MS/MS. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. 2012;401(9):2805-10.
17. Jiang Z, Liu F, Li SFY, Ong ES. Metabolic profile associated with glucose and cholesterol lowering effects of berberine in Sprague-Dawley rats. *Metabolomics*. 2012;8(6):1052-68.
18. Fuente Edl, Sanz ML, Martinez-Castro I, Sanz J, Ruiz-Matute AI. Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chemistry*. 2007;105(1):84-93.
19. Wan ECH, Yu JZ. Determination of sugar compounds in atmospheric aerosols by liquid chromatography combined with positive electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2006;1107(1–2):175-81.
20. Ouchemoukh S, Schweitzer P, Bachir Bey M, Djoudad-Kadji H, Louaileche H. HPLC sugar profiles of algerian honeys. *Food Chemistry*. 2010;121(2):561-8.
21. Sanz ML, Gonzalez M, de Lorenzo C, Sanz J, Martínez-Castro I. A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. *Food Chemistry*. 2005;91(2):313-7.
22. Lin Z, Goncalves CMV, Dai L, Lu HM, Huang JH, Ji HC, et al. - Exploring metabolic syndrome serum profiling based on gas chromatography mass spectrometry and random forest models. *Analytica Chimica Acta*.
23. Xiao YP, Wu TX, Hong QH, Chen AG, Yang CM, Li XY, et al. Response to weaning and dietary L-glutamine supplementation: Metabolomic analysis in piglets by gas chromatography/ mass spectrometry. *Journal of Zhejiang University: Science B*. 2012;13(7):567-78.
24. Kim KR, Ha D, Jeon J, Park HG, Lee J, Kim JH. Enantiomeric separation and discrimination of 2-hydroxy acids as O-trifluoroacetylated (S)-(+)-3-methyl-2-butyl esters by achiral dual-capillary column gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000;874(1):91-100.
25. Huang Q, Aa J, Jia H, Xin X, Song Q, Shi J, et al. A pharmacometabonomic approach to predicting metabolic phenotypes and pharmacokinetic parameters of atorvastatin in healthy volunteers. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(9):3970-81.
26. Seo C, Hwang YH, Kim Y, Yee ST, Paik MJ, Joo BS, et al. Metabolomic study of aging in mouse plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2016;1025:1-6.
27. Pechlivanis A, Chatziioannou AC, Theodoridis GA, Veskoukis AS, Kouretas D, Mougios V. GC-MS analysis of blood for the metabonomic investigation of the effects of physical exercise and allopurinol administration on rats. *Journal of*

- Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2014;966:127-31.
28. Nishiumi S, Kobayashi T, Ikeda A, Yoshie T, Kibi M, Izumi Y, et al. A Novel Serum metabolomics-based diagnostic approach for Colorectal cancer: Public Library Science; 2012.
  29. Thompson Legault J, Des Rosiers C, Rioux JD, Boucher G, Daneault C, Mootha VK, et al. A metabolic signature of mitochondrial dysfunction revealed through a monogenic form of leigh syndrome. *Cell Reports*. 2015;13(5):981-9.
  30. Lu YH, Jiye A, Wang GJ, Hao HP, Huang Q, Yan B, et al. Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabonomic approach to differentiating hypertension- and age-related metabolic variation in spontaneously hypertensive rats.
  31. Zaitso K, Miyawaki I, Bando K, Horie H, Shima N, Katagi M, et al. Metabolic profiling of urine and blood plasma in rat models of drug addiction on the basis of morphine, methamphetamine, and cocaine-induced conditioned place preference. *Anal Bioanal Chem*. 2013;406:1339-54.
  32. Hassanand HMA, Cooper GAA. Determination of  $\beta$ -hydroxybutyrate in blood and urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 2009;33(8):502-7.
  33. Elliott S, Smith C, Cassidy D. The post-mortem relationship between beta-hydroxybutyrate (BHB), acetone and ethanol in ketoacidosis. *Forensic Science International*. 2009;198(1-3):53-7.
  34. Felby S, Nielsen E, Thomsen JL. The postmortem distribution of ketone bodies between blood, vitreous humor, spinal fluid, and urine. *Forensic Science, Medicine, And Pathology*. 2008;4(2):100-7.
  35. Lee J, Yoon H-R. Rapid diagnosis of metabolic disorders based on achiral separation by gas chromatography with a dual column. *Analytical Letters*. 2015;48(2):231.
  36. Zhang FS, Wang DQ, Li XW, Li ZY, Chao J, Qin XM. Metabolomic study of the fever model induced by baker's yeast and the antipyretic effects of aspirin in rats using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;81-82:168-77.
  37. Paik MJ, Cho EY, Ahn YH, Lee G, Choi S, Kim H, et al. Simultaneous clinical monitoring of lactic acid, pyruvic acid and ketone bodies in plasma as methoxime/tertbutyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring mode. *Biomedical Chromatography*. 2008;22(5):450-3.
  38. Hagenfeldt L, Blomstrand R. Gas chromatography of beta-hydroxybutyric acid and biochemically related compounds. *Acta Chemica Scandinavica*. 1965;19:251-3.
  39. Cosmi G, Corcia Ad, Samperi R, Vinci G, editors. Trace analysis of free hydroxyacids by gas chromatography 1982 1982/01/01/: Istituto di Chimica Analitica, Univ. di Roma, 00185 Rome, Italy.

40. Liu L, Wang Y, Zheng T, Cao B, Li M, Shi J, et al. Metabolic shifts induced by human H460 cells in tumor-bearing mice. *Biomedical Chromatography*. 2016(3):337.
41. Hur H, Paik MJ, Xuan Y, Nguyen DT, Ham IH, Yun J, et al. Quantitative measurement of organic acids in tissues from Gastric cancer patients indicates increased glucose metabolism in Gastric cancer. *PLOS One*. 2014;9(6).
42. Luis PBM, Ruiten JP, Ijlst L, Diogo L, Garcia P, de Almeida IT, et al. Inhibition of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase explains the increased excretion of 3-hydroxyisovaleric acid in valproate-treated patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2012; 35(3):443-9.
43. Shigematsu Y, Bykov IL, Liu YY, Nakai A, Kikawa Y, Sudo M, et al. Acylcarnitine profile in tissues and body fluids of biotin-deficient rats with and without l-carnitine supplementation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 1994;17(6):678-90.
44. Bi D, Shapiro J, Shapiro A, Grem JL, Takimoto CH, Anderson LW. Measurement of plasma uracil using gas chromatography-mass spectrometry in normal individuals and in patients receiving inhibitors of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000;738(2):249-58.
45. Kuhara T, Ohse M, Inoue Y, Cooper AJL. A GC/MS-based metabolomic approach for diagnosing citrin deficiency. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011;400(7):1881-94.
46. Ho DH, Covington W, Brown N, Lin SN, Pazdur R, Huo Y-Y, et al. Oral uracil and ftorafur plus leucovorin: pharmacokinetics and toxicity in patients with metastatic cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2000;46(5):351-6.
47. Brohi ROZ, Khuhawar MY, Channa A, Laghari AJ, Abbasi K. Gas chromatographic determination of purines and pyrimidines from dna using ethyl chloroformate as derivatizing reagent. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*. 2016;17(1):50-7.
48. Mashiyama ST, Courtemanche C, Elson-Schwab I, Ames BN, Crott J, Fenech M, et al. Uracil in DNA, determined by an improved assay, is increased when deoxynucleosides are added to folate-deficient cultured human lymphocytes. *Analytical Biochemistry*. 2004;330(1):58-69.
49. Brohi R, Khuhawar M, Khuhawar T. GC-FID determination of nucleobases guanine, adenine, cytosine, and thymine from DNA by precolumn derivatization with isobutyl chloroformate. *Journal of Analytical Science & Technology*. 2016;7(1):1-6.
50. Ishii Y, Suzuki S, Takahashi Y, Asai S, Takayama T. Can the 2-13C-uracil breath test be used to predict the effect of the antitumor drug S-1? *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2010;66(2):333-43.
51. Vermeersch KA, Wang L, McDonald JF, Styczynski MP. Distinct metabolic responses of an ovarian cancer stem cell line. *BMC Systems Biology*. 2014;8(1):134.

52. Bao Y, Zhao T, Wang X, Qiu Y, Su M, Jia W, et al. Metabonomic Variations in the drug-treated type 2 diabetes mellitus patients and healthy volunteers. *Journal of Proteome Research*. 2009;8(4):1623-30.
53. Shan L, Liao F, Jin H, Ye F, Tong P, Xiao L, et al. Plasma metabonomic profiling of lumbar disc herniation and its traditional Chinese medicine subtypes in patients by using gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Molecular BioSystems*. 2014;10(11):2965-73.
54. Pinto MCX, de Paiva MJN, Menezes HC, Cardeal ZDL, Oliveira-Lima OC, Gomez MV, et al. Neurochemical study of amino acids in rodent brain structures using an improved gas chromatography-mass spectrometry method. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2014;55:24-37.
55. Humbert B, Nguyen P, Obled C, Bobin C, Vaslin A, Sweeten S, et al. Use of L-[15N] glutamic acid and homogluthathione to determine both glutathione synthesis and concentration by gas chromatography-mass spectrometry (GCMS). *Journal of Mass Spectrometry*. 2001;36(7):726-35.
56. Nezami Ranjbar MR, Luo Y, Di Poto C, Varghese RS, Ferrarini A, Zhang C, et al. GC-MS based plasma metabolomics for identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma in Egyptian cohort. *PLoS ONE*. 2015;10(6):1-19.
57. Badoud F, Lam KP, DiBattista A, Perreault M, Zulyniak MA, Cattrysse B, et al. Serum and adipose tissue amino acid homeostasis in the metabolically healthy obese. *Journal of Proteome Research*. 2014;13(7):3455-66.
58. Ma B, Zhang Q, Wang G-j, A J-y, Wu D, Liu Y, et al. GC-TOF/MS-based metabolomic profiling of estrogen deficiency-induced obesity in ovariectomized rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32(2):270-8.
59. Skoog DA, Holler FJoy, Nieman TAoy. Principles of instrumental analysis: Australia : Thomson, c2007. 6th ed.; 2007.
60. Gündüz T. İnrümentäl analiz: Ankara : Gazi Kitabevi, 2012. Gözden geçirilmiş ve genişletilmiş 11. bs.; 2012.
61. Smith RM. Gas and liquid chromatography in analytical chemistry: Chichester : John Wiley and Sons, c1988.; 1988.
62. Hanai T. HPLC. [electronic resource] ; A practical guide: Cambridge : Royal Society of Chemistry : [distributor] RSC Distribution Services : [distributor] Central Book Services : [distributor] Central Book Services, 1999.; 1999.
63. James AT, Martin AJ. Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *The Biochemical journal*. 1952;50(5):679-90.
64. Golay MJE. Gas chromatographic terms and definitions. *Nature*. 1958;182(4643):1146-7.
65. Dandeneau RD, Zerenner EH. An investigation of glasses for capillary chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1979;2(6):351-6.

66. Thomson JJ. Rays of positive electricity and their application to chemical analyses, by Sir J.J. Thomson: London, New York [etc.] Longmans, Green and Co., 1913.; 1913.
67. Dempster AJ. A new method of positive ray analysis. *Physical Review*. 1918;11(4):316-25.
68. Aston FW. LXXIV. A positive ray spectrograph. *Philosophical Magazine Series 6*. 1919;38(228):707-14.
69. 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.
70. Finnigan R, Hoyt D, Smith D. Special Report: Priority Pollutants. II - Cost effective analysis. *Environmental Science & Technology*. 1979;13(5):534-42.
71. Friedli F. Fused silica capillary GC/MS coupling: A new, innovative approach. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1981;4(10):495-9.
72. Settle F. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*: Yourdon Press; 1997.
73. Jennings W, Stremple P, Mittlefehldt E. *Analytical Gas Chromatography*. Burlington: Academic Press; 1997.
74. McNair HM, Miller JM. *Basic Gas Chromatography*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience; 2009.
75. Grob RL, Barry EF. *Modern Practice of Gas Chromatography*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience; 2004.
76. Eiceman GA. Instrumentation for Gas Chromatography. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. New Mexico State University, Las Cruces, USA: John Wiley & Sons Ltd, Chichester; 2006.
77. Scott RPW. *Principles and Practice of Chromatography*. Scott K, editor 2003.
78. Abian J. The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 1999;34(3):157-68.
79. McReynolds WO. Characterization of some liquid phases. *Journal of Chromatographic Science*. 1970;8(12):685-91.
80. [https://chem.libretexts.org/Textbook\\_Maps/Analytical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Map%3A\\_Analytical\\_Chemistry\\_2.0\\_\(Harvey\)/12\\_Chromatographic\\_and\\_Electrophoretic\\_Methods/12.4%3A\\_Gas\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.4%3A_Gas_Chromatography). [Internet]. [Nisan 2016].
81. Zenkevich I, Makarov A. A new application of mcreynolds constants to the characterization of the chromatographic properties of stationary phases. *Journal of Analytical Chemistry*. 2005;60(9):845-50.
82. <https://www.sepscience.com/Techniques/GC/Articles/831-/GC-Solutions-4-GC-Detectors>. [Internet]. [Mayıs 2016].

83. Edmond de Hoffmann VS. Mass Spectrometry: Principles and Applications. 3rd Edition ed: Wiley; 2007.
84. J. Throck Watson ODS. Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation, Fourth Edition. Fourth Edition ed: John Wiley & Sons, Ltd; 2008.
85. Siuzdak G. Chapter 2 - Mass Analyzers and Ion Detectors. Mass Spectrometry for Biotechnology. San Diego: Academic Press; 1996. p. 32-55.
86. Erdik E. Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler: Gazi Kitabevi; 2015.
87. Technologies A. Mass Selective Detector USA1999.
88. Yavuz O, Ondokuz Mayıs Üniversitesi VFST, Aksoy A, Ondokuz Mayıs Üniversitesi VFST. Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyonu metodu. Solid phase extraction method for sample preparation. 2006;20(3):259.
89. Majors RE. Trends in sample preparation: this month's 'Sample Prep Perspectives' examines results from a survey of chromatography users conducted by LCGC and observes trends in sample preparation for chromatography. Ron Majors compares these results with those from two other surveys. (Sample Prep Perspectives). LC-GC North America. 2002(12):1098.
90. Swartz M, Krull IS. Handbook of analytical validation. [electronic resource]: Boca Raton, Fla. : CRC Press, 2012.; 2012.
91. 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.
92. 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 [
93. United States Pharmacopoeial Convention TNFNUSP. The National Formulary (NF 25): USP XXX: United States Pharmacopoeia. Mack Printing Rockville. 2007.
94. Thompson M, Wood, R. . Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. Pure and Applied Chemistry, . 1995; 67 (4),:649-66.
95. Ferenczi-Fodor K, Végh, Z., Nagy-Turák, A., Renger, B., Zeller, M. . Validation and quality assurance of planar chromatographic procedures in pharmaceutical analysis. Journal of AOAC International. 2001; 84 (4):1265-76.
96. Catrinescu C, Fernandes C, Castilho P, Breen C. Selective methoxylation of  $\alpha$ -pinene to  $\alpha$ -terpinyl methyl ether over  $Al^{3+}$  ion-exchanged clays. Applied Catalysis A: General. 2015;489:171-9.
97. Chen H, Cai Y-B, Zhang W-J, Li W. Short Communication: Methoxylation pathway in biodesulfurization of model organosulfur compounds with Mycobacterium sp. Bioresource Technology. 2009;100:2085-7.

98. 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. Etik Kurul İzni



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 978

17.09.2014

Prof. Dr. Sedef Kır  
Eczacılık Fakültesi  
Analitik Kimya Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi

Sayın Prof. Dr. Kır,

Sorumlu araştırmacısı olduğunuz, GO14 /173 kayıt numaralı “*Down Sendromunun Yüksek Seçicilikte Tanısı İçin Metabolomik Yaklaşımlar*” başlıklı projeye 09.09.2014 tarihinde göndermiş olduğunuz ve projede yapılan taramaları takiben aynı hastaların artık plazmalarında Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrokopisi (GC-MS) ile seçilen metabolitlerin miktar tayini yapılmasına yönelik protokol değişikliği talebi Kurulumuzun 17.09.2014 tarihli toplantısında değerlendirilmiştir. Çalışmanın arşiv materyalinden yapılacağı ve hastalardan alınan onamda belirgin bir değişikliğe gerek olmadığı, önerilen değişikliğin mevcut protokolle uyumlu olması göz önüne alınarak ilgili protokol değişikliği olumlu bulunmuştur.

Çalışmanın bu kısmının GO 14/173 kayıt numaralı etik kurul izni bağlamında yüksek lisans öğrencisi Ece ÖZKAN’ın “*Down Sendromunun Tanısına Yönelik Seçilmiş Metabolitlerin Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrokopisi ile Miktar Tayini*” başlıklı tez çalışmasında kullanılması uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof. Dr. Nurten AKARSU  
Başkan

## EK 2. 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

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

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında İstanbul'da doğdum. Sokullu Mehmet Paşa Lisesi'ni bitirdikten sonra 2005 yılında girdiğim Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi'nden 2009 yılında mezun oldum. 2013 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladım. Halen Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve bir çocuk annesiyim.