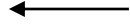


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ TEDAVİSİNDE
KULLANILAN L-ASPARAGİNAZ'IN KROMATOĞRAFİK
YÖNTEMLERLE ANALİZİ**

CEM KAPLAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. DURİŞEHVAR ÖZER ÜNAL**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI



BEYAN



İTHAF

Anneme ve Hocam Prof. Dr. Durişehvar Özer Ünal'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sıdıka Toker'e,

Tez çalışmam sırasında her türlü beni destekleyen Prof. Dr. Ayşegül Gölcü'ye,

Araştırma ve çalışmalarım sırasında bana gerek bilgi ve rehberliğiyle her zaman destekleyen Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan'a

Doktora eğitimim süresince, mesleki açıdan gelişmemde sabırla büyük desteğini gördüğüm, Analitik kimya alanında değerli bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan, tez çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen ve bütün zor durumlarımızda her zaman yanımızda olan Prof. Dr. Durişehvar Özer Ünal'a saygıyla ve minnetle teşekkür ederim.

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen aileme, arkadaşlarıma ve motive olmamamda yardımcı olan Suna D.'ye, desteklerinden dolayı İbrahim Daniş'e Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca TÜBİTAK'a, BİDEB 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Bursu (1649B031800961başvuru numarası) ile beni desteklediği için teşekkürü bir borç bilirim.

Desteklerinden dolayı ayrıca İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje birimine müteşekkirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33803

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XVİİİ
ABSTRACT.....	XİX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. L-AsparjinaZ	3
2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	3
2.1.2. Farmakolojisi	4
2.1.3. Terapötik İlaç Düzeyi İzlenimi (TİDİ).....	5
2.1.4. Yan Etkileri	7
2.1.5. Amino Asitler.....	7
2.1.5.1. Enzimler	9
2.1.6. Sıvı Kromatografisi.....	11
2.1.6.1. Sıvı Kromatografi Sistemleri	11
2.1.6.2. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)	11
2.1.6.3. Çözücü Sistemi.....	15
2.1.6.4. Pompa.....	16
2.1.6.5. Kolon.....	16
2.1.6.6. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS).....	17
2.1.7. Sistem Uygunluk Testi.....	18
2.1.8. Analiz Yöntemleri.....	20
2.1.8.1. HPLC-MS/MS Yöntemi ile Analizler.....	20
2.1.8.2. Diğer Yöntemler ile Analizler.....	20

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler Ve Çözeltiler	23
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	23
3.1.2. Çözeltiler	24
3.1.2.1. Mobil Faz Çözeltisi	24
3.1.2.2. Amino Asit Çözeltileri	26
3.2. Aletler ve Gereçler	29
3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi	31
3.4. Sistem Uygunluk Verileri	33
3.5. Amino Asitlerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (HPLC-MS/MS) ile Analizi	33
3.5.1. Dedektör Parametrelerinin belirlenmesi	33
3.5.2. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	34
3.5.3. Ekstraksiyon Aşamaları	34
3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	36
3.6.1. Spesifiklik ve seçicilik	36
3.6.2. Doğrusallık.....	36
3.6.3. Doğruluk ve Kesinlik	36
3.6.4. Dedeksiyon ve Miktar Tayini Limiti	37
3.6.5. Matriks etkisi.....	38
3.6.6. Validasyon Serisinin Hazırlanması	39
3.7. L-Asparjinaz Aktivitesinin Asparajin ve Glutamin Üzerinde etkisinin incelenmesi	39
4. BULGULAR.....	42
4.1. L-Asparjinaz'ın Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Metod Geliştirme.....	42
4.2. Yöntem Validasyonu	43
4.2.1. Seçicilik.....	43
4.2.2. Doğrusallık.....	44
4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik	50
4.2.4. Dedeksiyon ve Miktar Tayini Limiti	57
4.2.5. Matriks Etkisi	57
4.2.6. L-Asparjinazın, Asparajin ve Substrat İlişkisi	58
5. TARTIŞMA	64

KAYNAKLAR	72
HAM VERİLER	78
FORMLAR	79
ETİK KURUL KARARI	80
PATENT HAKKI İZNİ	81
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	82
EK-1.....	83



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Amino asitlerin pK _a değerleri.	9
Tablo 2-2: HPLC’de kullanılan bazı çözeltiler ve özellikleri.....	15
Tablo 2-3: HPLC’de kullanılan temel kolon çeşitleri.....	16
Tablo 2-4: FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri.....	19
Tablo 3-1:Referans standartlar.....	23
Tablo 3-2: Kimyasallar	23
Tablo 3-3:Gradient akış şeması	25
Tablo 3-4: Kalibrasyon standartlarının hazırlanışı	27
Tablo 3-5: Kalite kontrol numunelerinin hazırlanışı	27
Tablo 3-6: L-glutamin kalibrasyon standartlarının hazırlanışı	28
Tablo 3-7: L- Glutamin için kalite kontrol numunelerinin hazırlanışı	29
Tablo 3-8:Ekipmanlar	29
Tablo 3-9:Destek ekipmanlar.....	30
Tablo 3-10: Amino asitlere ait özel dedektör parametreleri	32
Tablo 3-11: Analizde kullanılan analitler ve iç standart.....	32
Tablo 3-12: Amino asitler için sistem uygunluk parametreleri	33
Tablo 4-1: 1. Validasyon serisinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.....	46
Tablo 4-2: 2. Validasyon serisinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.....	47
Tablo 4-3: 3. Validasyon serisinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.....	47
Tablo 4-4: L-aspartik asit için kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik hesaplamaları	47
Tablo 4-5: L-glutamik asit için kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik hesaplamaları	48
Tablo 4-6: L-asparajin için kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik hesaplamaları	48
Tablo 4-7: L-glutamin için kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik hesaplamaları	49

Tablo 4-8: L-aspartik asitin KK1 1500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları	50
Tablo 4-9: L-aspartik asitin KK2 2500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları	50
Tablo 4-10: L-aspartik asitin KK3 3500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları	51
Tablo 4-11: L-aspartik asitin KK4 4500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları	51
Tablo 4-12: L-glutamik asitin KK1 1500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları	51
Tablo 4-13: L-glutamik asitin KK2 2500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları	52
Tablo 4-14: L-glutamik asitin KK3 3500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları	52
Tablo 4-15: L-glutamik asitin KK4 4500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları	53
Tablo 4-16: L-asparajin KK1 1500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları.....	53
Tablo 4-17: L-asparajin KK2 2500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları.....	54
Tablo 4-18: L-asparajin KK3 3500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları.....	54
Tablo 4-19: L-asparajin KK4 4500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları.....	54
Tablo 4-20: L-glutamin KK1 15 µg/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları.....	55
Tablo 4-21: L-glutamin KK2 25 µg/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları.....	55
Tablo 4-22: L-glutamin KK3 35 µg/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları.....	56
Tablo 4-23: L-glutamin KK4 45 µg/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları.....	56
Tablo 4-24: Matriks etkisinin hesaplanması.....	57

Tablo 4-25: Asparajinin aspartik asite dönüşüm oranları	61
Tablo 4-26: Glutaminin, glutamik asite dönüşüm oranları	63



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: L-Asparjinaz'ın yapısı.....	3
Şekil 2-2: L-Asparjinaz'ın reaksiyon mekanizması.....	4
Şekil 2-3: L-asparajin molekül yapısı	8
Şekil 2-4: L-glutamin molekül yapısı	8
Şekil 2-5: L-aspartik asitin molekül yapısı	8
Şekil 2-6: L-glutamik asitin molekül yapısı	8
Şekil 2-7: Enzim hızı ve substrat konsantrasyonunu gösteren grafik	10
Şekil 2-8: Bir HPLC cihazının şematik gösterimi	11
Şekil 2-9: İki bileşenli bir numuneye ait kromatogramda taban genişliğinin gösterilmesi	13
Şekil 2-10: Laboratuvarında kullanılan bir HPLC sistemi	14
Şekil 4-1: 2000 ng/mL L-asparajin enjeksiyonuna ait örnek kromatogram	42
Şekil 4-2: 20 ng/mL L-glutamin enjeksiyonuna ait örnek kromatogram	42
Şekil 4-3: 2000 ng/mL L-aspartik asit enjeksiyonuna ait örnek kromatogram	43
Şekil 4-4: 2000 ng/mL L-glutamik asit enjeksiyonuna ait örnek kromatogram.....	43
Şekil 4-5: Benzil amin (iç standart) enjeksiyonuna ait örnek kromatogram	43
Şekil 4-6: Boş enjeksiyona ait bir kromatogram (a) ve Amino asitler ile IS kromatogramı (b)	44
Şekil 4-7: L-aspartik asite ait kalibrasyon eğrisi	45
Şekil 4-8: L-glutamik asite ait kalibrasyon eğrisi	45
Şekil 4-9: L-asparajine ait kalibrasyon eğrisi	46
Şekil 4-10: L-glutamine ait kalibrasyon eğrisi	46
Şekil 4-11: 20 µg/mL L-glutamin enjeksiyonuna ait bir kromatogram.....	57
Şekil 4-12: 2000 ng/mL amino asit karışımı enjeksiyonuna ait ayrılmış bir kromatogram.....	58
Şekil 4-13: Enzim ve ilaç eklenmeden L-asparajin kromatogramları, plasma (a), ilaç ile 15 dk reaksiyon sonrası (b), enzim ile 15 dk reaksiyon sonrası (c).....	59
Şekil 4-14: Enzim ve ilaç eklendikten sonra L-aspartik asit kromatogramları, plasma (a), ilaç ile 15 dk reaksiyon sonrası (b), enzim ile 15 dk reaksiyon sonrası (c).....	60
Şekil 4-15: Enzim ve ilaç eklenmeden L-glutamin kromatogramları plasma (a), ilaç ile 15 dk reaksiyon sonrası (b), enzim ile 15 dk reaksiyon sonrası (c).....	61

Şekil 4-16: Enzim ve ilaç eklendikten sonra L-glutamik asit kromatogramları plasma (a), ilaç ile 15 dk reaksiyon sonrası (b), enzim ile 15 dk reaksiyon sonrası (c)..... 62



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACN: Asetonitril

Asn : Asparajin

ASNS: Asparjin sentetazı

Asp: Aspartik asit

AS1: Ana stok 1

AS2: Ana stok 2

C: Konsantrasyon

CE-MS: Capillary electrophoresis (kapiler elektroforez-MS)

Cmaks: Tek bir dozajdan sonraki maksimal plazma

%CV: Coefficient of variation (Varyasyon katsayısı)

DAD: Fotodiyot array

Dk: Dakika

EAA: Eğri altında kalan alan

EMA: Avrupa İlaç Ajansı

ES: Enzim-subsrat

FDA: Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)

FL: floresans

Fmoc: 9-fluorenilmetiloksikarbonil

G: L-glutamin (çözelti hazırlamada)

g: Gram

Gln: Glutamin

Glu: Glutamik asit

HILIC: Hidrofilik etkileşim kromatografisi

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

H: Tabaka yüksekliği

HCl: Hidroklorik asit

HFBA: Heptaflorobütirik asit

HPLC/MS/MS: High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi)

IARC : International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı)

ICH: International Conference on Harmonisation (Uluslararası Harmonizasyon Konferansı)

k': Alıkonma faktörü

KD: Kolonda dağılım sabiti

KK: Kalite kontrol

KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

KRŞ: Karışım

L: Kolon dolgu maddesinin uzunluğu

L-ASPZ: L- asparajinaz

LC/MS/MS: Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (Sıvı Kromatografisi–Tandem Kütle Spektrometrisi)

LD: Limit dışı değerler

LOD : Teşhis sınırı

LOQ : Tayin sınırı

ME: Matriks etkisi

mg: Miligram

MeOH: Metanol

mL: Mililitre

mM: Milimolar

MS: Kütle spektrometrisi

N: Teorik tabaka sayısı

NAC: N-asetil-sistein

NaOH: Sodyum Hidroksit

ng: Nanogram

nm: Nanometre

OPA : Orto fitalaldehit

PFPA: Pentafloropropionik asit

Rs: Rezolüsyon

RSD: Bağlı standart sapma

SD: Standart sapma

ST: Standart

SuSa: Sülfosalisilik asit

TİDİ : Terapötik İlaç Düzeyi İzlenimi

TFA: Trifloroasetik asit

t_{maks} : Damar dışı uygulamadan sonra kan veya plazma konsantrasyonunun doruğa erişmesi için geçen süre

TMS: Tetrametil silan

μ g: Mikrogram

μ L: Mikrolitre

UPLC/MS-MS: Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi)

UV: Ultraviyole

V: Hacim

Simgeler

α : Seçicilik faktörü



ÖZET

Kaplan, C. (2021). Akut Lenfoblastik Lösemi Tedavisinde Kullanılan L-Asparjinaz'ın Kromatografik Yöntemlerle Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul. 2021

L-asparjinaz (L-ASPZ) akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde 1961 yılından itibaren kullanılan kemoterapötiktir. ALL tedavisinde ilaç olarak kullanılan bir enzimdir. ALL'deki etkisini L-Asparajinin (L-Asn) plazmada düzeyini düşürerek gerçekleştirir. Bu tez çalışmasında kromatografik yöntemlerle asparajin (Asn), glutamin (Gln), aspartik asit (Asp) ve glutamik asit (Glu) düzeylerinin yanı sıra, tedavide L-asparajinazın aktivitesi üzerine çalışılmıştır.

Asparjinaz, asparajini, aspartik asit ve amonyağı indirgeyerek tümör hücrelerini asparajinden yoksun bırakır. L-Asparjinazla yüklenen tümör hücresi besinsiz kalır ve çoğalamaz. L-asparjinazın hangi dozda, hangi türünün, kime faydalı veya zararlı olduğunu anlamamız için terapötik ilaç izlenimi önem kazanmaktadır. Böylece hem etkili doz bulunacak hem de tedavi süresinin kısaltılması katkı sağlayacaktır. İmmunoassay yöntemlerindeki çapraz reaksiyonlar ve spektrofotometrik yöntemlerdeki girişimler nedeniyle güvenilirlik ve hassasiyet sorunları ile karşılaşılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, L-ASPZ'nin aktivitesi için plazmada dört farklı amino asit tayini, yüksek performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrofotometrisi (HPLC-MS/MS) yöntemi ile geliştirilmiştir. Yöntem HILIC kolonda; asetonitril ve amonyum asetat çözeltisi hareketli fazı ile gradient olarak 0.4 mL/dk akış hızında geliştirilmiştir. Amino asitlerin doğrusal aralığı Asn, Asp ve Glu için sırasıyla 500-5000 ng/mL, Gln için 5-50 µg/mL olarak bulunmuştur. Gözlenebilme (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) ise Asn, Asp ve Glu için sırasıyla 100-500 ng/mL, Gln için 1-5 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntem valide edilerek plazmada analizlere başarıyla uygulanmıştır. Bu yöntem seçici ve tekrarlanabilir, plazma analizlerinde güvenle kullanılabilir niteliktedir.

Anahtar Kelimeler : L-Asparjinaz, akut lenfoblastik lösemi (ALL) amino asit analizi, kütle spektrometrisi, terapötik ilaç izlenimi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33803

TÜBİTAK 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir (1649B031800961başvuru numarası).

ABSTRACT

Kaplan, C. (2021). Analysis of L-Asparaginase which is used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia with chromatographic methods. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Doctoral Thesis. İstanbul. 2021

L-asparaginase (L-ASPZ) is chemotherapeutic used since 1961 in treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). It is an enzyme used as medicine in treatment of ALL. It performs its effect in ALL by reducing level of L-Asparagine (L-Asn) in plasma. In thesis, asparagine(Asn), glutamine (Gln), aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu) levels as well as the activity of L-asparaginase in treatment were studied by chromatographic methods.

Asparaginase degrades asparagine to aspartic acid and ammonia, depriving tumor cells of asparagine. Tumor cell loaded with L-Asparaginase lacks nutrients and can't proliferate. TDM becomes important for us to understand at what dose, type, and who is beneficial or harmful to L-asparaginase. Thus, both effective dose will be found and the shortening of treatment period will contribute. Reliability and sensitivity problems are encountered due to cross reactions in immunoassay methods and interventions in spectrophotometric methods.

Determination amino acids in plasma for activity of L-ASPZ was developed by HPLC-MS/MS method. Method was developed with HILIC column and as a mobile phase gradient acetonitrile and ammonium acetate solution used at 0.4 mL/min flow. Linear range of amino acids was found to be 500-5000 ng/mL for Asn, Asp and Glu, and 5-50 µg/mL for Gln, respectively. LOD, LOQ were found as 100-500 ng/mL for Asn, Asp and Glu, and 1-5 µg/mL for Gln, respectively. Method has been validated and successfully applied to plasma analyzes. Method is selective, reproducible and can be used safely in plasma analysis.

Key Words: L-Asparaginase, acute lymphoblastic leukemia (ALL), aminoacid analysis, mass spectrometry, therapeutic drug monitoring

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: 33803

Supported by TÜBİTAK 2211-C Domestic Priority Fields Doctorate Scholarship Program (1649B031800961 application number).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

L-asparjinaz (L-ASPZ) akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde 1961 yılından itibaren kullanılan kemoterapötiktir. L-Asparjinaz (L-ASPZ), ALL tedavisinde ilaç olarak kullanılan, E. Coli ve Erwinia chrysanthemi kültürlerinden hazırlanan bir enzimdir. ALL'deki etkisini L-Asparajinin (L-ASN) plazmada düzeyini düşürerek gerçekleştirir. L-Asparjinaz ile doymuşlaşan tümör hücresi besinsiz kalır ve çoğalamaz. L-ASPZ aktivitesinin ve L-ASP düzeyinin tedavide izlenmesi önemlidir. En yaygın yöntem, mikropate hazırlanarak immunoassay tekniği ile L-ASPZ aktivitesinin ölçüldüğü tekniktir (1).

Aminoasitler için kromatografik bir yöntem geliştirmek farklı L-asparjinaz türlerinin tepkileri göz önünde bulundurulduğunda terapötik ilaç izlenimi klinik olarak gereklidir. Asparajine bağlı protein sentezi, bu enzim tarafından inhibe edilir. Asparjinaz, asparajini , aspartik asit ve amonyağı indirgeyerek tümör hücrelerini asparajinden yoksun bırakır.

L-Asparjinaz'ın (L-ASPZ) lenfomalarda büyümeyi engellediği ve antilösemik olduğu ispatlanmıştır (2). Anti lösemik etkisi nedeniyle L-ASPZ çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde vinkristin (VCR) ve prednizon (PRED) ile başlama tedavisinin standart bileşeni olarak kullanılmakta ve tedavi başarısını önemli oranda artırır. ALL tedavisinde 35 yıldır kullanılmasına rağmen, L-ASPZ'nin en üst düzeyde etkisini sağlamanın ve alerjik reaksiyonlarını en aza indirmenin yolu bilinmemektedir. Yan etkisi daha az olan ancak etkinliği benzer tedaviler geliştirilinceye kadar, ALL tedavisinde ilk ilaç olmaya devam edecektir. İlaça bağlı ürtiker, anafaksi, serum hastalığı gibi aşırı duyarlılık reaksiyonları sık olarak (%20-40) görülmektedir.

ALL tedavisinde etkin olarak kullanılan ilaçlarından biri olan L-asparjinazın vücutta uygun şekilde işlevini sürdürdüğünün belirlenmesi bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Çalışma sonucunda tedavinin etkinliğini belirleyen L-asparajin, L-glutamin, L-glutamik asit ve aspartik asit düzeylerini belirlemek için valide ve etkili bir amino asit analiz yöntemi geliştirilecektir. Geliştirilen yöntem ile ilacın etkililiği belirlenmiş olacaktır. Oldukça pahalı olan bu ilacın daha etkin kullanımı sağlanarak ekonomiye pozitif katkısı olacağı düşünülmektedir.

L-asparjinaz vücutta bulunan asparajini, aspartik asit ve amonyağa dönüştürür. Bu şekilde tümör hücresi için gerekli olan asparajinden yoksun kalır. Bazı durumlarda asparajin yerine glutamini de kullanılabilir.

Lösemi tedavisinde kullanılan L-asparjinaz enziminin tamamıyla çalışıp çalışmadığının belirlenmesi tedavinin etkililiği için önemlidir. Bu konuda L-asparjinaz aktivitesinin belirlenmesi ve L-asparjinaz düzeyinin belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır (3,4,5). İmmunoassay yöntemlerde çapraz reaksiyonlar ve spektrofotometrik yöntemlerde girişimler nedeniyle güvenilir ve doğru sonuçları verememektedir.

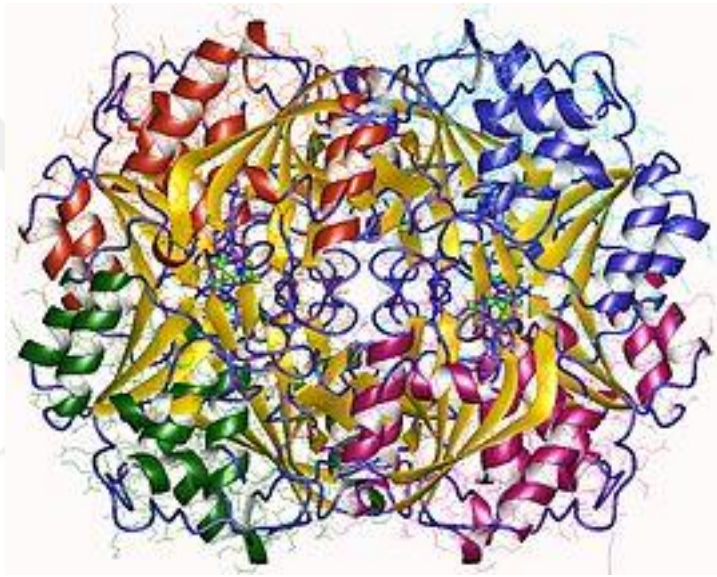
Bu tez çalışmasında, L-asparjinaz'ın etkinliğinin belirlenmesi için, enzimin substratları olan L-asparajin ve L-glutamin ile ürün olan aspartik asit ve glutamik asit düzeylerinin plazmada belirleyerek L-asparjinazın etkinliği ve dolayısı ile tedavinin etkinliği anlaşılmış olacaktır. L-asparjinaz tedavisinden sonra yapılan plazma analizlerinde tedavi sonucunda L-asparajin ve L-glutamin düzeyleri düşük, L-glutamik asit ve aspartik asit düzeyleri yüksek olarak bulunacaktır. Bu yolla etkin tedavi doz oranı ve aralığı ile L-asparjinaza karşı oluşturulan vücut direnci de anlaşılmış olacaktır. Bu amaçla, L-asparajin, L-glutamin, aspartik asit ve glutamik asit düzeylerinin plazmadan analizleri için etkin, hassas, seçici bir HPLC-MS/MS yöntemi geliştirilerek valide edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. L-Asparjinaz

2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

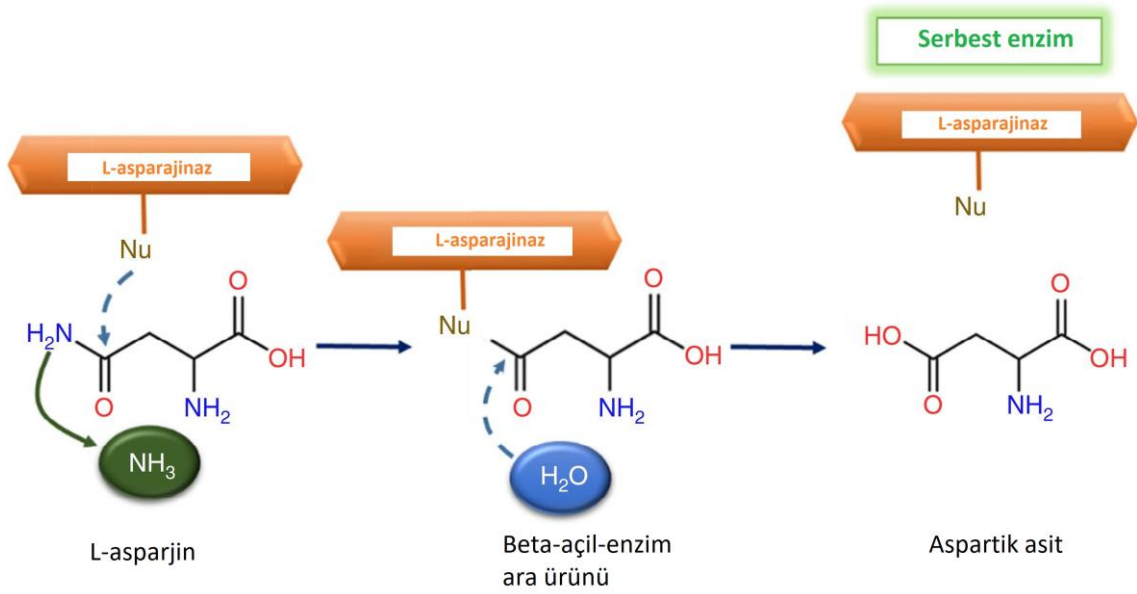
L-ASPZ'ın kimyasal adı 'E. coli L-asparagine amidohydrolase'dır. Kapalı formülü $C_{1377}H_{2208}N_{382}O_{442}S_{17}$ olan L-ASPZ'ın molekül ağırlığı 31731.9 g/mol $g \cdot mol^{-1}$ 'dir (Şekil 2-1). L-ASPZ suda çözünen beyaz kristal toz halinde bir enzimdir. Kaynama noktası 760 mmHg'da 204.5 ± 23.0 °C'dir.



Şekil 2-1: L-Asparjinaz'ın yapısı

Amino asit kimyasının tarihi 1806 yılında iki Fransız araştırmacı Vauquelin ve Robiquet, kuşkonmaz bitki suyundan izole edilmiş asparajin elde edince başladı. 1950 yılında ilk amino asit sentezlendi. Adolph Strecker alanini asetaldehitten sentezledi. 1925 yılına kadar proteinlerde bulunan 20 amino asidin tamamı tanımlanmamıştır. Asparajin ve glutamin amin değil amittir, yan zincir terminal grupları $-CONH_2$ ve yalnızca $-CH_2$ grubuyla farklılık gösterir. Oldukça polardırlar ve hidrojen bağları sayesinde su molekülleri ile oldukça güçlü bir şekilde etkileşime girerler. Aspartik ve glutamik asit genel amino asitler arasında elektronca en zengin olanlardır (6).

E. Coli ve Erwinia chrysanthemi kültürlerinden hazırlanan bir enzimdir. Asparajine bağlı protein sentezi, bu enzim tarafından inhibe edilir. Asparjinazın görevi asparajini , aspartik asit ve amonyağı indirgemek suretiyle tümör hücrelerini asparajinden yoksun bırakmaktır (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: L-Asparajinaz'ın reaksiyon mekanizması

2.1.2. Farmakolojisi

L-Asparajinaz vücudumuzda bulunan tümörlü hücrelerin yaşaması için gerekli aminoasitlerden L-Asparajini'i azaltarak tümöre karşı savaşır. Asparajinaz molekülü oldukça kompleks ve molekül ağırlığı yüksek olduğundan antijenik etki gösterir ve bazı insanlara karşı aşırı duyarlılık gösterebilir. Asparajinaz mide-bağırsak tarafından emilmez, direkt olarak damardan uygulanır. Plazma seviyeleri doza bağlı değişmekle birlikte, plazma yarı ömrü 8 ila 30 saat arasında değişmektedir ve doz, yaş, vücut yüzey alanı, cinsiyet böbrek ve karaciğer fonksiyonları ve hastalığın yaygınlığı ile alakalıdır. Arka arkaya 6 gün süre ile günde 200 IU/kg dozda damardan L-Asparajinaz uygulanan lenfomalı hastalarda serum seviyeleri 4. günde en yüksek düzeye ulaşır ve 12. güne kadar kademeli olarak azalır. Verilen dozun % 20'si lenfatik sisteme geçer. Beyin-omurilik sıvısında, plazmadakinin % 1'inden daha az oranda bulunur. İdrarda çok az miktarda bulunabilir. İntravenöz asparajinaz uygulamasını takiben eğer direnç gelişmezse, kan asparajin konsantrasyonları hemen ölçülemeyecek kadar düşük düzeylere iner ve tedavi devam ettiği sürece ölçülemez düzeyde kalır. Asparajin, tedavinin sonlandırılmasıyla 12 –33 günde tekrar plazmada gözlemlenebilir (7).

2.1.3. Terapötik İlaç Düzeyi İzlenimi (TİDİ)

Geçmiş yıllardan bu yana yeni ilaç geliştirilmesinin amacı terapötik etkisi yüksek olan, buna karşın yan ve/veya toksik etkileri olmayan veya en az olan ilaç tedavilerini kliniğe sokmak olmuştur. İlaçların gerek terapötik gerek yan etkilerinin ilacın miktarı ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. Çoğu ilaç için araştırmalara dayanılarak elde edilen standart doz uygulaması genelde bir sorun oluşturmaz. Buna karşın bakteriyel enfeksiyonlar, kalp rahatsızlıkları, epilepsi, astım, KOAH, immün supresyonun gerektiği durumlar veya psikiyatrik hastalıklarda kullanılan ilaçlar için ise çok daha karmaşık ve kesin doz belirlenmesi gerekmektedir. Bu yönüyle TİDİ hastanın klinik izlemi bakımından çok önemli bir yerdedir. Genel manada, tedavi sırasında erişilen plato konsantrasyonu hakkında bilgi edinmek ve ilaç konsantrasyonunun yeterli düzeye çıkıp-çıkmadığını kontrol ederek tedavi etkinliğini artırmak veya toksisiteyi önlemek amacıyla vücut sıvılarında bulunan ilaç düzeylerinin ölçülmesine Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi (Therapeutic Drug Monitoring) adı verilmektedir. İlaçların atılım ve/veya metabolizmasını etkileyen değişkenlere bağlı olmak üzere dolaşımdaki ilaç konsantrasyonunun ve buna bağlı olarak ilaç etkisinin farklılık gösterdiği bilinmektedir. Bu değişkenlerle ilişkili olarak özellikle bazı ilaçlar veya ilaç grupları için dolaşımdaki ilaç düzeyinin yakından izlenmesi hastanın klinik takibi açısından bir zorunluluktur. Eğer takip yapılmazsa organ yetersizliğinden ölüme, aritmilere, kardiyak rahatsızlıklardan, epilepsi nöbetlerinden organ reddine kadar oldukça ciddi rahatsızlıklara sebebiyet verebilir. TİDİ terapötik cevabın derecesini değerlendirmek veya olası toksik ve yan etkileri engellemenin yanında, ilaç tedavisinin uygunluğu hakkında bilgi edinmek, ilaç etkileşimleri ve yan etkileri ortaya koymak bakımından da etkin bir şekilde klinik izlemde kullanılmakta ve laboratuvarlar arasında giderek artan bir öneme sahip olmaktadır. Araştırmalarda ilaç düzeylerinin analizi ilk olarak 1950’li yılların sonlarında yapılmaya başlanmıştır. Bu yıllardaki ölçümler rutin klinik servislere hizmet etmekten daha çok, araştırma maksadıyla yapılmıştır (8).

Terapötik ilaç izlenimi sonucu, ilaçtan minimum toksisiteyle en uygun cevabın alınabilmesi hedeflenmektedir. İlaç tedavisi izlemi sadece hastanın ilaç kan konsantrasyonunu ölçerek, olması gereken konsantrasyon aralığı ile kıyaslamak olarak düşünülmemelidir. İlacın kan konsantrasyonu ölçümünü uygun bir biçimde değerlendirebilmek için ilacın kararlı duruma ulaşmış ulaşmadığı, örnek alma zamanı, ilacın son dozunun verildiği zaman, yakında atlanmış doz olup olmadığı, intravenöz

verilen ilaçlar için ilacın infüzyon süresi gibi bilgilere ihtiyaç vardır. Ayrıca, dar terapötik aralıklı ilaç izlemi bilinçli olarak yapıldığında, gereksiz ve hatalı kan örneği almanın önlenmesi suretiyle, tedavi masraflarındaki artış da azaltılmaktadır.

Asparjinaz, akut lenfoblastik lösemnin (ALL) tedavisi için kemoterapötik tedavilerde yaygın olarak kullanılmaktadır ve özellikle çocuklarda tedavi oranlarında önemli bir iyileşmeye yol açmıştır.

Normal hücrelerde, aspartik asit ve glutaminden L-Asparajin sentezleyen asparajin sentetaz bulunur. Lösemik hücrelerde bu enzim eksik olduğundan, hücre için gerekli bu esansiyel aminoasit üretilemez. L-Asparjinazla yüklenen tümör hücresi besinsiz kalır ve çoğalamaz. Bu yüzden L-asparjinazın miktar tayini önem kazanmaktadır. L-asparjinaz dozu kişinin kilosu, yaşı ve benzeri parametreler ile değişkenlik göstermektedir. Dozu fazla veya az vermek ise tedavinin sağlıklı sonuç vermesini engelleyebilir. Ayrıca ilacın farklı kaynaklardan elde edilmesi kişide alerji gibi yan etkileri olabilir. Bu sebeplerden ötürü hem doğru dozlama hem de doğru kaynak kullanmak tedavinin hızlanmasına ve hastanın en az yan etkiye maruz kalmasını sağlayacaktır.

Yapılan araştırmalarda L-ASPZ'nin üç farklı kaynaktan elde edilmekte ve tedavi de kullanıldığı ortaya çıkmaktadır. E.Coli, Ervinia Carotovora ve E. Coli den elde edilen L-ASPZ'nin polietilen glikol ile bağlanmasıyla oluşan PEG L-ASPZ türleri kullanılmaktadır. Tekrarlı doz alımlarında enzim aktivitesinin azalması durumlarında farklı tür L-ASPZ kullanılarak tedaviye devam edilmektedir.

İlk verilen türdeki L-asparjinaz vücutta tanındıktan sonra artık işlevsiz hale geleceğinden, tedavi süresince ikinci L-asparjinaz türüne geçilebilir. L-asparjinaz vücut dışı bir enzim olarak tanımlanacağından immünolojik reaksiyon olacaktır. Bu yüzden diğer L-asparjinaz kaynaklarından tedavi devam edebilir. L-asparjinazın hangi dozda, hangi türünün, kime faydalı veya zararlı olduğunu anlamamız için terapötik ilaç izlenimi önem kazanmaktadır. Bu sayede hem etkili doz bulunacak hem de tedavi süresinin kısaltılması planlanmaktadır.

Asparjinaz aktivitesini ve daha sonra asparajin tükenmesini etkileyen birçok faktörün daha iyi anlaşılması, doktorların tedaviyi kişiye göre uyarlamasına, terapötik etkiyi en üst düzeye çıkarmasına ve tedaviyle ilişkili toksisiteyi en aza indirmesine izin verebilir. Terapötik ilaç izlenimi hastanın mevcut tükenme durumunu değerlendirmek

için bir yol sağlar ve tedavi ayarlamalarının potansiyel faydasını daha iyi değerlendirmek için kullanılabilir.

Asparajin tükenmesi L-ASPZ tedavisinin farmakolojik hedefi olarak kabul edilirken, tüm hastalar için evrensel olarak kabul edilen bir doz veya tedavi programı yoktur. Asparajin seviyeleri bireyler arasında büyük farklılıklar gösterir, L-ASPZ dozu ve serum asparajin konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi etkileyen çeşitli faktörler vardır (9). Asparjinaz tedavisinin tedavi yoğunluğunu ve süresini optimize etmek potansiyel olarak sonuçlarda daha fazla iyileşme ile sonuçlanacaktır. Asparajin miktarının tayini ile L-asparjinazın tedavi edici dozu veya süresi saptanabilir. Karakterizasyon ve kromatografik analizler ile hastaların iyileştirme süreleri ve vücuduna kemoterapiyle daha fazla zarar vermeden daha iyi koşullarda iyileşmesine pozitif yönde katkı sağlayabilir.

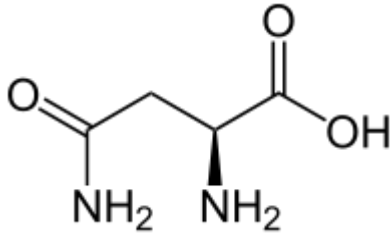
2.1.4. Yan Etkileri

L-Asparjinaz farklı farklı yan etkilere sebep olabilir. En başta yaşamı tehdit edici allerjik reaksiyonlar gelmektedir. Ayrıca karaciğer fonksiyonlarında bozulma, pankreatit, tromboz gelişimi, serebral disfonksiyon, parotitis ve immün fonksiyon bozukluğu, L-ASPZ'a bağlı olarak gelişebilecek diğer yan etkiler arasındadır. L-asparjinaz'ın ülkemizde halen bulunan ve bölümümüzde kullanılan tipi E. coli'den üretilen tür olup, çok şiddetli allerjik reaksiyonlara yol açabilir. Şiddetli allerjik reaksiyon gelişen vakalarda farklı bir preparat 'Erwinia L-asparjinaz' veya doz ve aralığını değiştirilmek şartı ile PEG-asparajinaz tavsiye edilmektedir (10).

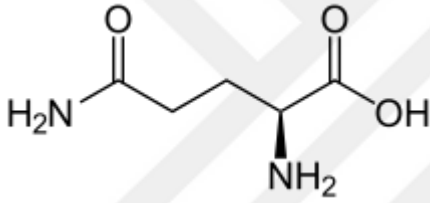
2.1.5. Amino Asitler

Proteinleri oluşturan esas yapı taşları aminoasitlerdir. Kimyada bir amino asit hem "amin" hem de "karboksil" içeren bir moleküldür. Aminoasitlerin ard arda eklenmesiyle ortaya çıkan kısa polimer zincirler "peptid", uzun zincirler ise "polipeptid" veya protein olarak isimlendirilir. Hücre içerisinde ribozomlar, mRNA moleküllerini kalıp olarak kullanarak aminositleri uç uca ekleyerek proteinleri sentezlerler. Bu olaya translasyon (çeviri) denir. Amino asitlerin tamamının aynı zamanda bir proteinin yapıtaşında bulunması gerekmez. Ayrıca hepsi aynı miktarda da değildir. Glutamin plazmada en fazla bulunan amino asittir. Proteinlerin yapısında daha farklı amino asitler de olabilir. İnsanlarda amino asitler, 20 temel amino asitle oluşmuş polipeptidlerin daha sonra "farklılaşmaları" ile oluşur. Protein sentezi işleminin genel

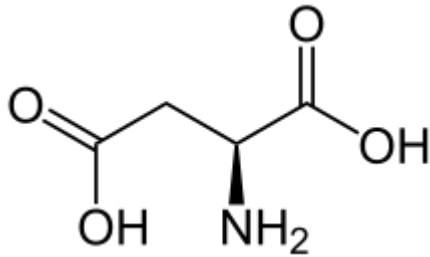
hata oranı 10–4 civarındadır (her 10000 amino asitten biri yanlış yerleştirilir). Bazı antibiyotikler doğrudan, bazı kanser ilaçları ise dolaylı olarak protein sentezine müdahale ederek etki gösterirler” (11). Amino asitlerin yapıları Şekil 2-3, 2-4, 2-5, 2-6’da, asitlik sabitleri Tablo 2-1’de verilmiştir.



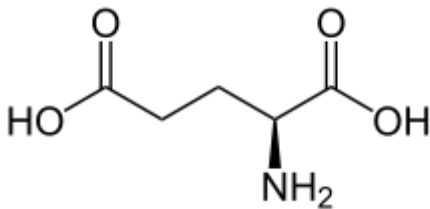
Şekil 2-3: L-asparajin molekül yapısı



Şekil 2-4: L-glutamin molekül yapısı



Şekil 2-5: L-aspartik asitin molekül yapısı



Şekil 2-6: L-glutamik asitin molekül yapısı

Tablo 2-1: Amino asitlerin pK_a değerleri.

Amino asit	pK _{a1}	pK _{a2}
L-asparajin	2.02	8.80
L-glutamin	2.17	9.13
L-aspartik asit	1.88	9.60
L-glutamik asit	2.19	9.67

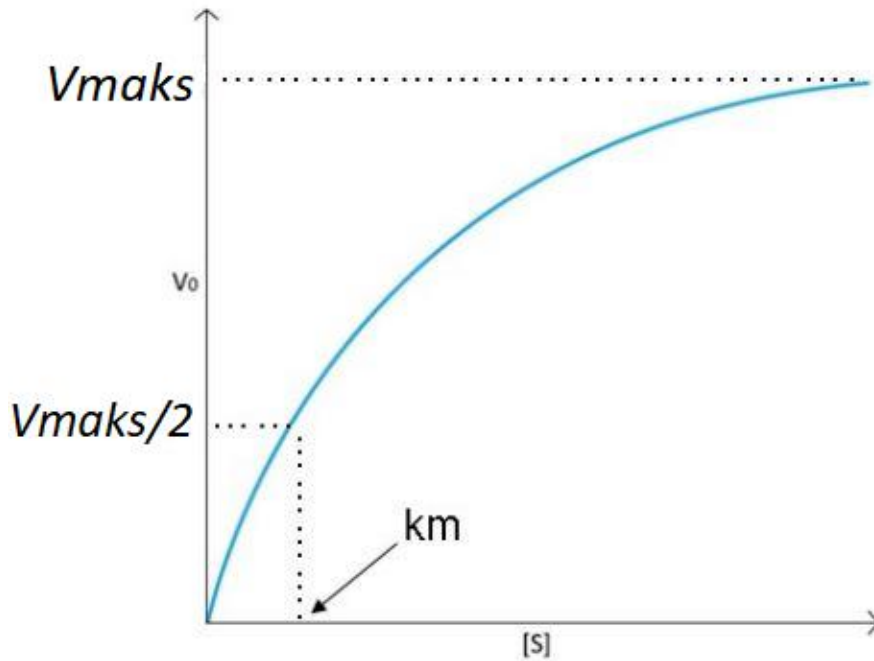
2.1.5.1. Enzimler

Enzimler, biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleridirler; biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan kimyasal ajanlardır. Biyolojik katalizörler olarak da adlandırılan enzimler, besleyici moleküllerin yıkıldığı, kimyasal enerjinin depolandığı ve şeklinin değiştirildiği, basit prekürsörlerden biyolojik makromoleküllerin üretildiği metabolik yollarda yüzlerce reaksiyon basamağını katalize ederler. Enzimlerle katalize edilen tepkimeye katılan kimyasal moleküllere substrat denir. Enzimler belirli kimyasal reaksiyonları hızlandırırlar; substratları için yüksek derecede spesifiteye sahiptirler; sulu çözeltilerde çok ılımlı sıcaklık ve pH durumları altında işlevseldirler. Metabolizmaya katılan birçok enzimin bazıları düzenleyici enzimlerdir. Enzim sistemleri, düzenleyici enzimlerin etkisi aracılığıyla, yaşamı sürdürmek için gerekli birçok farklı metabolik aktivite arasında uyumlu bir etkileşim oluşturmak üzere ayarlanır. Düzenleyici enzimler, çeşitli metabolik sinyallere katalitik aktivitelerini gerektiği şekilde değiştirerek cevap verirler.

Enzim konsantrasyonu ve diğer bütün koşulların stabil olduğu bir ortamda oldukça küçük bir substrat konsantrasyonunda, enzim moleküllerinin çoğu serbest kalır, Enzim-substrat (ES) yapısı az miktarda oluşur ve dolayısıyla ürüne dönüşen substrat miktarı veya reaksiyonun hızı düşüktür. Substrat konsantrasyonunun belirli artışları ile enzim moleküllerinin yarısının serbest kalıp yarısının ES kompleksi oluşturduğu yarı maksimal hız ($1/2 V_{maks}$) noktasına varılır. Substrat konsantrasyonunun belirli artışlarının devamında enzim moleküllerinin hepsinin ES kompleksi oluşturduğu bir

noktada reaksiyon hızı maksimumdur (V_{maks}) ve bu noktadan sonra substrat konsantrasyonunun artışı ile reaksiyon hızı artık yükselmez. Enzim konsantrasyonu ve diğer koşulların sabit olduğu bir ortamda enzimatik reaksiyonun hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterir; fakat substrat ilave edildikçe hız giderek daha az oranda artar ve belirli bir V_{maks} seviyesinde stabil kalır. V_{maks} noktasındaki substrat derişimini enzimi doyuran ve bunun üzerinde her hangi bir değer olabileceğinden bunun ölçülmesi deneysel olarak zordur. Buna karşılık enzimatik bir reaksiyonda enzim moleküllerinin yarısının substrata doyduğu ve böylece yarı maksimal hızın ($1/2 V_{maks}$) incelendiği noktadaki substrat konsantrasyonu ölçülebilir (Şekil 2-7). Bir enzimatik tepkimede enzim moleküllerinin yarısının substrata doyduğu ve böylece yarı maksimal hızın bakıldığı noktadaki substrat konsantrasyonuna “Michaelis-Menten sabiti” denir ve K_m kısaltılmış halidir. Bir enzim için K_m (Michaelis-Menten sabiti), enzim ile verilen substratın karşılıklı etkileşimlerini karakterize eden bir sabit sayıdır; enzim derişiminden bağımsız bir değerdir; maksimum hızın yarısına erişildiği zamandaki substrat konsantrasyonunun ifadesidir (12).

Enzimatik bir reaksiyon için V_0 , V_{maks} , K_m ve $[S]$ arasındaki ilişki, “Michaelis-Menten denklemi (Denklem (2-1))” denen eşitlikle ifade edilir:



Şekil 2-7: Enzim hızı ve substrat konsantrasyonunu gösteren grafik

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2-1)$$

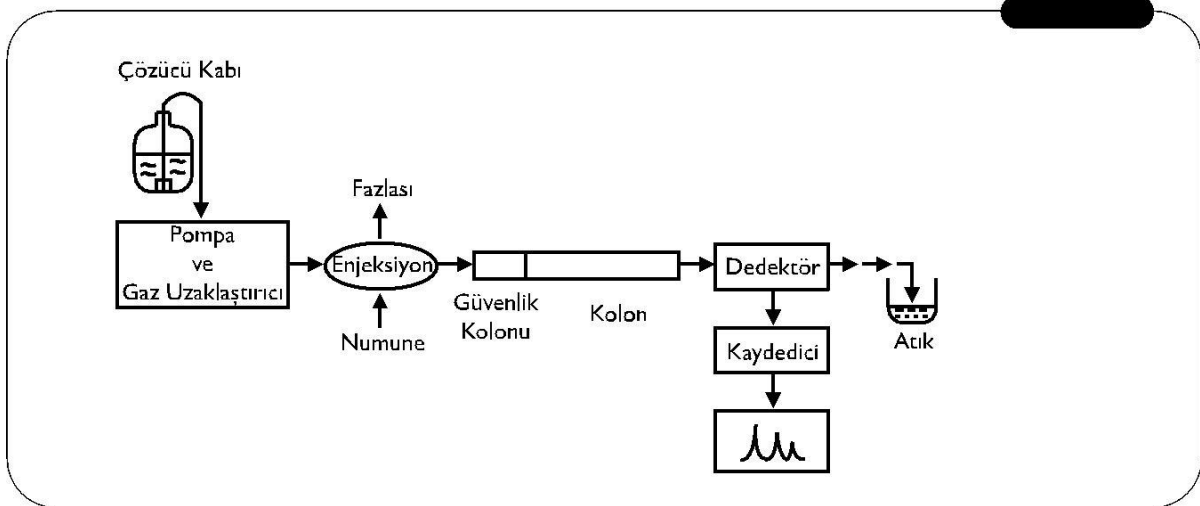
2.1.6. Sıvı Kromatografisi

2.1.6.1. Sıvı Kromatografi Sistemleri

Laboratuvarlarda kullanılan birçok farklı model sıvı kromatografi sistemi mevcuttur. Burada yüksek performanslı sıvı kromatografisinin genel yapısı verilecektir.

2.1.6.2. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bir HPLC cihazına ait başlıca bileşenler (Şekil 2-8)'de basit haliyle gösterilmiştir. (Şekil 2-10)'da ise laboratuvarlarda kullanılan bir HPLC sistemine ait resim verilmiştir.



Şekil 2-8: Bir HPLC cihazının şematik gösterimi

Sıvı kromatografisinde; genellikle çok küçük tanecikleri içeren kolonların kullanımıyla tabaka sayıları iyileştirilmiş ve kolona basınç uygulanarak akış hızı artırılmış olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazları kullanılmaktadır. HPLC, sağladığı yüksek doğruluk, kesinlik ve hassaslığı ayrıca uçuğu

olmayan türler için de kullanılabilmesi nedeniyle en çok tercih edilen enstrümental kromatografi türüdür.

Bilindiği gibi kromatografi tekniğinde kullanılan yöntem ne olursa olsun türler, kolonda dağılma sabiti (KD) değerlerine bağlı olarak ilerler ve kolonu belli bir sıra ile terk ederler. Modern aletli tekniklerinde, kolondan çıkan her bir tür, uygun bir dedektörün kullanılmasıyla bir sinyal olarak algılanır ve zamana veya hareketli fazın hacmine göre bir kromatogram şeklinde gösterilir. (Şekil 2-9)'da, iki bileşenli bir örneğe ait bir kromatogram görülmektedir.

(Şekil 2-9)'da görülen t_0 değeri, kolonda hiç tutulmayan bir türe ait alıkonma zamanıdır. Yani t_0 için, hareketli fazın enjeksiyon kısmından başlayıp detektöre ulaşması için geçen zaman da diyebiliriz. t_{R1} ve t_{R2} ise sırasıyla kolondan ilk çıkan ve ikinci çıkan türlere ait alıkonma zamanlarıdır. Alıkonma zamanı; analitlerin türü, sabit fazın türü, hareketli fazın türü, akış hızı ve kolon uzunluğu faktörlerine bağlı olarak değişebilir. Kolonda ilerleyen bileşenlerin göç hızlarıyla ilgili olarak kromatografide sıkça kullanılan bir parametre alıkonma veya kapasite faktörüdür. Alıkonma faktörü, k' ile gösterilir ve aşağıdaki Denklemden (2-2) verildiği gibi bulunur:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2-2)$$

Alıkonma faktörünün 2'den küçük olması elüsyonun çok hızlı olduğunun, 10'dan büyük olması ise elüsyonun çok yavaş olduğunun göstergesidir. Her iki durumda kromatografik olarak sakıncalıdır. Bu nedenle ideal bir ayırmada çözünen türlere ait k' değerlerinin 2 ile 10 arasında olması istenir. Bir kolondaki türlerin göç hızlarının bağıl bir ifadesi olan seçicilik faktörü (α) ise aşağıdaki formüle göre hesaplanır Denklem (2-3):

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (2-3)$$

Bir kromatografik kolonun verimliliğinin göstergesi elde edilen kromatogramdaki piklerin keskinliğidir. Kolona enjeksiyon yapılması ile türler kolonda

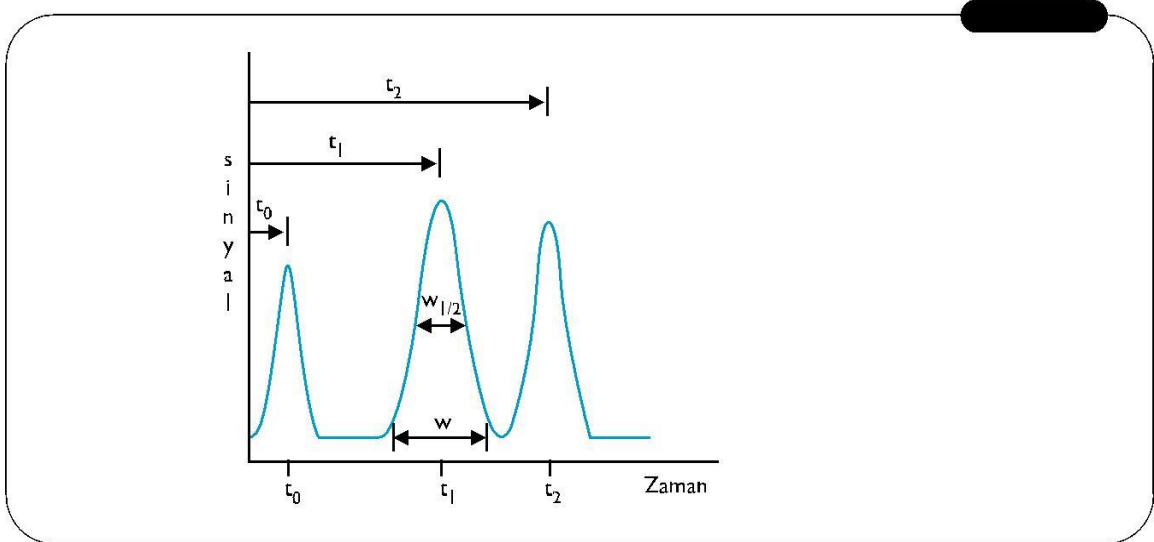
ilerlerken kolonun sonuna doğru, türlere ait bantlarda genişleme olduğu görülür. Bu duruma; boyuna difüzyon ve fazlar arası kütle aktarımları gibi bazı kinetik olaylar neden olmaktadır. Kolon verimliliği kuramsal tabaka sayısı (N) adı verilen bir nicelik ile ölçülür (Denklem (2-4)):

$$N = 16x \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2-4)$$

Bu eşitliklerde yer alan w , Şekil 2-8'den de görüleceği gibi bir pike ait taban genişliği, t_R ise aynı pikin elde edildiği alıkonma zamanıdır. Kolon verimliliğinin başka bir nicel ölçüsü ise (H) tabaka yüksekliğidir ve tabaka yüksekliği ile tabaka sayısı arasında aşağıdaki eşitlikte görüldüğü gibi ters orantı vardır (Denklem 2-5) :

$$H = \frac{L}{N} \quad (2-5)$$

Bu eşitlikteki L, kolon dolgu malzemesinin uzunluğudur.



Şekil 2-9: İki bileşenli bir numuneye ait kromatogramda taban genişliğinin gösterilmesi

Bir kolonun ayırıcılığı ya da ayırma gücü, kolonun bir numunede bulunan türleri birbirinden ne derece ayırabildiğinin nicel bir ölçüsüdür. Ayırma gücü (rezolüsyon) R_s ile gösterilir ve aşağıda verilen Denklem (2-6) bulunabilir:

$$R_s = 2x \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_1 + w_2)} \quad (2-6)$$

R_s değerinin 1'den büyük olması iyi bir ayırıcılık göstergesidir. Yüksek R_s değerlerinin elde edilebilmesi için N , α ve k' değerlerinin de mümkün olduğunca büyük olması gerekir (14).



Şekil 2-10: Laboratuvarında kullanılan bir HPLC sistemi

2.1.6.3. Çözücü Sistemi

Bir HPLC analizinin başarılı olması yüksek ihtimalle doğru çözücü sisteminin belirlenmesine bağlıdır. HPLC’de hareketli faz olarak kullanılan farklı farklı çözümler bulunmaktadır. Bunlardan bazıları Tablo 2-2’de verilmiştir. HPLC’de kullanılacak çözücünün kaynama noktası fazla yüksek olmamalıdır, viskozitesi de düşük olmalıdır, kullanılan dedektörle mutlaka uyumlu olmalıdır ve toksisitesi düşük olmalıdır.

Tablo 2-2: HPLC’de kullanılan bazı çözümler ve özellikleri

Çözücü	Kaynama noktası (°C)	Viskozite (cp)	Polarite (p')	Kırılma indisi
Hekzan	69	0.3	0.1	1.4
Diklorometan	40	0.4	3.1	1.4
Etil asetat	77	0.4	4,4	1.4
Kloroform	61	0.6	4.1	1.5
Tetrahidrofuran	66	0.6	4.0	1.4
Asetonitril	82	0.4	5.8	1.3
Metanol	65	0.6	5.1	1.3
Su	100	1.0	10.2	1.3

HPLC’de elüent olarak çoğunlukla iki ya da daha fazla çözücünden oluşan bir karışım kullanılır. Bu karışımlarda da genellikle belli oranlarda zayıf çözücü olarak su ve kuvvetli çözücü olarak da tetrahidrofuran, asetonitril ve metanol ve gibi organik çözümler kullanılır. Bazı çok bileşenli örneklerde, analiz boyunca aynı çözücü bileşimi kullanıldığında bazı elüsyon sorunları yaşanabilir. Bazı bileşenler kolondan çok hızlı, bazıları ise çok geç gelebilir. Bu problem, analiz boyunca elüent bileşiminin bir çözücü programlaması ile değiştirilmesi yoluyla çözülebilir. Sıvı kromatografide bu yolla

yapılan elüsyonlara gradient elüsyon, analiz süresince sabit bileşimli bir elüentin kullanılmasıyla yapılan elüsyona ise izokratik elüsyon denir (13).

2.1.6.4. Pompa

HPLC’de ileri-geri hareket eden pistonlu yüksek basınç pompalarından yararlanılmaktadır. Benzer yöntemle çalışan üç tip pompa vardır, bunlar; şırınga benzeri pompalar, silindir yollu pompalar, pnömatik pompalardır. Bu tip pomplar ile 8000 psi basınca çıkılabilir ve 0.2-10 mL/dk akış aralığında uygun çalışır. Sıvı faz çok sıkıştırılabilen bir faz olmadığı için ani basınç artmalarında cihazın herhangi bir yerinden sıvı kaçağı problemi yaşanabilir. Cihaz bu basıncın üstüne çıkılması halinde otomatik olarak sıvı akışını durdurur (13).

2.1.6.5. Kolon

HPLC’de kolon olarak çeşitli büyüklük ve çaplarda, cam veya paslanmaz çelikten yapılmış ve içinde uygun bir sabit faz bulunan malzemeler kullanılır. HPLC cihazlarında kullanılan üç temel kolon tipi vardır (Tablo2-3).

Tablo 2-3: HPLC’de kullanılan temel kolon çeşitleri

Kolon	Yarı çapı (mm)	Numune miktarı (mg)	Akış hızı (mL/dk)
Mikro analitik	1-2	0.01	0.10
Standart analitik	3-5	0.10	1.00
Preperatif	5-20	10.00	10.00

Kolon içerdiği dolgu malzemelerinin yarıçapları ise 3-20 μm arasında olabilmektedir. Kolon dolgu malzemesini oluşturan taneciklerin yarıçapı ne kadar küçük olursa teorik tabaka yüksekliği o kadar az olur ve kolonun verimliliği de o kadar fazla olur. Ancak çok küçük taneciklerin olması durumunda da kolonda oluşan geri basınç yükselebilir. Bu sebeple en uygun şartları sağlayan dolgu malzemeleri tercih

edilmelidir. HPLC sistemlerinde sıklıkla, yararlanılan ana kolonun ön tarafına daha kısa boyutta, fakat ana kolonla aynı malzemeye dolgulu, emniyet kolonu olarak adlandırılan bir kolon bağlanır. Emniyet kolonları ana kolonlara göre daha ucuzdur ve ana kolonu olabilecek yüksek konsantrasyon ve safsızlıklardan korur. Kirlendiğinde çok daha rahat değiştirilebilir (13).

2.1.6.6. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS), sıvı kromatografisinin (HPLC) kütle spektrometrisinin (MS) kütle analizi yetenekleri ile fiziksel ayırma özelliklerini birleştiren bir analitik kimya yöntemidir. Eşleşmiş kromatografi - MS sistemleri kimyasal analizde yaygındır çünkü her yöntemin kendine has yetenekleri iyileştirilmiştir. Sıvı kromatografisi, karışımları çoklu bileşenlerle ayırırken, kütle spektrometresi, yüksek moleküler özgüllük ve algılama duyarlılığı ile bireysel bileşenlerin yapısal kimliğini sağlar. Sıvı kromatografisi biriminden ayrıştırılmış analitler iyonlaştırılarak MS/MS kısmına gönderilirler. MS/MS bölümünde iyonlar ilk kuadropolden kütle/yük (m/z) oranlarında ayrıştırılarak collision cell (parçalanma hücresi) olarak adlandırılan girişim hücresine doğru gönderilir. Burada yüksek saflıkta azot gazı ile çarpıştırılan moleküller parçalanarak ikinci kuadropole gönderilirler. İkinci kuadropol kısmındaki bu ikinci iyonlar da kütle/yük (m/z) oranlarında ayrıştırılarak kütleli olarak analiz edilirler. Aynı m/z oranına sahip pek çok molekül olabilecekken aynı parçalanma iyonlarına sahip moleküllerin doğal olarak bulunma oranı 1/10000'dir. Bu ardışık teknik, biyolojik ve çevre kaynaklı kompleks numunelerde yaygın olarak bulunan biyokimyasal, inorganik ve organik bileşiklerini hassas bir yolla analiz etmek için kullanılır. Bu nedenle, LC-MS/MS gıda işleme, çevre izleme, farmasötik, zirai ilaç, biyoteknoloji ve kozmetik endüstrileri gibi farklı alanlarda kullanılabilir. LC-MS/MS, analitlerin nitel ve nicel olarak analizlerinde kullanılabilir. Karmaşık ortamlarda yer alan tekli veya çoklu analitlerin analizinde, gıdalardaki katkı maddeleri veya pestisitlerinin analizlerinde, ilaç etken maddelerinin yanında safsızlık ve metabolitlerinin analizinde, eser düzeydeki maddelerin analizinde, kan, idrar, doku gibi biyolojik örneklerin analizlerinde yüksek hassaslık ve doğrulukla veriler elde edilebilir. Numunede bulunan bileşenlerin miktarı, yapısı ve molekül ağırlığı üzerinde analizler yapılabilir. Küçük farmasötik bileşiklerden büyük moleküllerin tayinine kadar, polar iyonik, termal kararsız ve uçucu olmayan bileşiklerin analizleri gibi geniş yelpazede

farklı bilim dalları için çalışmalar yapılabilir. Günümüzde LC-MS/MS sistemi 1000 bar basınçla çalışan sıvı kromatografi (LC) ünitesi ile üçlü kuadropol sisteminden oluşan kütle spektrometresinden (MS/MS) meydana gelmektedir. Sistem ESI, elektrosprey iyonizasyon ve APCI, atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon iyon kaynakları barındırmakta ve bu yolla daha geniş bir analiz çeşitliliği sağlamaktadır. Halihazırda yapılan analizlerden bazıları; yenidoğan taraması, adli tıp analizleri, tıpta, veterinerlik ilaç kalıntı analizleri, ilaç metabolitleri analizi, gıda pestisit analizleri, suda kalıntı ve kirlilik tayini uygulama alanları arasındadır (14).

Çalışmalar sırasında Agilent 6420 HPLC-MS/MS cihazı kullanılmıştır. Cihaz elektrosprey iyonizasyon tekniğini kullanmaktadır. ESI kullanan kütle spektrometrisine elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi (ESI-MS) veya nadiren elektrosprey kütle spektrometresi (ES-MS) denir. ESI çalışma prensibi gereği molekülleri çok az böldüğü için ESI bir “yumuşak iyonizasyon” tekniği olarak sınıflandırılır. Bu, moleküler iyonun (veya daha doğrusu bir sözde moleküler iyonun) her zaman gözlemlenmesi bakımından avantajlı olabilir, ancak alınan basit kütle spektrumundan çok az yapısal bilgiye ulaşabiliriz. Bu dezavantaj, ESI'nin ardışık kütle spektrometresi (ESI-MS/MS) ile birleştirilmesiyle çözülebilir. ESI'nin üstünlüğü, çözelti hali bilgisinin gaz halinde koruyabilmesidir (15).

2.1.7. Sistem Uygunluk Testi

Sistem uygunluk testi genelde tüm analitik sistemin (cihaz, reaktif, kolon ve analist dahil) istenilen uygulamaya uygun olduğundan emin olmak için laboratuvarlar tarafından kullanılır. Sistem uygunluk testinin genel amacı kromatografik uygunluk (örneğin: kuyruklanma faktörünü test ederek, kritik pik çiftlerinin kolon etkinliği ve rezolüsyonunu test ederek) ve istikrarlı sistem performansından (örneğin: test standartlarının tekrar enjeksiyonuyla) emin olmak için kromatografik sonuçları izlemektir.

USP'ye göre sistem uygunluk testleri gaz ve sıvı kromatografisi metodlarının ayrılmaz bir parçasıdır. Bunlar analizin yapılabilmesi için kromatografik sistemin rezolüsyon ve tekrarlanabilirliğinin yeterli olduğunu doğrulamak için kullanılır. Testler cihaz, elektronik, analitik işlemler ve analiz edilecek örnekler ayrılmaz bir bütünü oluşturur ve böyle değerlendirilir.

Tipik kromatografik metodlar için beklenen limitleri detaylandıran sayısız kaynaklar vardır. FDA’ın şu anki kılavuzunda “Analitik metodların validasyonu” aşağıdaki kabul limitleri başlangıç kriteri olarak önerilmiştir (Tablo 2-4) (16).

Tablo 2-4: FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri.

Parametre	Limit
Kapasite faktörü	$k' > 2$
Enjeksiyon kesinliği	$RSD < \%1, n \geq 5$
Rezolüsyon	$R_s > 2$
Kuyruklanma faktörü	$T \leq 2$
Teorik plaka sayısı	$N > 2000$

Kapasite faktörü, rezolüsyon ve teorik plaka sayısından bölüm 2.1.6.2.’de bahsedilmiştir.

Enjeksiyon kesinliği, RSD (bağıl standart sapma) olarak ifade edilir ve kromatografik sistemin performansını gösterir. Bu, numunelerin analizleri sırasında pompanın, kolonun ve çevresel koşulların değerlendirilmesidir. Numune hazırlığı ve üretim değişkenleri bu parametreler ile değerlendirilemez.

Kuyruklanma faktörünü aşağıdaki formülle hesaplayabiliriz Denklem (2-7). Piktteki kuyruklanma arttıkça miktar tayininin doğruluğu azalır.

$$T = \frac{W_{0.05}}{2F} \quad (2-7)$$

$W_{0.05}$ = Pik yüksekliğinin 20’de 1’indeki pik genişliği

f = Pikin maksimumdan dik olarak indirilen dikme ile pik yüksekliğinin 20’de 1’inde pikin kenarına kadar olan mesafe.

2.1.8. Analiz Yöntemleri

2.1.8.1. HPLC-MS/MS Yöntemi ile Analizler

Purwaha ve ark. L-asparjinazın etkisini araştırmış ve 29 metaboliti içeren verimli bir LC-MS/MS metodu geliştirmişlerdir. Zorbax SB C-18 kolon kullanılmıştır. LOD 0.002 (alanin için)- 0.250 μ M (asparajin için), LOQ ise 0.007- 0.760 μ M aralığında değişmektedir (17).

Le ve ark. amino asitleri türevlendirmeden basit bir numune hazırlama yöntemiyle, hassas bir LC-MS/MS metodu geliştirmiştir. Analiz süresi 15 dakikadır, tekrar enjeksiyon kesinliği bütün bileşikler için ortalama %2.8 ve doğrusal korelasyon katsayısı 0.995'tir. Bileşiklerin çoğu güvenilir bir şekilde 0.1 μ M'ın altında bulunmuştur (18).

Asparajin sentetaz (ASNS) protein konsantrasyonu tayini üzerine Susan ve ark. MS ile kompleks örnek karışımlarında çalışmıştır. Bu metod direkt olarak ASNS proteinini belirler. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 30 ve 100 attomol olarak bulunmuştur (19).

Haoyang ve ark. kararlı bir izotop işaretli iç standart (ASN-D3) kullanarak insan serumunda L-asparajinin tayini için bir hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (HILIC-MS/MS) yöntemi geliştirmiştir. Serum L-asparajin konsantrasyonları, kabul edilebilir doğruluk ve kesinliklerle 2-200 μ M'lık bir doğrusal kalibrasyon eğrisi aralığında belirlemiştir (20).

Bu çalışma ile Hyeon ve ark., L-aspartik asit, L-asparajin ve L-asparjinazın plazmadaki seviyelerini belirlemek için bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmeyi amaçlamıştır. Analiz içi ve analizlerler arası doğruluklar L-aspartik asit için %96.62–106,0 aralığındadır, L-asparajin için %89.85-104.8 ve varyasyon katsayısı (%CV) %7'yi geçmemiştir (21).

2.1.8.2. Diğer Yöntemler ile Analizler

Zhang M. ve ark. tedavi sırasında serumdaki L-ASPZ seviyesinin azalmasını incelemiştir. HPLC-floresans ve ters faz kromatografisi kullanılmıştır. Eksitasyon ve emisyon dalga boyu olarak sırasıyla 340 ve 440 nm dalga boylarını kullanılmıştır. Türevlendirme için ortho-fitalaldehit ve ethanetiyoil'den yararlanılmıştır. L-asparajin için dedeksiyon limiti 0.76 nmol/mL'dir. (22).

A. Jambor ve I. Perl derlemeden yaptıkları çalışma için 9-fluorenilmetiloksikarbonil ile türevlendirme yapmışlardır. 22 amino asiti analiz için fotodiyot array (DAD) ve floresans (FL) dedektörü eş zamanlı kullanmıştır. Fmoc ile türevlendirilen amino asitlerin tayin sınırını (LOQ) serin, glisin ve valin (2,5 pmol) hariç 1 pmol bulunmuştur (23).

Huang G. ve ark. kolon öncesi türevlendirme kullanarak HPLC-FL dedektör ile çalışmıştır. Türevlendirme için o-fitalaldehit (OPA), n-asetil-sistein ve C-18 kolon kullanmıştır. Amonyak ve 4 birincil amin için LOD 24 pptv, analiz süresi 20 dakikadır (24).

Lanvers C, Paulo J ve ark. mikropate okuma yöntemiyle L-asparjinazın serumda terapötik ilaç izlenimi için bir yöntem geliştirmiş ve valide etmiştir. Linearite 2.5-75 ve 75-1250 U/L, korrelasyon katsayısı $r^2 > 0.99$ olarak bulunmuştur (25).

Yarı otomasyonlu bir metod geliştiren Bartolomeo M. Ve ark. amino asitleri türevlendirmek için OPA kullanmıştır. Metod protein hidrolizini ve türevlendirme ile HPLC cihazı kullanılarak geliştirilmiştir. Sığır serumu üzerinde çalışılmıştır. LOQ ve LOD değerleri 33-60 pmol/ μ L ve 11-20 pmol/ μ L aralığında bulunmuştur (26).

Nath ve ark. L-asparjinazın aktivitesini izlemek için HPLC-floresans ile bir yöntem geliştirmiştir. Amino asitleri yirmi dakikalık bir analiz süresiyle analiz etmiştir. L-asparjinaz 0.1-10 U/mL arasında doğrusal, LOQ değeri 0.03 U/mL bulmuştur (27).

Boss J. ve ark. Asparajin ve asparjinaz seviyelerini ölçmek için kırk dokuz çocuktan örnek almıştır, HPLC ile C18 kolonda çalışmıştır. 0.2 M potasyum asetat pH:6 ve metanolle 1.3 mL/dk akış hızını kullanmıştır. Metodun dedeksiyon limiti 0.1 μ M'dan düşüktür, tayin sınırı ise 0.1 μ M'dır (28).

Zhang ve ark. çocuk plazmasında nano yapıda PEG-asparjinaz aktivite tayini için UV-görünür bölgede spektrometrik bir yöntem geliştirmiştir. Amonyanın kromojenik reaktifi olan Nessler reaktifi ile stabil bir sarı kompleks üretildi. Nessler ürününe karşılık konsantrasyon grafiği 27.8-1.111 IU/L aralığında doğrusal, r^2 ise 0.999 olarak bulunmuştur. Analitik geri kazanım %90-100 arasındadır (29).

Ylikangas ve ark. L- asparjinaz aktivitesi ve L asparjinaz tedavisini izlemek için florimetrik bir yöntem geliştirmiştir. Artan substrat konsantrasyonu ile enzimin V_{max}

değeri 0.547 (SD 0.059) mikromol/dk/mg ($n = 3$) ve K_m değeri ise 0.302 (SD 0.095) mM ($n = 3$) değerlerinde doyurulabilir kinetik bir model oluşturmuştur (30).

Wang ve ark ALL'li hastalarda plazma anti asparajinaz IgG konsantrasyonlarını değerlendirmek için ELISA yöntemini kullanmışlardır. *E. coli*, *Erwinia* ve PEG L-asparajinaza karşı antikorlar için tahliller arası varyasyon katsayıları sırasıyla %9.04, %14.7 ve %13.0 ve tahlil içi varyasyon katsayıları %1.44, 4.43 ve %3.28'dir (31).

Jason ve ark. *E. Coli* asparajinaz ile tedavi edilen lenfoid neoplazili köpeklerde dolaşımdaki anti-asparajinaz antikorlarını saptamak için bir ELISA yöntemi geliştirmiştir. Analiz içi ve analiz arası varyasyon katsayıları %3.6 ve %14.5'dir. L-asparajinaz antikorları PEG'lenmiş ilaç formülasyonuna daha az bağlandığı gözlemlenmiştir (32).

Juan ve ark. *Corynebacterium Glutamicum*'dan L-Asparajinazın karakterizasyonu ve kısmi saflaştırılması üzerine çalışmıştır. L-Asparajinaz, protamin sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephacel anyon değişimi kullanarak amonyum sülfat çöktürmesi ve Sephacryl S-200 jel filtrasyonu ile 98 kat saflaştırıldı. Jel filtrasyonundan ve SDS-PAGE'den tahmini M_r 80000'dir (33).

Christos ve ark. doğal substratını kullanan L-asparajinaz için Amplex Red tabanlı bir florometrik ve spektrofotometrik analiz üzerine çalışmıştır. Analiz hem absorbans hem de floresans modlarında valide edilmiştir. Yüksek duyarlılığı ve substrat seçiciliği nedeniyle bu yöntem L-asparajinaz içeren insan serumundaki enzimatik aktiviteyi ölçmek için kullanılabilir (34).

Richi ve ark. *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen düşük glutaminaz aktivitesine sahip bir hücre dışı L-asparajinaz homojen olarak saflaştırdı. Floresans spektroskopisi, proteinin 3 M 'den fazla GdHCl varlığında bile stabil olduğunu gösterdi. Saflaştırılmış enzimin kinetik parametreleri K_m , V_{max} ve k_{cat} sırasıyla 4×10^{-5} M, 4.03 IU ve $2.68 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ olarak bulundu (35).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması 2019-2021 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya araştırma laboratuvarı ve İlaç Uygulama ve Araştırma merkezinde yapılmıştır.

Plazma örnekleri olarak tarihi geçmiş plazmalar kullanıldı. Standartlar ve gerekli çözeltiler hazırlanarak plazmada katım (spiked) yapılarak çalışıldı. Ekstraksiyon aşamaları bölüm 3.5.3'e uygun olarak hazırlanmıştır.

3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler Ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Metod geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında tez projesi ile sağlanan referans standartlar kullanılmıştır (Tablo 3-1). Referans standartlarının analiz sertifikası Ek-1'de verilmiştir.

Tablo 3-1:Referans standartlar

Standart	Üretici
L-asparajin	Sigma-Aldrich (USA)
L-glutamin	Sigma-Aldrich (Brazil)
L-aspartik asit	Sigma-Aldrich (Riedstr, Germany)
L-glutamik asit	Sigma-Aldrich (Japan)

Metod geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılan kimyasallar Tablo 3-2'de belirtilmiştir.

Tablo 3-2: Kimyasallar

Kimyasallar	Marka
Metanol (HPLC saflığında)	Sigma-Aldrich (Riestr, Germany)
Amonyum Asetat	Merck (Darmstadt, Germany)
Asetonitril (HPLC saflığında)	Isolab (Eschau, Germany)
Formik asit (%95-100 ağırlıkta) (analitik saflıkta)	Isolab (Wertheim, Germany)
Heptaflorobütirik asit	Sigma-Aldrich (Riestr, Germany)
Benzil amin	Sigma-Aldrich (Riestr, Germany)
Trizma HCL	Wisent (Quebec, Canada)
NaoH	Merck (Darmstadt, Germany)

3.1.2. Çözeltiler

3.1.2.1. Mobil Faz Çözeltisi

Mobil faz olarak asetonitril, metanol, amonyum asetat çözeltileri farklı oranlarda denenmiş en uygun ayırım asetonitril-amonyum asetat karışımından elde edilmiştir. Mobil faz çözeltisi olarak asetonitril- 25 mM amonyum asetat (pH:6.9) (h/h) karışımı kullanıldı. Asetonitril içine her 100 mL için 100 µL heptaflorobütirik asit eklendi. Gradient akış kullanıldı. Mobil faz oranları Tablo 3-3’de verilmiştir. Mobil faz süzme sisteminden süzülerek analize hazır hale getirildi.

Tablo 3-3:Gradient akış şeması

Dakika	% Amonyum asetat (mL/dk)	% Asetonitril (mL/dk)
0	95	5
4	95	5
8	5	95
8	95	5
10	95	5

25 mM Amonyum asetat çözeltisinin hazırlanması

963.5 mg $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tartılıp 500 mL saf suda çözöldü. pH ölçöldü ve 6.9 bulundu.

%5'lik Formik asit çözeltisinin hazırlanması

Formik asitten (%98-100 ağı/ağı) 1.25 mL alınarak 25 mL'lik balon jodede saf su ile hacmine tamamlandı.

5 M Benzil amin çözeltisinin hazırlanması (IS)

Ana Stok (AS) 1

Benzil aminden (%99 ağı/ağı) 100 μL alınarak 5 mL'lik balon jodede saf su ile hacmine tamamlandı. ($d=0.98 \text{ g/mL}$, $M_a= 107.15 \text{ g/mol}$)

Ara Stok 2

Ana Stok 1'den 100 μL alınarak 25 mL'lik balon jodede saf su ile hacmine tamamlandı.

Ara Stok 3

Ara Stok 2'den 500 μL alınarak 5 mL'lik balon jodede saf su ile hacmine tamamlandı.

Ara Stok 4

Ana Stok 1'den 500 μL alınarak 5 mL'lik balon jojede saf su ile hacmine tamamlandı.

Heptaflorobütirik asit

Heptaflorobütirik asit iyon çifti reaktifi olarak kullanılmıştır. Her 100 mL amonyum asetata 100 μL asit eklenmiştir.

%4'lük Sülfosalisilik asitin hazırlanması

1.05 g Sülfosalisilik asit tartılıp 25 mL'lik balon jojede hacmine tamamlanır.

50 mM 100 mL pH:8.6 Trizma HCL çözeltisinin hazırlanması

788 mg Trizma HCL tartılıp 25 mL'lik balon jojede hacmine tamamlanır.

pH:8.6'ya NaOH çözeltisi ile ayarlanır. ($M_a = 157.60 \text{ g/mol}$)

1M NaOH çözeltisinin hazırlanması

1 g NaOH tartılıp 25 mL'lik balon jojede hacmine tamamlanır. ($M_a = 40 \text{ g/mol}$)

3.1.2.2. Amino Asit Çözeltileri

Ana Stok çözelti:

5 mg L-asparajin, L-aspartik asit, L-glutamik asit ayrı ayrı tartıldıktan sonra 5 mL'lik bir balon jojede, hepsi bir arada saf su ile çözülerek hacmine tamamlandı (1 mg/mL, KRŞ-AS1).

Glutamin, vücutta en bol bulunan ve çok yönlü amino asittir. Sağlık ve hastalıkta, bağışıklık hücreleri tarafından glutamin tüketim oranı glikoza benzer veya daha yüksektir (36). Yaptığımız çalışmada ilk başta bütün amino asitler aynı konsantrasyonda hazırlanıp standart bir çözelti elde edildi. Yapılan analizlerde asparajin, aspartik asit ve glutamik asitten uygun pikler elde edildi fakat glutamin piklerinin rutin analizler için uygun olmadığı gözlemlendi. Validasyon için daha yüksek konsantrasyonlar denendi ve kalibrasyon eğrisi için en düşük 5 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyon belirlendi. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal olması ve kılavuzlara uygunluk açısından bu konsantrasyondan başlamak uygun görüldü.

Stok çözeltiden su ile 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik (KRŞ-AS2) ara stok olarak 25 mL hazırlandı. Farklı amino asitlerin karışımıyla hazırlanan çözeltiler KRŞ olarak isimlendirilmiştir (KRŞ). Daha sonra 500-5000 ng/mL aralığında standart çözeltiler su

ile hazırlandı. Kalibrasyon standartlarının ve kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı Tablo 3-4 ve 3-5’de verilmiştir.

Tablo 3-4: Kalibrasyon standartlarının hazırlanışı

Standart	Analit	Konsantrasyon (ng/mL)	Konsantrasyonu ve Final Hacim hacmi
ST1	KRŞ	500	250µL KRŞ-AS2 5 mL (10µg/mL)
ST2	KRŞ	1000	500µL KRŞ-AS2 5 mL (10µg/mL)
ST3	KRŞ	2000	1000µL KRŞ-AS2 5 mL (10µg/mL)
ST4	KRŞ	3000	1500µL KRŞ-AS2 5 mL (10µg/mL)
ST5	KRŞ	4000	2000µL KRŞ-AS2 5 mL (10µg/mL)
ST6	KRŞ	5000	2500µL KRŞ-AS2 5 mL (10µg/mL)

Kalibrasyon eğrisi standartları hazırlandıktan sonra düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda seçilen noktalarda kalite kontrol örnekleri hazırlanmıştır (Tablo 3-5).

Tablo 3-5: Kalite kontrol numunelerinin hazırlanışı

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (ng/mL)	Konsantrasyonu ve Final Hacim hacmi
KK1	KRŞ	1500	750µL KRŞ-AS2 5mL (10µg/mL)

KK2	KRŞ	2500	1250µL (10µg/mL)	KRŞ-AS2 5mL
KK3	KRŞ	3500	1750µL (10µg/mL)	KRŞ-AS2 5mL
KK4	KRŞ	4500	2250µL (10µg/mL)	KRŞ-AS2 5mL

Ana Stok çözelti:

5 mg L-glutamin tartıldıktan sonra 5 mL'lik bir balon jojede saf su ile çözülerek hacmine tamamlandı (1 mg/mL, G-AS1).

Stok çözeltiden su ile 100 µg/mL'lik (G-AS2) ara stok olarak 25 mL hazırlandı. Daha sonra 5-50 µg/mL aralığında standart çözeltiler su ile hazırlandı. Kalibrasyon standartlarının ve kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı Tablo 3-6 ve 3-7'de verilmiştir.

Tablo 3-6: L-glutamin kalibrasyon standartlarının hazırlanışı

Standart	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	Konsantrasyonu ve Final Hacim hacmi	
ST1	G	5	250µL (100µg/mL)	G-AS2 5 mL
ST2	G	10	500µL (100µg/mL)	G-AS2 5 mL
ST3	G	20	1000µL (100µg/mL)	G-AS2 5 mL
ST4	G	30	1500µL (100µg/mL)	G-AS2 5 mL
ST5	G	40	2000µL (100µg/mL)	G-AS2 5 mL

ST6	G	50	2500µL (100µg/mL)	G-AS2 5 mL
------------	----------	-----------	------------------------------------	-------------------

Tablo 3-7: L- Glutamin için kalite kontrol numunelerinin hazırlanışı

Standart adı	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	Konsantrasyonu ve Final Hacim	
KK1	G	15	750µL (100µg/mL)	G-AS2 5 mL
KK2	G	25	1250µL (100µg/mL)	G-AS2 5 mL
KK3	G	35	1750µL (100µg/mL)	G-AS2 5 mL
KK4	G	45	2250µL (100µg/mL)	G-AS2 5 mL

3.2. Aletler ve Gereçler

Agilent (U.S.A) LC 1200 Infinity serisi HPLC-MS/MS, Agilent Technologies 6420 Triple Quad LC/MS sistemi analitik çalışmalarda kullanılmıştır (Tablo3-8).

Tablo 3-8:Ekipmanlar

HPLC-MS/MS Sistemi	Marka - Model
Pompa	Agilent 1260 Infinity
Otoörnekleyici	Agilent 1260 Infinity

Dedektör	Agilent 1260 Infinity
Kolon Fırını	Agilent 1260 Infinity
Degazer	Agilent 1260 Infinity
Analitik Kolon	Kinetex 2.6 µm, 150 x 4,6 mm, HILIC
Yazılım	Mass Hunter

Sistem Kontrol Ünitesi (Agilent 1260)

Validasyon çalışması sırasında kullanılan destek ekipmanlar Tablo 3-9’da belirtilmiştir.

Tablo 3-9: Destek ekipmanlar

Destek Ekipmanlar	Marka - Model
Spektrofotometre	UVmini-1240
1 cm’lik kuartz küvetler	QS 1000 10 x10 x 45 mm
Ultra saf su cihazı	Merck Mili-Q İntegral 3
Ultrasonik banyo	Lab companion, jitech
pH metre	Mettler toledo
Otomatik pipetler	Eppendorf 100-1000 µL ve 10-100 µL
Pipet uçları	Eppendorf 1000 µL ve 100 µL
Otoörnekleyici vialleri	Isolab
Vial kapakları	Isolab

Girdap karıştırıcı	IKA MS 3 basic
Santrifüj	Sigma 3-30KS
Analitik terazi	Ohaus-Explorer EX224
Mobil faz filtresi	Porafil, 0.45, CA
Enjektör	Düz uçlu, 5 mL

3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi

Enstrümental Şartlar:

- a. HPLC-MS/MS sistemi açılır.
- b. MS Cone'u izopropil alkol ve temiz bezle silinir.
- c. Cihaz programında menü üzerinden sistem bekleme konumundan çıkarılarak hazır hale getirilir.
- d. 3.1.2.1'e uygun olarak hazırlanan asetonitril-25 mM amonyum asetat sistemin herhangi iki hattına yerleştirilir.
- e. Purge valfi açılır ve akış 2 mL/dk olacak şekilde ayarlanır ve 10 dakika akış geçmesi beklenir.
- f. (Asetonitril: Amonyum asetat, h/h), (5:95) mobil faz sistemi ayarlanır.
- g. Purge işleminden sonra akış 0.1 mL/dk olarak ayarlanır ve kolon bağlantısına kadar sistemden mobil faz geçmesi sağlanır.
- h. Kolon sisteme takılarak akış kademeli bir şekilde arttırılır. Final akış hızı 0.4 mL/dk olacaktır.
- i. Analiz süresi: 10 dakika olarak ayarlanır.
- j. Kolon Sıcaklığı 40 °C olarak ayarlanır.
- k. Otoörnekleyici 15 °C olarak ayarlanır.
- l. Enjektör hacmi 10 µL'ye ayarlanır.

m. Metod aminoasit olarak kaydedilir.

n. Bu metoda uygun şekilde analiz gerçekleştirildiğinde aşağıdaki alıkonma zamanları elde edilir.

Amino asitlere ait dedektör parametreleri ve standarta ait alıkonma süreleri Tablo 3-10 ve 3-11’de verilmiştir.

Tablo 3-10: Amino asitlere ait özel dedektör parametreleri

Amino asit	L-asparajin	L-glutamin	L-aspartik asit	L-glutamik asit
M_a (g/mol)	132.1	146.1	133.1	147.1
Öncül iyon	132.9	146.9	134	148
Fragmentor voltaj	60	65	134	148
Parçalanma iyonu (p.i)	60	65	55	65
Parçalanma enerjisi (c.e)	74.1	84.1	88.1	102.0
Mod	+	+	+	+

Tablo 3-11: Analizde kullanılan analitler ve iç standart

Analit	Alıkonma Zamanı (dk)
L-asparajin	3.4 ±0.5
L-glutamin	3.5±0.5
L-aspartik asit	3.1±0.5

L-glutamik asit	3.2±0.5
Benzilamin	8.5±0.5

3.4. Sistem Uygunluk Verileri

Sistem uygunluk testi verileri Tablo 3-12’de verilmiştir ve uygun değerler elde edilmiştir.

Tablo 3-12: Amino asitler için sistem uygunluk parametreleri

Amino asit	k'	Alan	Yükseklik	Simetri	Genişlik	N
L-asparajin	33.3	1512	306	0.4	0.6	18137
L-glutamin	33.6	40406	6567	0.5	0.8	9735
L-aspartik asit	31.0	2610	433	0.7	0.6	7845
L-glutamik asit	33.6	40406	6567	0.5	0.8	9735

3.5. Amino Asitlerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (HPLC-MS/MS) ile Analizi

3.5.1. Dedektör Parametrelerinin belirlenmesi

Dedektör parametrelerini belirlerlerken her bir amino asit için ayrı çözelti hazırlandı. Ana iyonlar ve parçalanma ürünleri belirlendi. Ana iyonu çok fazla parçalamamak için fragmentor voltajı seçimi yapıldı ve pozitif modda daha iyi sonuçlar elde ettiğimiz için bu modda çalışıldı. Öncül iyon, fragmentor voltaj, parçalanma iyonu, parçalanma enerjisi ve modlar için en uygun değerler belirlendi. Parametreler kolon takılmadan belirlendi ve analizlerde uygulandı. Dedektör parametreleri Tablo 3-10’da detaylı olarak verilmiştir.

3.5.2. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

Stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanan 10 µg/mL konsantrasyondaki L-asparajin, L-aspartik asit ve L-glutamik asit çözeltisinden 500, 100, 2000, 3000, 4000, 5000 ng/mL konsantrasyonlarında 5 mL'lik balon jojelerde hazırlandı, 15 saniye vortekslendi. Doğrusal konsantrasyon aralığı alınmıştır.

Stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanan 100 µg/mL konsantrasyondaki L-glutamin çözeltisinden 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL konsantrasyonlarında 5 mL'lik balon jojelerde hazırlandı, 15 saniye vortekslendi. Doğrusal konsantrasyon aralığı alınmıştır.

10 µL enjeksiyon yapılarak alanlar hesaplandı. Elde edilen pik alanlarından kalibrasyon eğrisi hazırlandı

3.5.3. Ekstraksiyon Aşamaları

Ön denemeler sırasında yaygın olarak kullanılan sülfosalisilik asit ile çalışıldı santrifüj ise 16000 rpm'e ayarlandı ve bütün denemelerde katım yapılarak çalışıldı. Standartlara ait pikler gözlemlenmedi.

İleriki aşamalarda proteinleri çöktürmek için asetonitril kullanıldı. Ayrıca aynı numunelerden iki seri alındı, 5000 ve 15000 rpm devirde çalışmalar yapıldı. Yüksek rpm değerlerinde daha iyi sonuçlar elde edildiği gözlemlendi. Bu sırada farklı iç standartlar da kullanıldı. Uygun sonuçlar elde edilemeyince farklı konsantrasyonlar ve kimyasallar ile denemelere devam edildi.

Sonuç olarak daha yüksek devirlerde çöktürme daha verimli oldu ve metanol ile daha iyi sonuçlar elde edildi. Plazmadan ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon için farklı kimyasallar ve teknikler kullanılıp metod optimize edilmiştir. L-asparajin, L-aspartik asit, L-glutamik asit için iç standart *Stok-4* kullanıldı, L-glutamin için *Stok-3* kullanıldı. Hazırlanan kör örneklerle aynı adımlar uygulanmıştır. Kör örneklerde standart ile aynı hacimde (100 µl) saf su eklenmiştir.

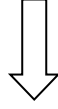
1ml boş plazma



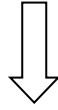
5ml MeOH



1 dakika vorteks



20000 g, 5 dakika 10°C



Üst sıvı kısımdan 90 µl yeni tüpe alınır



10 µl, %5'lik formik asit eklenir



100 µl standart eklenir

(Tablo 3-4, 3-5, 3-6 ve 3-7)



20 µl iç standart eklenir

(Benzil amin)



Vorteks 30 saniye



İnserte alınıp enjeksiyon yapılır.

3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Geçerli kılma yani validasyon, yöntemin ilgili performans değerlerine uygunluğunun saptanması için metot özelliklerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. Sadece bir laboratuvar veya birden fazla laboratuvarın katıldığı laboratuvarlar arası çalışma ile yapılabilir (37).

Plazma uygulamaları için Avrupa İlaç Ajansı (EMA, *European Medicines Agency Guideline on bioanalytical method validation*) kılavuza göre validasyon çalışması yapılmıştır (38).

3.6.1. Spesifiklik ve seçicilik

Analitik yöntemin analiti diğer bileşenlerden ayırabildiğinin ölçüsüdür. Bunun için etken maddenin içinde bulunduğu matriks bileşenlerinden ayrılabilirdiğinin gösterilmesi gerekir. Etken madde için pik saflığı testi yapılarak analit pikinin tamamen analite ait olduğunun gösterilmesidir. Bu yöntem diyode array-UV spektrumları ve kütlede geçerlidir.

3.6.2. Doğrusallık

Analitik seyreltmelerde azalan konsantrasyonlarda dedektör cevabının doğrusal olması araştırılır. Analitin değişen konsantrasyonları ile elde edilen verilerden oluşan eğrinin regresyon analizi yapılır. Korelasyon katsayısı, y (ordinat)-kesim noktası, eğrinin eğimi hesaplanarak eğri denklemi elde edilir. Analitik çalışmalarda minimum 5 noktadan doğrusallık gösterilmeli ve korelasyon katsayısı 0.99 dan büyük olmalıdır.

3.6.3. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk, gerçek değer ile analiz edilen değerlerin birbirine yakınlığını göstermektedir. Doğruluğu belirlemek için çeşitli yöntemler vardır.

- Analitin bilinen konsantrasyonlarda çözeltilerinin analizi ile belirlenir.
- Başka bir belirlenmiş metod ile analiz yapılır.

Analitin düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlardaki 3 örnek analiz edilerek miktar tayini yapılır ve doğruluk hesaplanır.

Kesinlik ise belirlenen koşullar altında aynı örneklerin analiz sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir. Analizin en az 3 farklı konsantrasyonunda düşük orta ve yüksek konsantrasyonda en az 3 örnek analiz edilerek relatif standart sapma (varyasyon sabiti, cv) hesaplanır.

3.6.4. Dedeksiyon ve Miktar Tayini Limiti

Dedeksiyon limiti tayin edilebilen en düşük düzeydir (LOD). Farklı yollarla belirlenebilir.

a) Sinyal/gürültü oranı: dedeksiyon limiti için sinyal/gürültü oranı 3'den büyük kabul edilebilirdir.

b) Cevap ve eğrinin standart sapmasına bağlı olarak da hesaplanabilir.

$$LOD = 3 \sigma / S$$

σ : Cevabın standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi.

σ regresyon eğrisinin y kesim noktasının standart sapması cevabın standart sapması olarak kullanılabilir.

En düşük analiz edilebilen miktar, Miktar tayini limitidir (LOQ). Farklı yöntemlerle tayin edilebilir.

a) Sinyal/gürültü oranı: en düşük tayin limiti için S/N oranı 10'dan büyük olmalıdır.

b) Ya da kalibrasyon eğrisinin eğiminden hesaplanır.

$$LOQ = 10 \times \sigma / S$$

σ : Cevabın standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi.

Çalışmamızda LOD ve LOQ değerleri bulunan en düşük değerler olarak değil analiz için gerekli olan aralık seçilerek belirlenmiştir. Seçilen LOD ve LOQ değerleri plasmadan ilgili amino asitlerin analizleri için geçerli ve elde edilen sonuçların değerlendirilebilir olduğu aralıklardır. Bu nedenle klasik LOD ve LOQ belirleme yöntemleri bu tez çalışmasında kullanılmamıştır.

3.6.5. Matriks etkisi

Kütle spektrometresi kullanılması durumunda, farklı donörlerden elde edilen blank matriksin kullanılarak matriks etkisi (ME) araştırılmalıdır. Matriks havuzu kullanılmamalıdır.

Her bir analit ve iç standart (IS) için; matriks varlığındaki pik alanının (analitin ekstraksiyonuna müteakip blank matriksin eklenmesinden sonra yapılan analizle ölçülen değer) matriks yokluğundaki pik alanına (analitin saf çözeltisi) oranı olarak ifade edilen matriks etkisi, her bir matriks lotu için hesaplanmalıdır. IS'a normalize edilmiş ME; analitin ME'sinin IS'ın ME'sine bölünmesiyle hesaplanmalıdır.

Genel olarak, “matriks etkisi (ME)” terimi, standart çözeltideki bir analitin idrar, plazma veya serum gibi biyolojik bir matriksteki aynı analite karşı kütle spektrometresindeki cevabının farklılığını ifade eder. Bu etkiler genellikle endojen matriks bileşenlerinden, kromatografik davranışı ve hedef bileşiklerin iyonizasyonunu etkileyebilen maddelerden kaynaklanır, bu da iyon baskılanma veya artırımı ile sonuçlanır. Bu nedenle, laboratuvar verilerinin istenen doğruluk ve kesinlik standartlarına ulaşılmadan önce bu etkilerin karakterize edilmesi ve kontrol edilmesi gerekir. Matriks etkisi iyonizasyon tipine, numune hazırlamaya ve biyolojik matrikse bağlı olarak değişir. Matriks etkisi sistematığe, sisteme özgü bileşiğe veya matrikse bağlıdır. Tamamen ortadan kaldırılamasa da, çeşitli önlemler veya birden fazla önlem kullanılarak en aza indirilebilir (39).

Kütle spektrometrik analizlerde kullanılan matriksin analizlere etkisi incelenmelidir. Matriks iyon çokluklarını arttırıcı veya azaltıcı yönde etkisi olabilir. Belirlenmesi gereklidir. Aynı konsantrasyonlarda standart ile aynı konsantrasyonda bilinen impürite eklenmiş çözeltinin pik alanlarından formül (Denklem 3-1) ile hesaplanır,

$$\%ME = \frac{(\text{Analitin standart pik alanı} - \text{Analitin örnek pik alanı})}{\text{Analitin standart pik alanı}} \times 100 \quad (3-1)$$

Kabul kriteri hesaplanan matrik etkisi $ME = \%0$ olduğunda yok, $ME > \%0$ olduğunda iyon baskılanma vardır. $ME < \%0$ olduğunda iyon çokluğu artırımı vardır. İyon baskılanma ve iyon çokluğu artırımı değerleri $\%50$ 'den fazla olmamalıdır.

3.6.6. Validasyon Serisinin Hazırlanması

Validasyon serisi boş, kalibrasyon eğrisi ve kalite kontrol örnekleri olarak hazırlandı. L-asparajin, L-aspartik asit, L-glutamik asit için; boş viallere boş plazma, kalibrasyon eğrisi için konsantrasyonlar, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ng/mL, kalite kontrol örnekleri ise 1500, 2500, 3500, 4500 ng/mL olarak seçildi. L-glutamin için; boş viallere boş plazma, kalibrasyon eğrisi için konsantrasyonlar, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL, kalite kontrol örnekleri ise 15, 25, 35, 45 µg/mL olarak seçildi. Validasyon serisi; Boş, Kalibrasyon standartları (ST1-ST6) Boş, Kalite kontrol örnekleri (KK1, KK2, KK3, KK4, her birinden 6 örnek) boş ve tekrar standart kalibrasyon standartları şeklindedir. Elde edilen verilerden validasyon parametreleri hesaplanmıştır.

3.7. L-Asparjinaz Aktivitesinin Asparajin ve Glutamin Üzerinde etkisinin incelenmesi

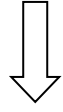
Enzimler, canlı organizmalarda biyokimyasal tepkimeleri hızlandıran biyolojik katalizörlerdir (biyokatalizör). Katalizörler olarak enzimler oldukça düşük konsantrasyonlarda gereklidir ve tepkime boyunca kendileri bitmeden reaksiyonların hızını artırır. Genel olarak enzimler, substratın ürün moleküllerine dönüşümünü katalizleyebilecek şekilde tanımlanmaktadır. Enzim kinetiği ise enzim katalizli tepkimelerin hızını belirleyen faktörlerin araştırılmasıdır. Enzimler hem metabolizmada hem de biyoteknolojide oldukça önemlidir. Michaelis Menten kinetiği, enzim kinetiğinin en çok kullanılan modellerinden biridir.

Bu aşamada L-asparjinaz standardı ve tedavide kullanılan Leunase benzer konsantrasyonlarla hazırlandı ve asparajin ve glutamin üzerindeki etkisi incelendi. Teoride L-asparjinazın amino asitleri katalizleyeceğini biliyorduk ve bunu farklı ortam ve dakikalarda test ettik. 1. Analizde vücut ortamını simule edilerek Trizma HCL içinde amino asit çözeltileri hazırlanmıştır. Sülfosalisilik asit enzimatik reaksiyonu durdurmak için kullanılmıştır.

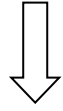
Deney dizaynları aşağıdaki gibi yapılmıştır:

1. Analiz koşulları

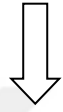
ST KRŞ, Asn, Gln



37 °C



30 µL Enzim



5 dk, 10 dk ve 15 dk



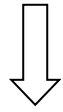
250 µL %4 SuSA



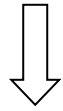
HPLC-MS/MS ile analiz

2. Analiz koşulları (Enzim ile)

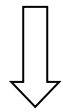
500 µL plazma 1, plazma 2, plazma 3, boş



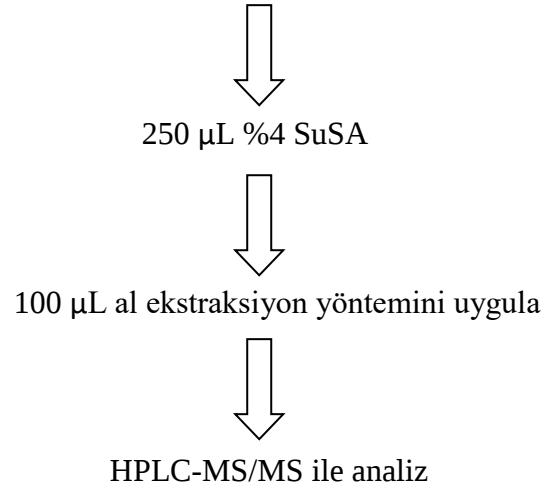
37 °C



30 µL Enzim standardı

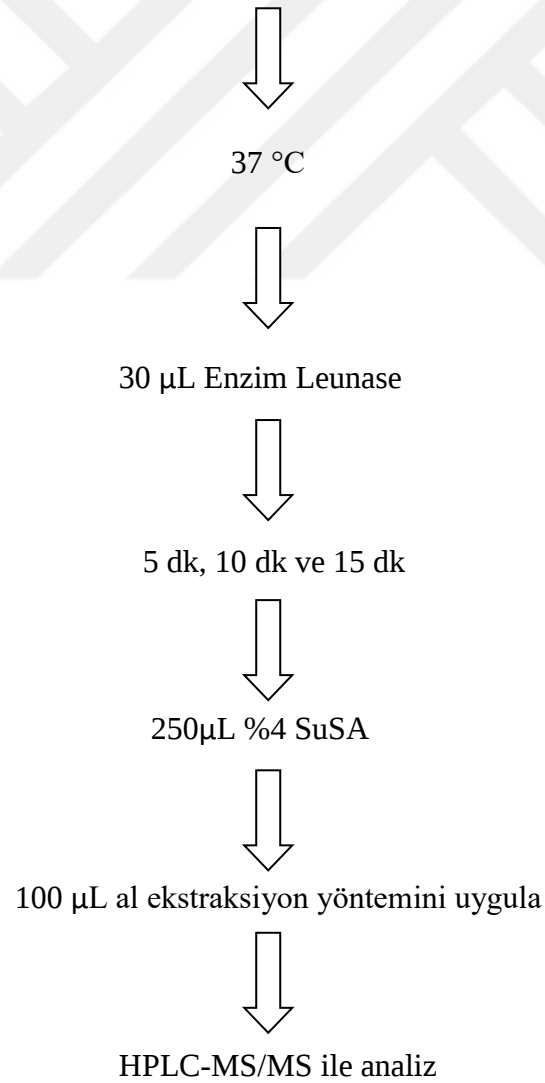


5 dk, 10 dk ve 15 dk



3. Analiz koşulları (Leunase ile)

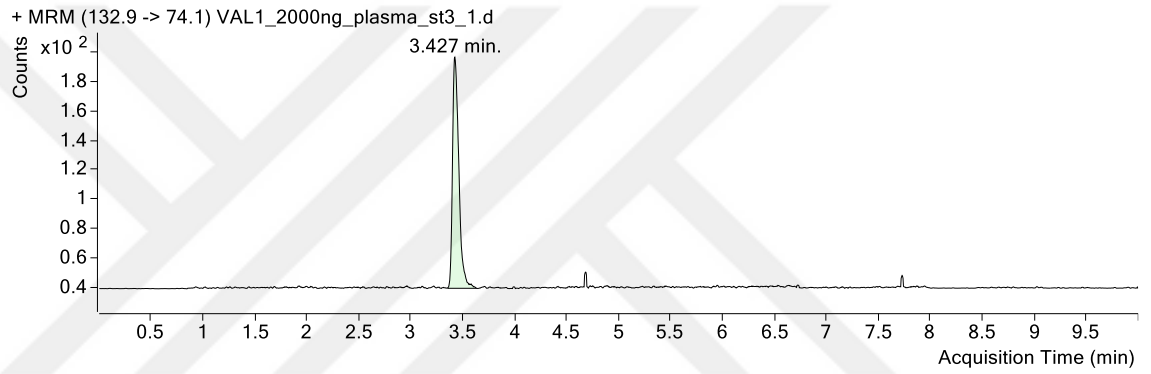
500 µL plazma 1, plazma 2, plazma 3, boş



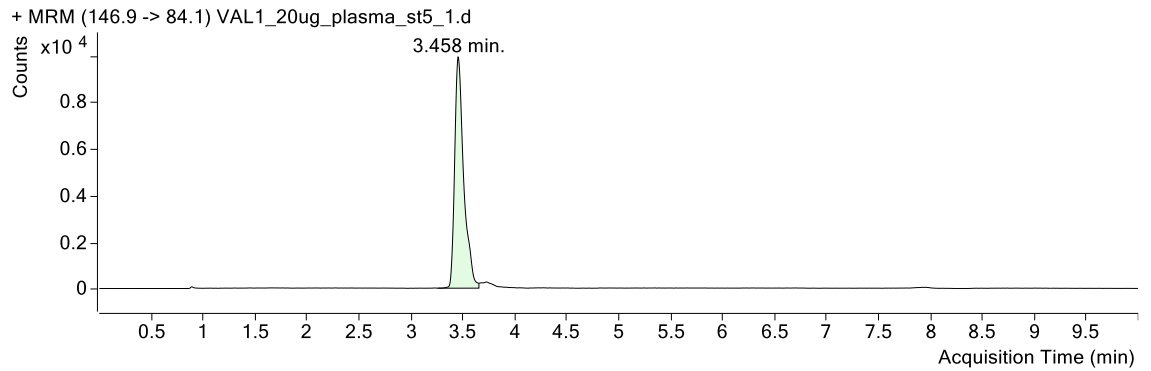
4. BULGULAR

4.1. L-Asparjinaz'ın Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Metod Geliştirme

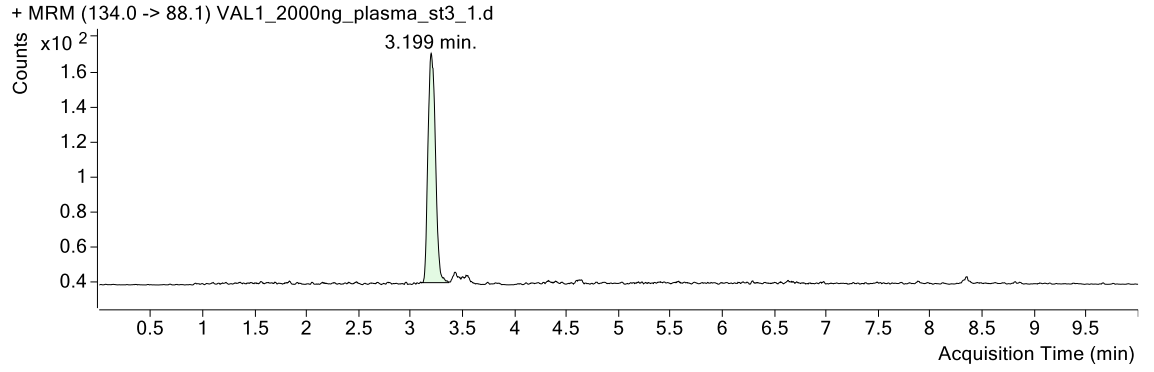
Amino asitler için en uygun öncül iyonlar bulunduğundan sonra en uygun koşullar belirlenmiştir. Yöntem analitik kolonda (Kinetex 2,6 μ m, 150 x 4,6 mm); asetonitril-25 mM amonyum asetat (pH:6.9) hareketli fazı ile 0.4 mL/dk akış hızında kütle dedektörü ile geliştirilmiştir. Amino asit enjeksiyonları ve iç standarta ait birer kromatogram Şekil 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5'de verilmiştir.



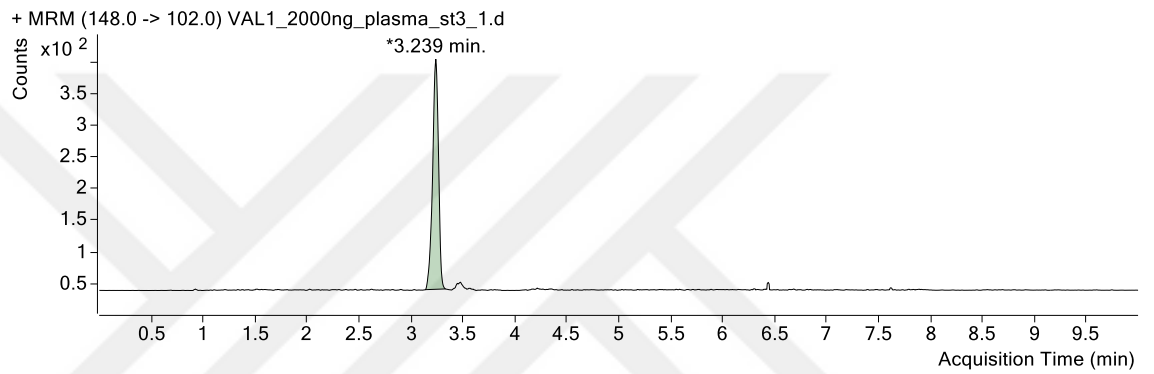
Şekil 4-1: 2000 ng/mL L-asparajin enjeksiyonuna ait örnek kromatogram



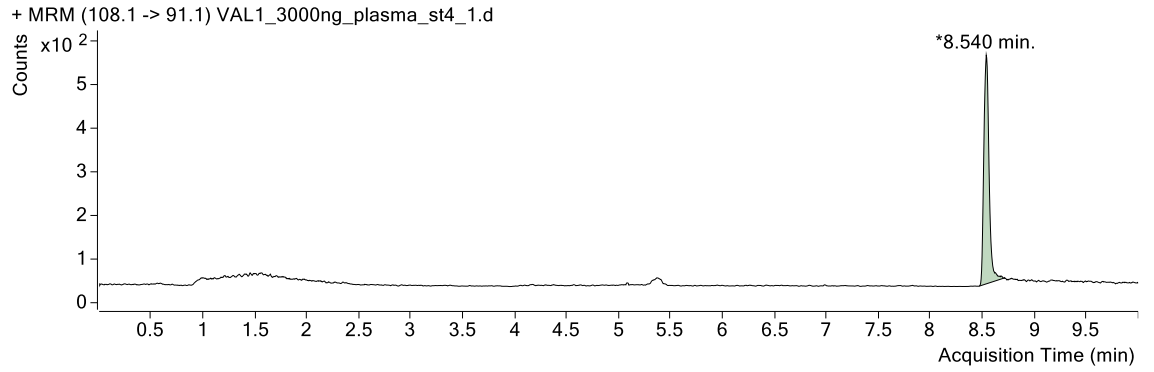
Şekil 4-2: 20 ng/mL L-glutamin enjeksiyonuna ait örnek kromatogram



Şekil 4-3: 2000 ng/mL L-aspartik asit enjeksiyonuna ait örnek kromatogram



Şekil 4-4: 2000 ng/mL L-glutamik asit enjeksiyonuna ait örnek kromatogram



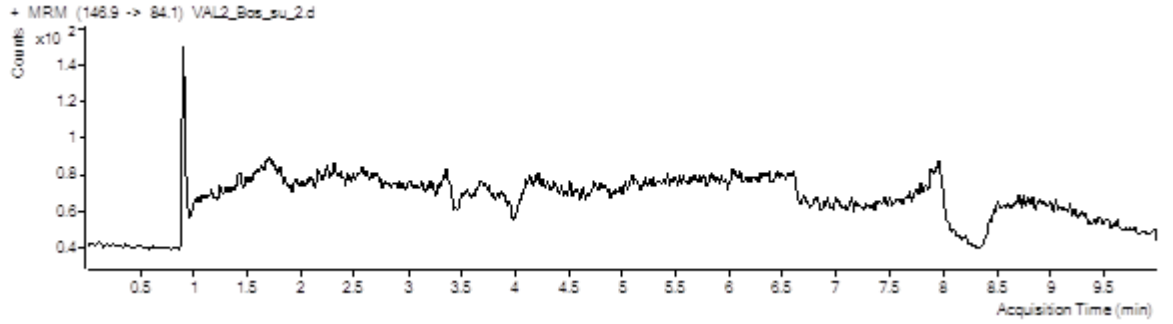
Şekil 4-5: Benzil amin (iç standart) enjeksiyonuna ait örnek kromatogram

4.2. Yöntem Validasyonu

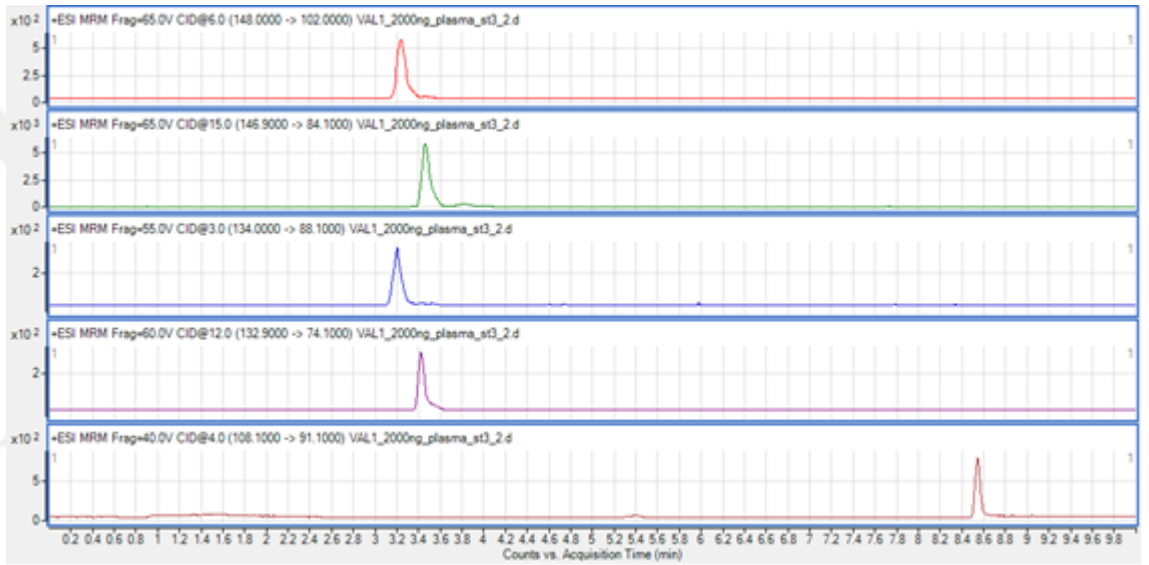
4.2.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin sınanması için boş enjeksiyona ait kromatogram (Şekil 4-6) verilmiştir. Mobil faz kromatogramında analitin alıkonma zamanında herhangi bir girişim görülmemiştir.

a



b

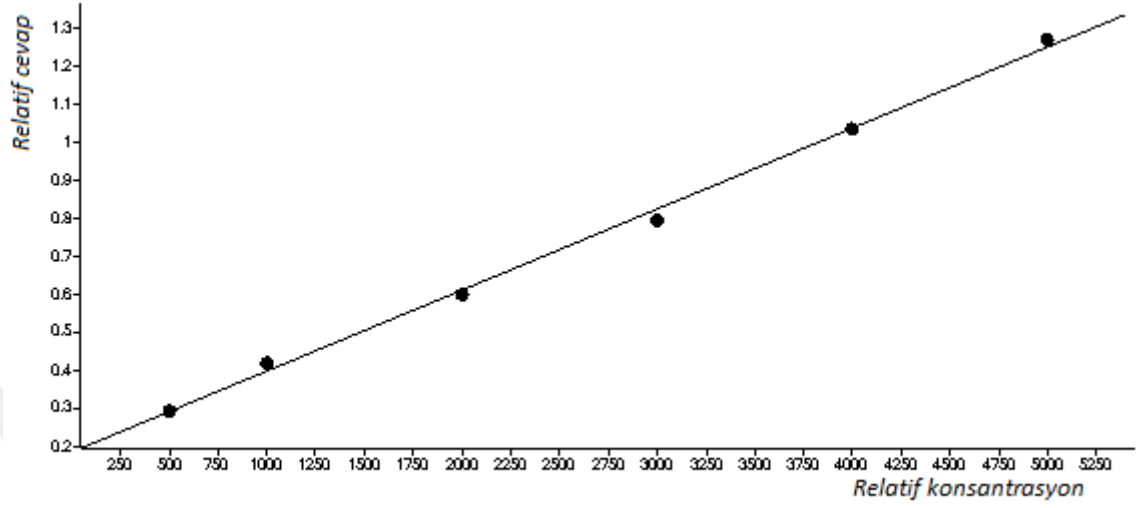


Şekil 4-6: Boş enjeksiyona ait bir kromatogram (a) ve Amino asitler ile IS kromatogramı (b)

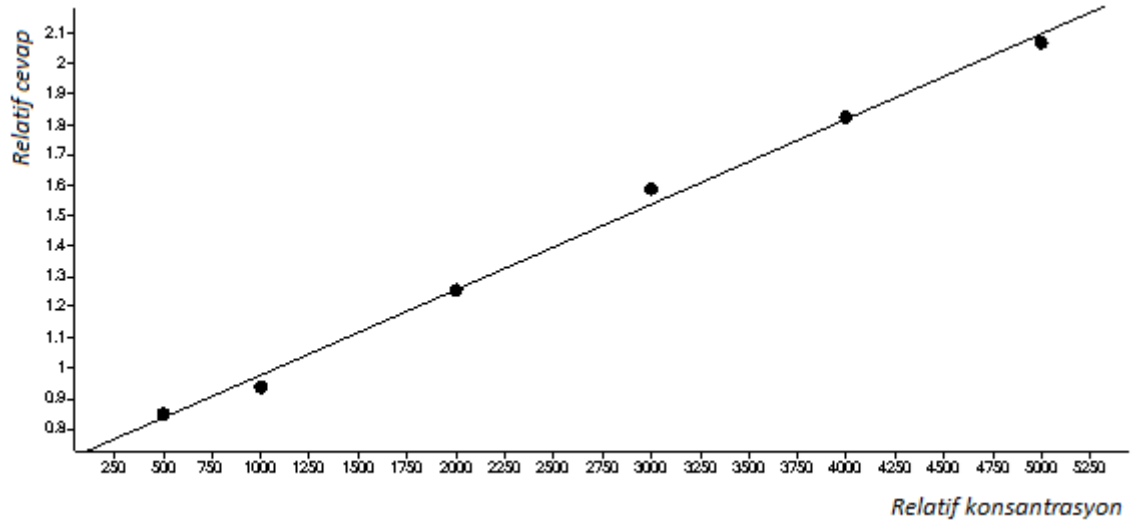
4.2.2. Doğrusallık

Amino asit çözeltileri L-asparajin, L-aspartik asit, L-glutamik asit için 500-5000 ng/mL, L-glutamin için 5-50 µg/mL aralığında 6 farklı konsantrasyonda 6'şar örnek hazırlandı ve ortalama pik yüksekliğine karşı grafiğe geçirildi. Validasyon serilerinde 2'şer adet kalibrasyon standartları hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Elde edilen verilerden çizilen örnek bir kalibrasyon eğrileri Şekil 4-7, 4-8, 4-9, 4-10'da verilmiştir. Kalibrasyon eğrileri korelasyon katsayıları 0.99 mertebesinde kabul edilebilir sınırlardadır (Tablo 4-1, 4-2, 4-3). Kalibrasyon eğrisi konsantrasyon değerlerinin

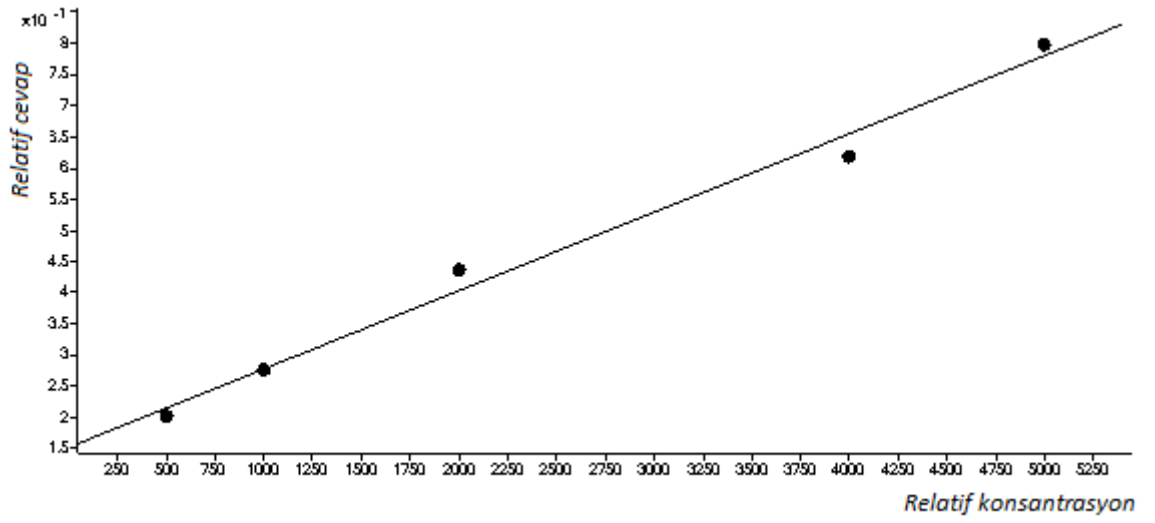
doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4-4, 4-5, 4-6, 4-7’de verilmiştir. Eğri değerleri doğru ve kesin olarak bulunmuştur.



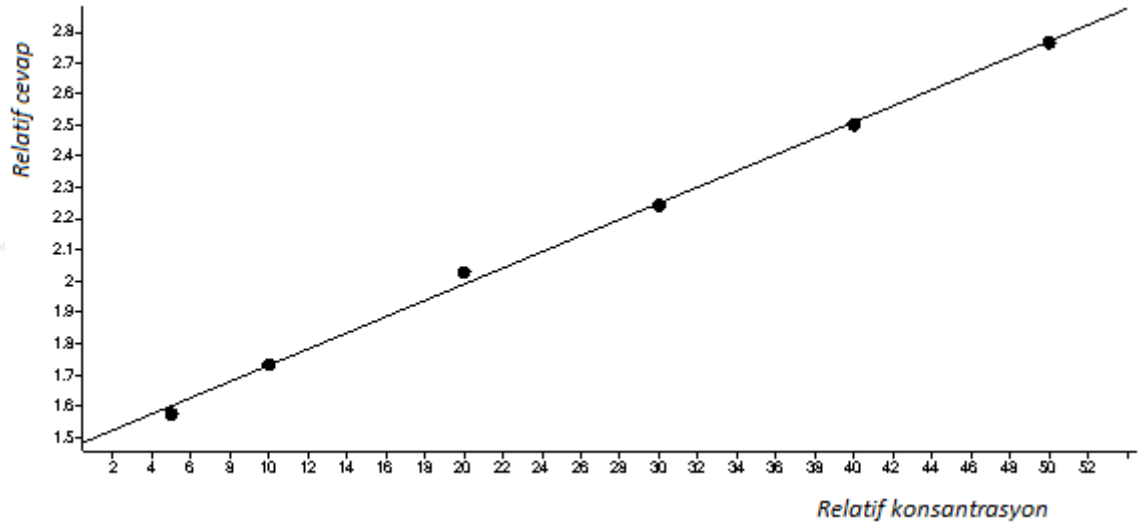
Şekil 4-7: L-aspartik asite ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 4-8: L-glutamik asite ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 4-9: L-asparajine ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 4-10: L-glutamine ait kalibrasyon eğrisi

Tablo 4-1: 1. Validasyon serisinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları

Amino asit VAL-1	Korelasyon Katsayısı	Doğru Denklemi
L-Aspartik Asit	0.99	$y=(2.13 \cdot 10^{-4})x + 0.18$
L-Glutamik Asit	0.99	$y=(2.81 \cdot 10^{-4})x + 0.70$

L-Asparajin	0.98	$y=(1.26 \cdot 10^{-4})x + 0.15$
L-Glutamin	0.99	$y=(0.03x) + 1.47$

Tablo 4-2: 2. Validasyon serisinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları

Amino asit VAL-2	Korelasyon Katsayısı	Doğru Denklemi
L-Aspartik Asit	0.99	$y=(2.57 \cdot 10^{-4})x + 0.15$
L-Glutamik Asit	0.99	$y=(3.26 \cdot 10^{-4})x + 0.60$
L-Asparajin	0.99	$y=(1.30 \cdot 10^{-4})x + 0.18$
L-Glutamin	0.99	$y=(0.02x) + 1.43$

Tablo 4-3: 3. Validasyon serisinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları

Amino asit VAL-3	Korelasyon Katsayısı	Doğru Denklemi
L-Aspartik Asit	0.99	$y=(2.52 \cdot 10^{-4}) * x + 0.16$
L-Glutamik Asit	0.99	$y=(2.85 \cdot 10^{-4}) * x + 0.66$
L-Asparajin	0.99	$y=(1.24 \cdot 10^{-4}) * x + 0.18$
L-Glutamin	0.99	$y=(0.025x) + 1.38$

Tablo 4-4: L-aspartik asit için kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik hesaplamaları

	Teorik	Val 1	Val 2	Val 3	Ortalama	%Hata	SD	%CV	n
	Cng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL					
ST1	500	509.10	429.30	425.79	454.73	90.95	47.12	10.36	3
ST2	1000	1105.08	946.47	924.27	991.94	99.19	98.61	9.94	3
ST3	2000	1938.88	2052.66	2181.22	2057.59	102.88	121.24	5.89	3
ST4	3000	2867.78	3183.82	2944.86	2998.82	99.96	164.78	5.49	3
ST5	4000	3986.51	4006.65	4203.49	4065.55	101.64	119.89	2.95	3
ST6	5000	5092.64	4881.10	4820.37	4931.37	98.63	142.93	2.90	3

Tablo 4-5: L-glutamik asit için kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik hesaplamaları

	Teorik	Val1	Val2	Val3	Ortalama	%Hata	SD	%CV	n
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL					
ST1	500	545.57	438.17	522.17	501.97	100.39	56.48	11.25	3
ST2	1000	854.40	907.34	928.44	896.73	89.67	38.15	4.25	3
ST3	2000	1997.05	2067.53	2100.13	2054.90	102.75	52.69	2.56	3
ST4	3000	3181.49	3123.60	2962.21	3089.10	102.97	113.63	3.68	3
ST5	4000	4023.21	4199.09	3961.68	4061.33	101.53	123.21	3.03	3
ST6	5000	4898.28	4764.27	5025.37	4895.98	97.92	130.56	2.67	3

Tablo 4-6: L-asparajin için kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik hesaplamaları

	Teorik ng/mL	Val1 ng/mL	Val2 ng/mL	Val3 ng/mL	Ortalama	%Hata	SD	%CV	n
ST1	500	401.56	LD	LD	401.56	80.31	LD	LD	1
ST2	1000	989.22	975.86	852.03	939.03	93.90	75.65	8.06	3
ST3	2000	2258.48	2062.69	2086.69	2135.95	106.80	106.79	5.00	3
ST4	3000	LD	2847.60	3027.04	2937.32	97.91	126.88	4.32	2
ST5	4000	3710.67	4213.31	4277.76	4067.25	101.68	310.48	7.63	3
ST6	5000	5140.07	4900.55	4756.49	4932.37	98.65	193.76	3.93	3

LD: Limit dışı değerler

Tablo 4-7: L-glutamin için kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik hesaplamaları

	Teorik µg/mL	Val1 µg/mL	Val2 µg/mL	Val3 µg/mL	Ortalama	%Hata	SD	%CV	n
ST1	5	4.03	4.50	4.84	4.46	0.89	0.41	9.13	3
ST2	10	10.09	9.34	10.27	9.90	0.99	0.49	4.98	3
ST3	20	21.57	20.40	20.56	20.84	1.04	0.63	3.04	3
ST4	30	29.80	31.53	28.45	29.93	1.00	1.55	5.17	3
ST5	40	39.71	40.62	32.30	37.54	0.94	4.57	12.16	3
ST6	50	49.80	48.61	41.05	46.49	0.93	4.75	10.21	3

4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk ve kesinlik hesaplamaları Bölüm 3.6'ya göre yapıldı. Düşük orta ve yüksek konsantrasyonlarda seçilen kalite kontrol örnekleri gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13, 4-14, 4-15, 4-16, 4-17, 4-18, 4-19, 4-20, 4-21, 4-22, 4-23'de verilmiştir. Bulunan değerlere göre yöntemin doğruluğu ve kesinliği uygun bulunmuştur. Bu değerlerle yöntemin tekrarlanabilir olduğuda görülmektedir.

Tablo 4-8: L-aspartik asitin KK1 1500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 ng/mL	Val 2 ng/mL	Val 3 ng/mL	Günler arası
	Ortalama	1660.38	1577.41	1608.26	1615.35
	%Hata	110.69	105.16	107.22	107.69
Gün içi	SD	26.67	77.70	55.33	64.24
	% CV	1.61	4.93	3.44	3.98
	n	6	6	6	18

Tablo 4-9: L-aspartik asitin KK2 2500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 ng/mL	Val 2 ng/mL	Val 3 ng/mL	Günler arası
	Ortalama	2563.62	2448.55	2484.07	2498.74
	%Hata	102.54	97.94	99.36	99.95
Gün içi	SD	276.87	45.87	89.86	167.30
	% CV	10.80	1.87	3.62	6.70

n	6	6	6	18
----------	---	---	---	----

Tablo 4-10: L-aspartik asitin KK3 3500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 ng/mL	Val 2 ng/mL	Val 3 ng/mL	Günler arası
	Ortalama	3572.00	3173.75	3271.61	3339.12
	%Hata	102.06	90.68	93.47	95.40
Gün içi	SD	308.28	56.00	91.62	248.49
	% CV	8.63	1.76	2.80	7.44
	n	6	6	6	18

Tablo 4-11: L-aspartik asitin KK4 4500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 ng/mL	Val 2 ng/mL	Val 3 ng/mL	Günler arası
	Ortalama	4540.87	4107.67	4113.41	4253.98
	%Hata	100.91	91.28	91.41	94.53
Gün içi	SD	65.94	127.87	83.51	227.42
	% CV	1.45	3.11	2.03	5.35
	n	6	6	6	18

Tablo 4-12: L-glutamik asitin KK1 1500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 ng/mL	Val 2 ng/mL	Val 3 ng/mL	Günler arası
	Ortalama	1308.57	1497.70	1517.78	1441.35
	%Hata	87.24	99.85	101.19	96.09
Gün içi	SD	31.94	105.00	104.30	127.07
	% CV	2.44	7.01	6.87	8.82
	n	6	6	6	18

Tablo 4-13: L-glutamik asitin KK2 2500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 ng/mL	Val 2 ng/mL	Val 3 ng/mL	Günler arası
	Ortalama	2247.95	2303.09	2438.84	2329.96
	%Hata	89.92	92.12	97.55	93.20
Gün içi	SD	59.86	52.16	154.83	125.37
	% CV	2.66	2.26	6.35	5.38
	n	6	6	6	18

Tablo 4-14: L-glutamik asitin KK3 3500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 ng/mL	Val 2 ng/mL	Val 3 ng/mL	Günler arası
	Ortalama	3264.77	3138.75	3462.05	3288.52
	%Hata	93.28	89.68	98.92	93.96

Gün içi	SD	218.88	88.65	145.53	203.83
	% CV	6.70	2.82	4.26	6.20
	n	6	6	6	18

Tablo 4-15: L-glutamik asitin KK4 4500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 ng/mL	Val 2 ng/mL	Val 3 ng/mL	Günler arası
	Ortalama	4092.95	4219.12	4629.46	4313.84
	%Hata	90.95	93.76	102.88	95.86
Gün içi	SD	206.64	176.92	197.10	297.89
	% CV	5.05	4.19	4.26	6.91
	n	6	6	6	18

Tablo 4-16: L-asparajin KK1 1500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 ng/mL	Val 2 ng/mL	Val 3 ng/mL	Günler arası
	Ortalama	1684.87	1516.05	1553.09	1584.67
	%Hata	112.32	101.07	103.54	105.64
Gün içi	SD	33.70	108.06	47.82	99.99
	% CV	2.00	7.13	3.08	6.31
	n	6	6	6	18

Tablo 4-17: L-asparajın KK2 2500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 ng/mL	Val 2 ng/mL	Val 3 ng/mL	Günler arası
	Ortalama	2477.89	2346.59	2329.18	2379.06
	%Hata	99.12	93.86	93.17	95.16
Gün içi	SD	145.94	134.49	156.63	151.74
	% CV	5.89	5.73	6.72	6.38
	n	5	6	6	17

Tablo 4-18: L-asparajın KK3 3500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 ng/mL	Val 2 ng/mL	Val 3 ng/mL	Günler arası
	Ortalama	3303.18	3124.21	3130.44	3179.05
	%Hata	94.38	89.26	89.44	90.83
Gün içi	SD	163.63	153.78	157.71	169.37
	% CV	4.95	4.92	5.04	5.33
	n	5	6	6	17

Tablo 4-19: L-asparajın KK4 4500 ng/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 ng/mL	Val 2 ng/mL	Val 3 ng/mL	Günler arası
	Ortalama	4200.57	4069.30	4241.44	4170.44

	%Hata	93.35	90.43	94.25	92.68
Gün içi	SD	275.79	268.44	386.90	305.45
	% CV	6.57	6.60	9.12	7.32
	n	6	6	6	18

Tablo 4-20: L-glutamin KK1 15 µg/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 µg/mL	Val 2 µg/mL	Val 3 µg/mL	Günler arası
	Ortalama	15.88	15.29	15.53	15.55
	%Hata	105.89	101.91	103.55	103.66
Gün içi	SD	0.78	1.23	0.78	0.94
	% CV	4.93	8.04	5.02	6.02
	n	5	6	6	17

Tablo 4-21: L-glutamin KK2 25 µg/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1µ g/mL	Val 2 µg/mL	Val 3 µg/mL	Günler arası
	Ortalama	24.25	24.62	24.56	24.48
	%Hata	97.00	98.46	98.25	97.90
Gün içi	SD	1.77	0.73	0.86	1.15
	% CV	7.29	2.97	3.51	4.70

n	6	6	6	18
----------	---	---	---	----

Tablo 4-22: L-glutamin KK3 35 µg/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

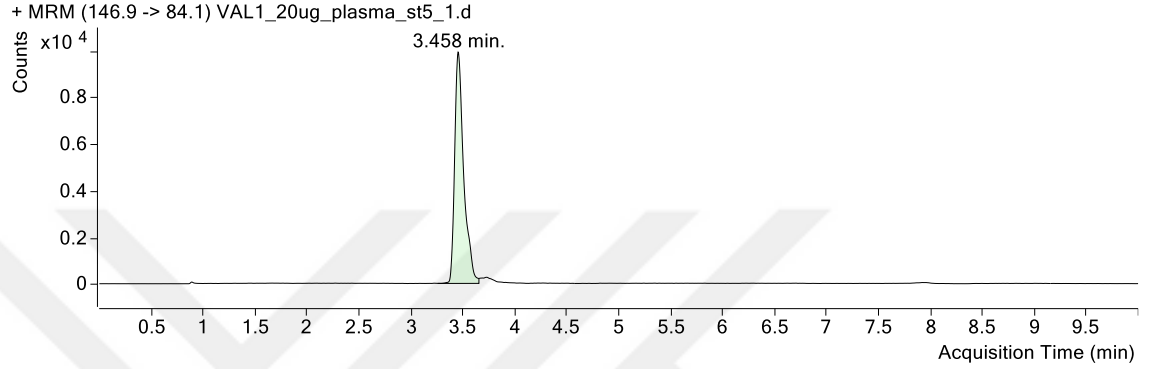
	Teorik	Val 1 µg/mL	Val 2 µg/mL	Val 3 µg/mL	Günler arası
	Ortalama	34.82	38.96	36.56	36.58
	%Hata	99.48	111.32	104.45	104.52
Gün içi	SD	2.57	1.01	0.67	2.41
	% CV	7.37	2.59	1.83	6.58
	n	4	3	3	10

Tablo 4-23: L-glutamin KK4 45 µg/mL için validasyon serilerinin gün içi ve günler arası hesaplamaları

	Teorik	Val 1 µg/mL	Val 2 µg/mL	Val 3 µg/mL	Günler arası
	Ortalama	41.01	42.65	41.98	41.88
	%Hata	91.14	94.79	93.29	93.07
Gün içi	SD	1.03	2.17	1.86	1.79
	% CV	2.52	5.09	4.44	4.27
	n	6	6	6	18

4.2.4. Dedeksiyon ve Miktar Tayini Limiti

Bölüm 3.6.4’de verilen denklemlere göre hesaplanan gözlenebilme (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) ise Asn, Asp ve Glu için sırasıyla 100-500 ng/mL, Gln için 1-5 µg/mL olarak bulunmuştur. 20 µg/mL L-glutamine çözeltisine ait bir kromatogram Şekil 4-11’de verilmiştir.



Şekil 4-11: 20 µg/mL L-glutamin enjeksiyonuna ait bir kromatogram

4.2.5. Matriks Etkisi

Bölüm 3.6.5’e göre yapılan çalışmalar sonucu aşağıdaki veriler elde edilmiştir. Elde edilen değerler Tablo 4-24’da verilmiştir. Matriks etkisi hesaplamaları aşağıdaki gibidir.

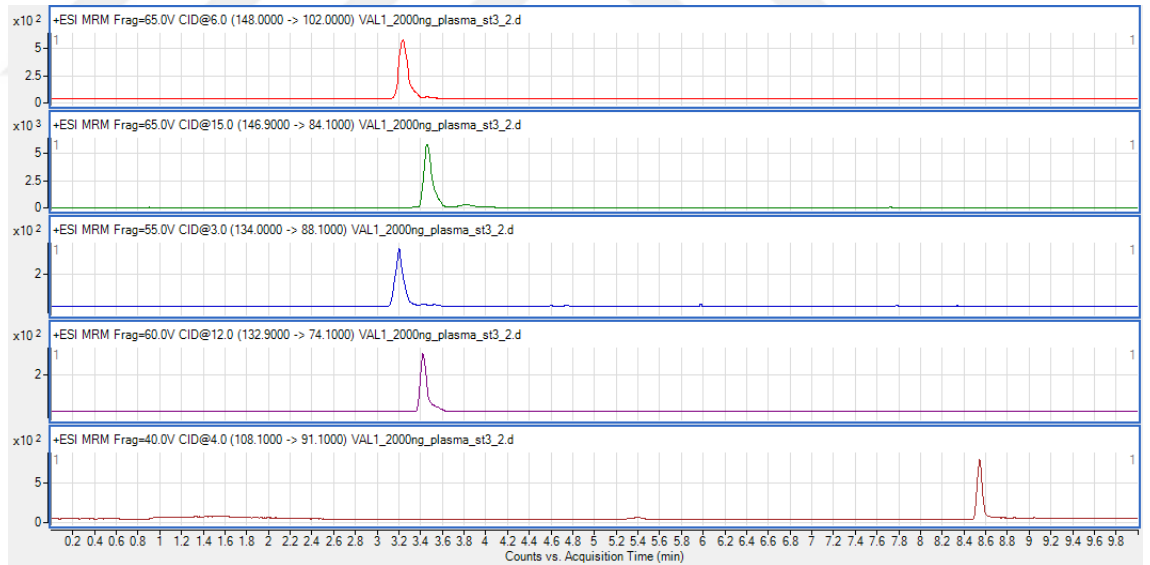
Tablo 4-24: Matriks etkisinin hesaplanması

Amino asit	ng	Dedektör cevabı	Dedektör cevabı	Matriks etkisi
L-Aspartik Asit	2000	1553	2055	-32.32
L-Glutamik Asit	2000	1975	3997	-10.38
L-Asparajin	2000	1893	1363	27.99
L-Glutamin	2000	65600	60496	7.78

4.2.6. L-Asparjinazın, Asparajin ve Substrat İlişkisi

Bir enzimin aktivitesi, o enzim ile katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle uygun şartlardabelirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Aktivitesi veya etkinliği yüksek olan bir enzim, belirli bir zamanda daha fazla substrat molekülünü ürüne çevirebilir. Enzimatik bir reaksiyonun hızına etki eden faktörlerden bazıları: Isı veya sıcaklık, substrat konsantrasyonu, pH, , zaman, ışık ve diğer fiziki etmenler, enzim derişimi, iyonların doğası ve konsantrasyonu, hormonlar ve diğer biyokimyasal özellikler, reaksiyon ürünleri.

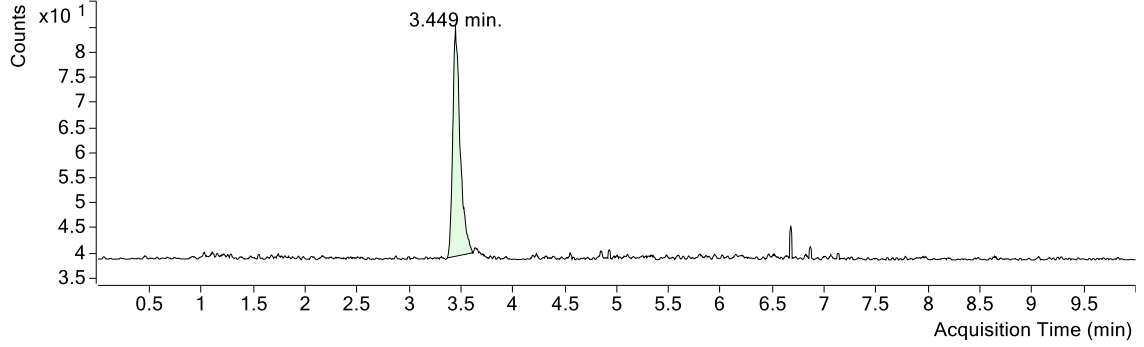
Yapılan deney tasarımları sonucunda beklenen yönde sonuçlar elde edildi. L-asparajinaz enzimi substratlarla tepkimeye girdi ve aspartik asit ve glutamik asit oluşumu gözlemlendi ve kromatogramlar ile gösterildi (Şekil 4-13, Şekil 4-14). Yüzde olarak dönüşümleri ise tablo olarak verilmiştir (Tablo 4-25, Tablo 4-26). L-asparajin tükendi ve L-glutaminde azalma gözlemlendi. Amino asit karışımına ait bir enjeksiyon Şekil 4-12’de verilmiştir.



Şekil 4-12: 2000 ng/mL amino asit karışımı enjeksiyonuna ait ayrılmış bir kromatogram

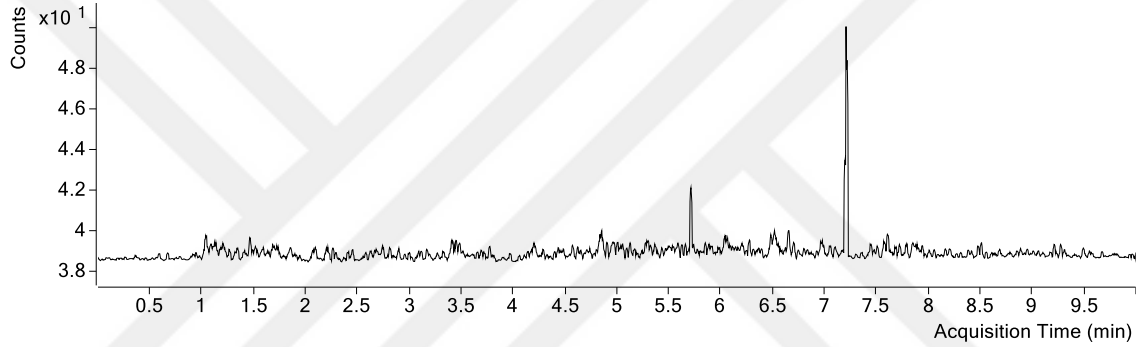
a

+ MRM (132.9 -> 74.1) plasma_Bos_1.d



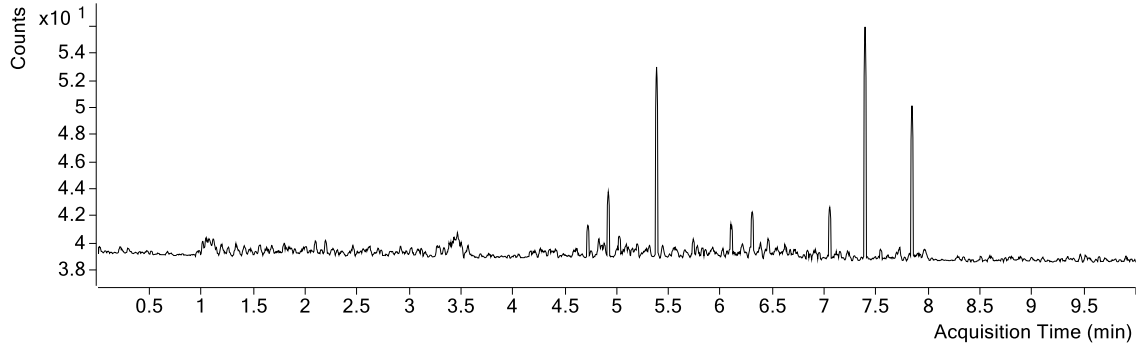
b

+ MRM (132.9 -> 74.1) plasma_ilac_15dk_1.d



c

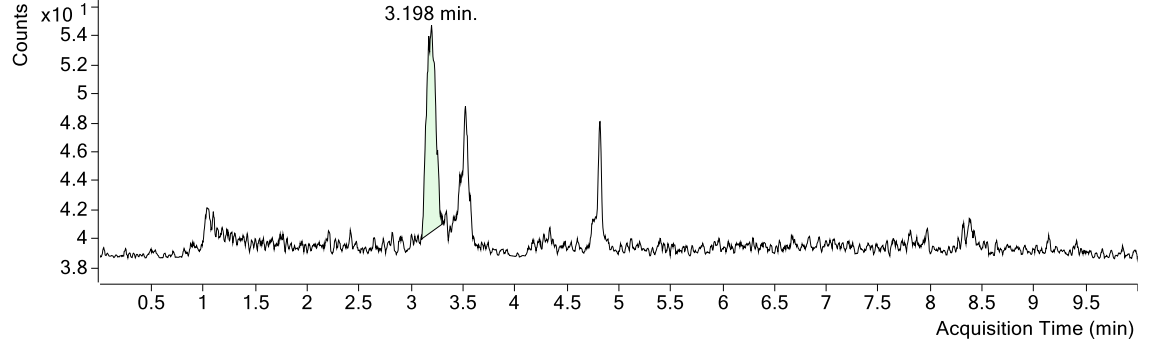
+ MRM (132.9 -> 74.1) plasma_enzim_15dk_1.d



Şekil 4-13: Enzim ve ilaç eklenmeden L-asparajin kromatogramları, plasma (a), ilaç ile 15 dk reaksiyon sonrası (b), enzim ile 15 dk reaksiyon sonrası (c)

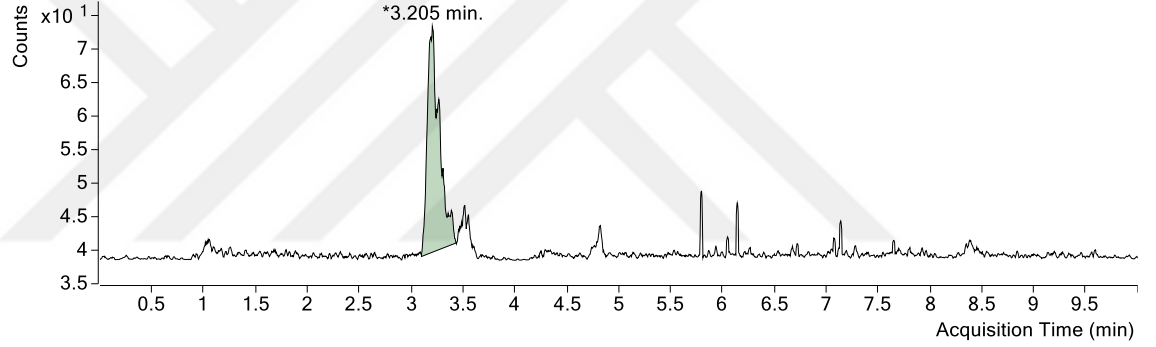
a

+ MRM (134.0 -> 88.1) plasma_Bos_2.d



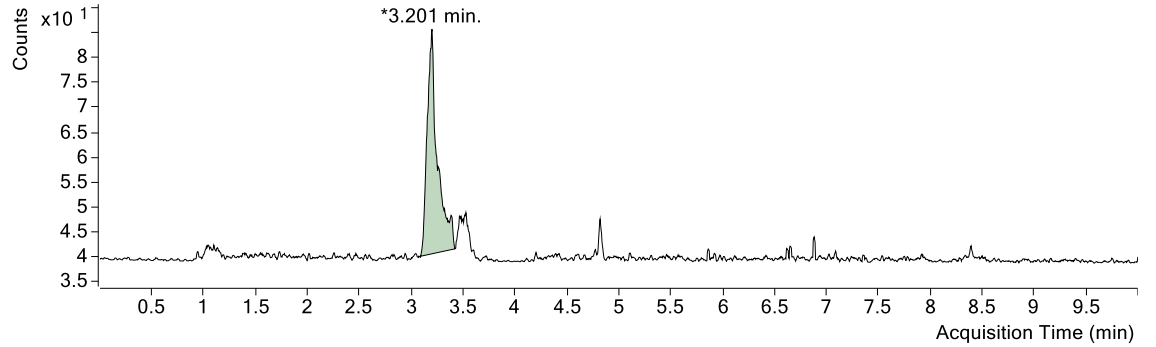
b

+ MRM (134.0 -> 88.1) plasma_ilac_15dk_1.d



c

+ MRM (134.0 -> 88.1) plasma_enzim_15dk_1.d



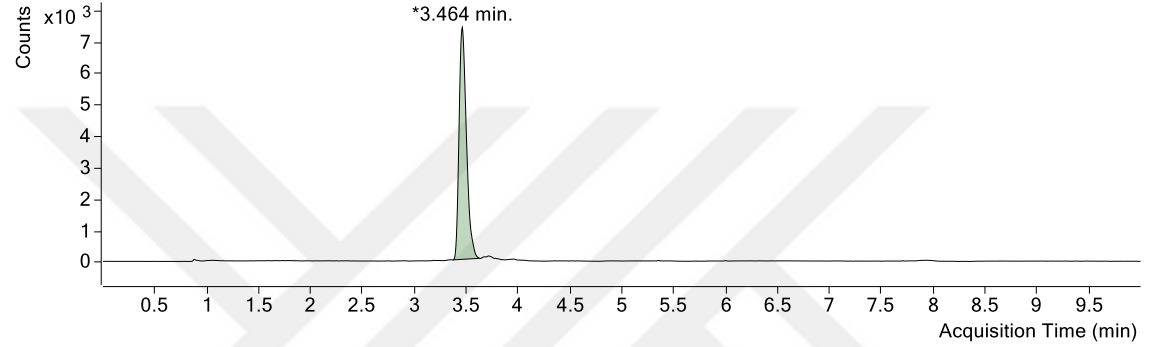
Şekil 4-14: Enzim ve ilaç eklendikten sonra L-aspartik asit kromatogramları, plasma (a), ilaç ile 15 dk reaksiyon sonrası (b), enzim ile 15 dk reaksiyon sonrası (c)

Tablo 4-25: Asparajinin aspartik asite dönüşüm oranları

	L-asparajin alanı	L-aspartik asit alanı	Asn, Asp Dönüşüm
Boş	226	84	
İlaç	0	276	% 100
Enzim	0	311	% 100

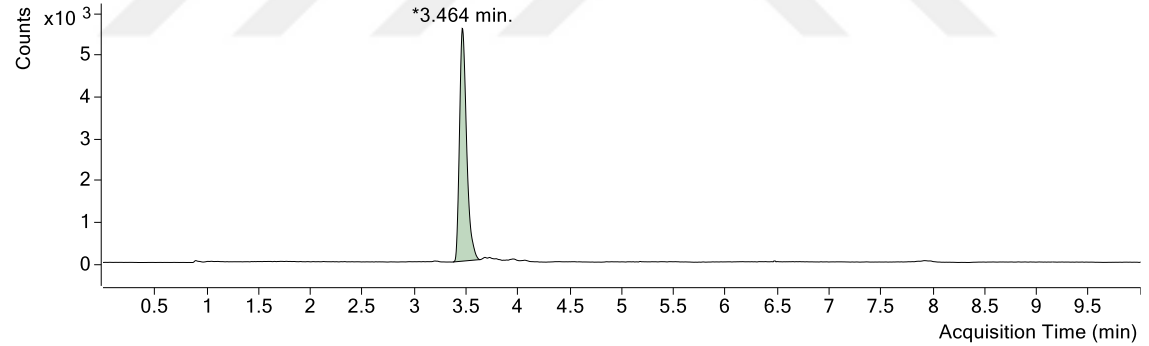
a

+ MRM (146.9 -> 84.1) plasma_Bos_1.d



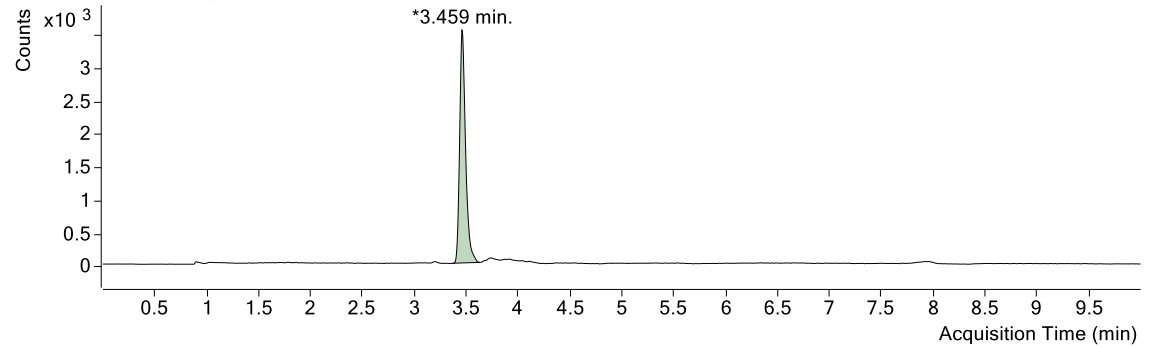
b

+ MRM (146.9 -> 84.1) plasma_ilac_15dk_1.d



c

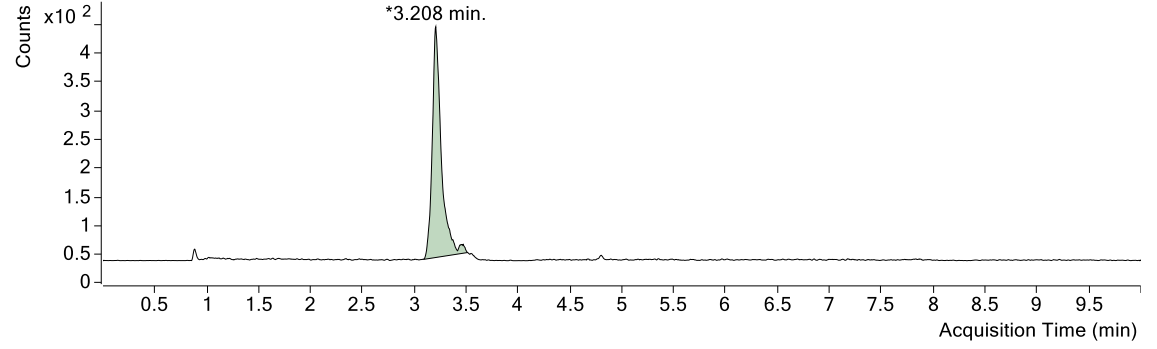
+ MRM (146.9 -> 84.1) plasma_enzim_15dk_1.d



Şekil 4-15: Enzim ve ilaç eklenmeden L-glutamin kromatogramları plasma (a), ilaç ile 15 dk reaksiyon sonrası (b), enzim ile 15 dk reaksiyon sonrası (c)

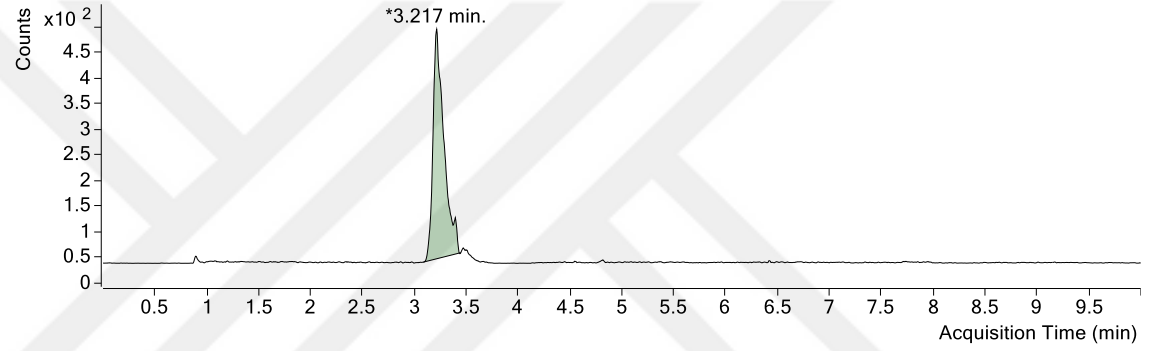
a

+ MRM (148.0 -> 102.0) plasma_Bos_1.d



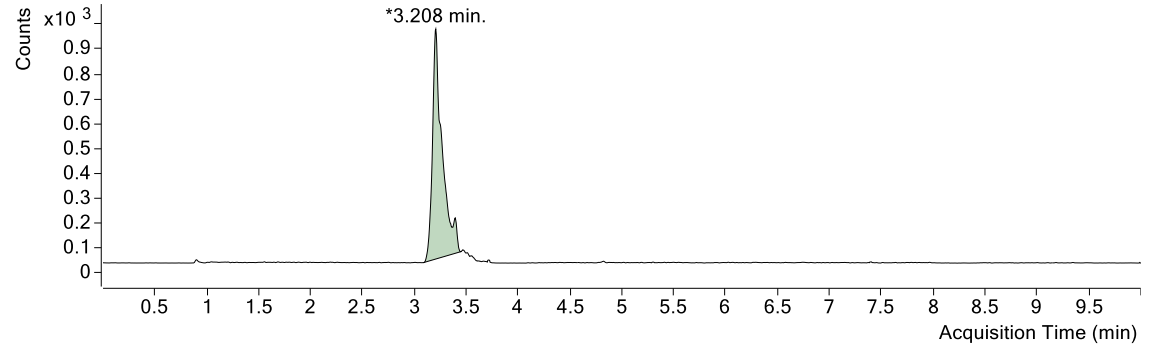
b

+ MRM (148.0 -> 102.0) plasma_ilac_15dk_1.d



c

+ MRM (148.0 -> 102.0) plasma_enzim_15dk_1.d



Şekil 4-16: Enzim ve ilaç eklendikten sonra L-glutamik asit kromatogramları plasma
(a), ilaç ile 15 dk reaksiyon sonrası (b), enzim ile 15 dk reaksiyon sonrası (c)

Tablo 4-26: Glutaminin, glutamik asite dönüşüm oranları

	L-glutamin alanı	L-glutamik asit alanı	Gln, Glu Dönüşüm
Boş	36576	2465	
İlaç	26639	3316	% 87.55
Enzim	14018	6125	% 56.30

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde L-ASPZ enzimi saf olarak kullanıldığı için dönüşüm oranı daha fazladır. L- asparajinaz birincil görevi asparjini, aspartik asite çevirmek olduğu için dönüşüm %100 olarak gerçekleşmiştir. İkincil etki mekanizması olarak glutamini glutamik asite çevirmektir. Beklenen dönüşümler gerçekleşmiştir.

5. TARTIŞMA

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) çocuklar arasında en yaygın kanser türüdür. ALL'nin tedavi oranı terapötik yaklaşımlar sayesinde %80'i aşmıştır. Bunda L-asparjinaz önemli bir rol oynamıştır. ALL'deki etkisini L-Asparajinin plazmada düzeyini düşürerek gerçekleştirir. L-Asparjinaz ile doymuşlaşan tümör hücresi besinsiz kalır ve çoğalamaz (1). L-ASPZ aktivitesinin ve L-ASN düzeyinin tedavide izlenmesi önemlidir.

Bu nedenle L-asparajin, L-glutamin, L-aspartik asit ve L-glutaminin kromatografik ayırımı ve miktar tayini için en uygun koşulların belirlenmesi pH, hareketli faz yüzdeleri, analitik kolonlar ve sıcaklığın analizler üzerinde etkileri araştırılarak bu amino asitlerin analizleri için yöntem geliştirilmiştir.

Amino asitlere ait ana iyonların molekül ağırlıklarının birbirine yakın olmasından dolayı farklı parçalanma ürünlerinden yola çıkılarak amino asit standartlarına ait pikler belirlenmiştir. MS/MS'in avantajı sayesinde parçalanma ürünleri üzerinden daha seçici bir metod geliştirilmiştir. Çalışılan amino asitlerin hepsi pozitif modda uygun parçalanma ürünleri vermiştir.

Amino asitlerin insan metabolizmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Birçok çalışma, insan plazmasının amino asit profillerinin kanser, karaciğer ve böbrek dolaşımı hastalıkları, genetik hastalıklar gibi durumlarda farklılıklar olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, plazma amino asit konsantrasyonlarını güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde ölçmek önemlidir (40).

Amino asitlerin pK_a ve pK_b değerleri göz önüne alındığında (Tablo 2-1) yüksek veya düşük pH değerlerinde çalışmak analitleri iyonlaştıracağından dolayı pH: 6.9'da çalışmak stabil bir hareketli faz sağlamıştır.

Amino asitleri R (yan zincir) gruplarına göre ayırdığımızda glutamik ve aspartik asit, asidik (negatif yüklü) grupta ve iki asitli karboksil grubuna sahiptir. pH 6-7 arasında tam iyonize olmaktadır ve suda negatif yüke sahiptirler. Glutamin ve asparajin ise hidrofilik (polar) grupta yer alır ve çözünürlükleri yüksektir.

Amino asitlerin çoğunluğu kromofor gruplara sahip olmadığından görünür bölgede ışığı absorblamaz. Yalnız üç tanesi (tirozin, triptofan ve fenilalanin) önemli miktarda ultraviyole ışığı soğurur.

Amino asitlerin analizleri için Floresans, UV ve MS gibi tekniklerle çalışılmıştır (22, 29, 17). Doğal UV ve floresans özellikleri olmadıkları için türevlendirme gereklidir. Spektrofotometrik yöntemlerde daha çok kolon öncesi türevlendirme veya uygun cihazla analiz öncesinde türevlendirme yapılmıştır (23, 24,26). Çalışmalarda daha çok orto-fitalaldehit (OPA) ve 9-fluorenilmetiloksikarbonil (FMOC) türevlendirme ajanı olarak kullanılmıştır (22, 23, 24, 26). Bu çalışmalardaki sorunlardan biri türevlendirmenin hızlı gerçekleşmesi fakat türevlerin uzun süre stabil olmamasıdır. Ayrıca türevlendirme pH'sı, süresi gibi parametrelere dikkat edilmelidir. Çünkü aminoasit ve OPA'dan oluşan oluşan izoindol gruplarındaki kararsızlık ve ajanların kendi kararsızlığı türevlendirmenin dezavantajlarındandır (41).

Türevlendirme yönteminin kullanılmamasının nedeni birçok dezavantaja sahip olmasıdır. Türevlendirme ajanları hazırlandıktan kısa bir süre sonra bozunmaktadır. OPA 9 günden sonra dolapta bozunmaktadır ve reaktantlar arasında en az 7 dakika reaksiyon süresi olmalıdır (41). Kullanılan ajanlar ayrıca pahalıdır. Buna ek olarak, oluşan türevler hızlıca analiz edilmelidir yoksa türevlerde bozunabilir. Genel olarak kolon öncesi ve kolon sonrası olmak üzere iki farklı türevlendirme tekniği kullanılmaktadır. Eğer cihaz üzerinde türevlendirme tekniği kullanılacaksa otomatik örnekleyicinin uygun özelliklere sahip olması gereklidir.

Türevlendirme karmaşık, zaman alıcı ve pozitif iyon modunda iyonlaşma derecesini azaltır. GC-MS ve HPLC ile karşılaştırıldığında, kütle spektrometrisi (LC-MS) sıvı kromatografisi ile daha yüksek hassasiyet ve stabiliteye sahiptir. Şimdiye kadar birkaç LC-MS yöntemi yayınlanmıştır. Bununla birlikte, bazı yöntemler gıda analizlerinde kullanılmıştır, bazı yöntemlerin yüksek tespit limitleri vardır veya kromatografik ayrımı iyileştirmek için türevlendirmeye ihtiyaç duymuştur (42).

Ayırım için yaygın olarak kullanılan silika destekli C 18 amino asit analizi için geliştirilen kolon ile çalışmalar yapıldı. Bu kolon ters faz malzemeden yapılmıştır ve protein peptid hidroliz ürünleri olan amino asitleri ayırmaya yarar. Kolon ultra saf (tip B) silika desteğini, mobil faz ortamından ve yüksek pH'da korumak için extra dense bonding (XDB) teknolojisini kullanır. Ultra yüksek saflıkta (≥ 99.995 SiO₂), gözenekli

silika desteği kullanılarak özel olarak hazırlanmıştır. Bu özel silika desteği (Tip B), bazik ve yüksek polar bileşiklerin güçlü adsorpsiyonunu azaltmak veya ortadan kaldırmak için tasarlanmıştır. Bağlı fazlı paketleme, silika yüzeyinin maksimum deaktivasyonunu elde etmek için tescilli reaktifler ve prosedürler kullanılarak iki kez kapatılır. Tek tip küresel parçacıklar, nominal yüzey alanı $180 \text{ m}^2/\text{g}$ ve kontrollü gözenek boyutu 80 Å olan silika desteğine dayanmaktadır (43).

Çalışılan farklı kolonlardan biri olan C8 kolon, özellikle daha yüksek basınç altında çalışması (600 bara kadar) için tasarlanmıştır ve yüksek hızlı ters fazlı HPLC için yüksek performanslı bir mikro partikül C8 dolgu maddesi ile doldurulmuştur. Sabit fazı sterik olarak korunmuş C8 sabit fazını özel hazırlanmış yüksek saflıkta porlu silika mikro kürelerle kimyasal olarak bağlayarak yapılmıştır. Özel silika desteği, bazik bileşiklerin güçlü adsorpsiyonunu azaltmak veya ortadan kaldırmak için tasarlanmıştır. Yoğun şekilde kaplanmış, sterik olarak korunan diizopropil n-oktilsilan sabit fazı, kimyasal olarak stabildir ve daha uzun kolon ömrü sağlar. Sonuç olarak, C8 bazik, nötr veya asidik numuneler için kullanılabilen stabil, ters fazlı bir kolondur. Bağlanmış fazın sterik koruması, hareketli fazların neden olduğu bozulmaya karşı direnç gösterdiğinden, agresif mobil fazlar (örneğin $\text{pH} < 2$, yüksek iyonik güç, iyon çifti katkı maddeleri, vb.) ile kullanım için özellikle uygundur. Bu malzemenin ayrıca 80 °C 'ye kadar sıcaklıklarda çalıştırıldığında stabil olduğu gösterilmiştir. Bu özellikler, uzun vadeli stabilite ve tekrarlanabilirlik gerektiren yöntemlerde kullanım için özellikle önemlidir. C8, özellikle düşük temel düzey gerektiren yüksek hassasiyetli dedektörler kullanan analizler için uygundur (örneğin, kütle spektrometreleri). Tek tip, küresel C8 parçacıklarının kontrollü gözenek boyutu 80 Å ve yüzey alanı $180 \text{ m}^2/\text{g}$ 'dir. Kolonlar, optimum kolon verimi sağlamak için tescilli, yüksek basınçlı, bulamaç yükleme tekniği kullanılarak tek tip bir yatak yoğunluğuna yüklenir (44).

Analizler sonucunda validasyon için en uygun kolon, $(2,6 \text{ µm}, 100 \text{ Å})$ core-shell teknolojisine sahip kolon seçildi. Sabit faz olarak pentaflorofenil içereir ve TMS ile kapatılmıştır (endcapping). Nano yapılanma teknolojisiyle çalışan sol-jel işleme teknikleri, çekirdek kabuk partikülü oluşturmak için katı dayanıklı, homojen porlu kabuk, katı silika üzerine yerleştirilir. Bu partikül morfolojisi, tamamen gözenekli partiküllere kıyasla daha az bant genişlemesi ile sonuçlanır ve bu nedenle son derece yüksek verimlilik sağlar. Yüksek partikül yoğunluğu, Eddy difüzyonun bant genişletme

etkilerini azaltan optimal yatak yapısının oluşturulmasına yardımcı olur benzer şekilde HPLC ve UHPLC sistemlerinde azaltılmış difüzyon yolu verimliliği artırır (45).

HILIC'in ters faza göre benzersiz ayrımı ve ortogonalitesi, onu ayırma gücünü artırabilen çok boyutlu kromatografi için ideal bir yöntem haline getirir. Seçicilik söz konusu olduğunda, HILIC, günümüzde uygulanan iki ana kromatografik teknik olan ters faz ve iyon değişim kromatografisi (SCX) ile iyi rekabet edebilir (46).

HILIC-ESI-MS'in mobil fazı sulu bir bileşen içerdiğinden, biyolojik matrikslerin sulu yapısından kaynaklanan girişim, normal faza kıyasla artık bir endişe kaynağı değildir. Ek olarak, ESI-MS ile birleştirilmiş HILIC, potansiyel olarak daha yüksek bir hassasiyet sağlar çünkü HILIC modundaki daha yüksek organik çözücü yüzdesi, ESI sırasında daha verimli desolvasyona katkıda bulunur (47).

Çalışmada türevlendirme ajanları kullanmayarak kimyasal kullanımı azaltılmıştır ayrıca zamandan kazanılmıştır. HPLC-MS/MS sistemi sayesinde analiz süresi ve akış hızı diğer yöntemlere göre düşürülmüştür bundan dolayı daha az mobil faz sarfıyatı sağlanmıştır (18, 27).

L-asparjinaz aktivite çalışmaları için aminoasit içeren plazma örnekleri üzerine enzim ve tedavide kullanılan ilaç (Leunase), benzer konsantrasyonlarda ilave edilmiş ve vücut şartları simule edilmiştir. Enzim aktivitesi belli sürelerde durdurulup elde edilen farklı numuneler analiz edilmiştir. L-asparajin seviyesinde azalma gözlenmiş ve enzimin görevini yerine getirdiği gözlemlenmiştir. Bu da yöntemin doğru çalıştığının göstergesidir.

Amino asitlerin molekül ağırlıkları birbirine yakın olduğundan ve benzer molekül yapılarına sahip olduklarından dolayı birbirine yakın alıkonma sürelerine sahiptirler. HPLC-MS/MS cihazının avantajı moleküller ne kadar yakın değerlere sahip olsalar da farklı parçalanma iyonları seçildiğinden dolayı seçici bir metod geliştirilmiştir. Birçok farklı kolonda farklı mobil fazlarda ön çalışmalar yapılmıştır. HILIC kolonda çalışmamızın sebebi en uygun ayrımı sağlamasından ötürüdür. İyon çifti oluşturulma sebebi ise hem pikleri daha belirginleştirmesi hemde alıkonma sürelerini düşürmesinden dolayıdır.

Amino asitlerin pKa'ları tabloda (Tablo: 2-1) görüldüğü gibi birbirine yakındır bu yüzden birbirinden ayırmak zordur. Farklı kolonlar ile çalışmalar yapıldıktan sonra

HILIC kolonun polar özelliğinden dolayı bu kolonla çalışıldı. Bununla beraber ayırıcılığı artırmak için trifloro asetik asit, sodyum dodesil sülfat ve tetrabütil amonyum hidroksit gibi ajanlar ve iyon çifti reaktifleri denendi. Yüklü analitlerin ayırımını ve hassaslığı artırmasından dolayı heptafluoro bütirik asit kullanılmıştır. heptafluoro bütirik asit iyon baskılanmasını azaltmış ve kromatografik ayırma yardımcı olmuştur. İyon çifti reaktifi kullanıldığında piklerin daha belirgin şekilde ayırımı görülmüş ve pik şekilleri simetrik hale gelmiştir.

Amino asitlerin molekül ağırlıklarının yakın olması ve benzer fiziksel ve kimyasal yapılara sahip olmalarından dolayı kromatografik ayırmada zorluklar yaşanmıştır. C18 kolonda pik şekillerinde yayvanlık gözlemlenmiştir, bu yüzden amino asit kolonuna geçilmiştir. Amino asit kolonunda ise analitler birbirine oldukça yakın çıkmıştır ve kromatografik ayırmada farklı mobil faz denemelerine karşılık verimli sonuçlar elde edilememiştir. C 18, amino asitler için özel kolon gibi farklı birçok kolon ve mobil faz ile çalışmalar yapılmıştır. En sonunda HILIC kolonla yapılan çalışmalarda en iyi sonuçlar elde edilmiş ve yöntem validasyonu bu kolonda yapılmıştır.

HILIC, polar bileşiklerin tutunması ve ayrılması için en başarılı yaklaşımlardan biridir. HILIC ile kullanılabilecek birçok sabit faz vardır. HILIC, polar sabit faz kullanılarak gerçekleştirilen ters faz kromatografisinin bir varyasyonu olarak tanımlanabilir. HILIC'in bir ayırma tekniği olarak birincil avantajı, hareketli fazda bir iyon çifti ajanı gerektirmeden, geleneksel ters faz koşulları altında tutunamayan polar, hidrofilik bileşiklerin güçlü bir şekilde tutunmasıdır. Ayrıca organik açıdan zengin mobil fazların düşük viskozitesi nedeniyle düşük basınçta, HILIC'te çok polar analitlerin yüksek oranda sulu mobil faz altında ters faz kromatografisinden daha iyi ayırma verimliliğine sahiptir. Popülaritesinin bir başka nedeni de, HPLC-MS'in HILIC mobil fazlarla çok uyumlu ve yüksek hassasiyet vermesindendir. İlaçlar ve metabolitleri genellikle polar yapılar olduğu için biyoanalitik uygulamalarda HILIC yaygın kullanım alanı bulmuştur (48).

Amino asitler polar yapılı bileşikler olduklarından dolayı türevlendirme yapmadan ayırmaya çalışıldı. Bu iyon çifti oluşturma reaktifi heptaflorobütirik asit (HFBA) ile gerçekleştirildi. HFBA iyon baskılanmasını azaltmış ve kromatografik ayırma yardımcı olmuştur.

İyon çifti oluşturma reaktifleri sadece ters fazlı HPLC kolonları üzerinde zıt yüklü analitlerin tutulmasını arttırmakla kalmaz, aynı zamanda benzer yüklü analitlerin tutulmasını da azaltır; bununla birlikte, florlu karboksilik asitler için tam olarak araştırılmamıştır ve bu reaktiflerin uygulanması, bazik analitleri ayırmak için iyon çifti oluşturma kapasiteleriyle oldukça sınırlandırılmıştır. Yapılan çalışmalarda kullanılan TFA, PFPA, ve HFBA ile kromatografik analizlerde pik simetrisinde önemli gelişmeler gözlemlendi (49).

HFBA'nın güçlü asitliği, biyomoleküllerin karboksilik asit grupları gibi diğer asidik grupların protonlanmasını sağlar ve böylece biyomolekül içeren numunelerin ters faz kromatografisinde organik çözücüler ile etkileşime girebilir. HFBA'nın daha uzun alkil zinciri TFA'dan daha hidrofobik yapar ve dolayısıyla HFBA daha hidrofobik numunelerle kullanılabilir (50).

Amino asitler için analiz parametreleri tek tek belirlenmiştir (Tablo 3-10). Sistem uygunluğu testi yapıldığında tüm parametrelerin uygun olduğu görülmüştür. Tablo 3-12'de elde edilen veriler görülmektedir. Kabul limitleri ise Tablo 2-4'de verilmiştir. Kabul limitleri için FDA'nın kılavuzlarından faydalanılmıştır ve tablolarda görüldüğü gibi değerler limit içidir ve analiz için uygundur (51).

Amino asitlerin plazmada tayininde, elde edilen R^2 değerlerinin 1'e yakın olması metodun plazmada doğrusal olduğunu ispatlar (Tablo 4-1, 4-2, 4-3). Metodun doğrusallığının ileri seviyede incelenmesi için doğrusallık kontrol grafikleri çizilmiş ve elde edilen R^2 değerlerinin 0.98'den büyük olması yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir.

Kromatografik çalışmalarda alınan cevabın sadece analite ait olduğunun kanıtlanması amacıyla, FDA tavsiyelerine göre farklı sağlıklı gönüllülerden alınan örnekler analiz edilerek plazmada yöntemin seçiciliği değerlendirilmiştir. Kromatogramlar incelendiğinde, analitlerin alıkonma zamanlarında endojen kaynaklı girişimler gözlemlenmemiştir (Şekil 4-6, 4-12).

Plazmada 6 farklı konsantrasyonda standart ve 4 farklı konsantrasyonda kalite kontrol örnekleriyle çalışıldı. Gün içi ve günler arası olmak üzere doğruluk ve kesinlik çalışmaları yürütülmüştür. Hesaplamaları plazmada 3 validasyon serisiyle yapılmıştır. Gün içi BSS değerleri sırasıyla en düşük ve en yüksek %1.45-%10.80 aralığındadır. Günler arası BSS değerleri sırasıyla %3.98-%8.82 aralığındadır. Günler arası ve gün içi

değerler detaylı olarak tablolarda verilmiştir. (Tablo 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13, 4-14, 4-15, 4-16, 4-17, 4-18, 4-19, 4-20, 4-21, 4-22, 4-23,). Biyoanalitik metodlarda doğruluk ve kesinlik için sınır değeri FDA'ye göre %15'dir, fakat LOQ seviyesinde bu sınır %20'dir (52, 53). Hesaplanan veriler metodun plazmada kesin ve doğru olduğunu kanıtlamaktadır.

Yöntem ters fazlı kolonda; organik ve inorganik hareketli faz ile gradient olarak 0.4 mL/dk akış hızında geliştirilmiştir. Amino asitlerin doğrusal aralığı Asn, Asp ve Glu için sırasıyla 500-5000 ng/mL, Gln için 5-50 µg/mL olarak belirlenmiştir. Gözlenebilme (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) ise Asn, Asp ve Glu için sırasıyla 100-500 ng/mL, Gln için 1-5 µg/mL olarak bulunmuştur. Glutaminin plazmada doğal olarak diğer amino asitlerden daha fazla bulunduğu için daha yüksek bir doğrusal aralıkta çalışılmıştır. Analiz sonuçları incelendiğinde yöntemin amino asitlerin plazmada bulunabileceği konsantrasyon aralığını kapsadığı ve plazmada tayin için yeterince hassas olduğu görülmektedir.

Seçilen kalibrasyon konsantrasyonları en yüksek ve en düşük değer alınıp orta konsantrasyon belirlenerek kalite kontrol örnekleri oluşturulmuştur. Validasyon serilerinden elde edilen korelasyon katsayıları 0.99 mertebesinde ve analitik açıdan kabul edilebilir değerlerdir. Kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik değerleri uygundur. Bu sonuçlarla yöntemin doğruluk ve kesinliği kalibrasyon standartlarında uygun görülmektedir (Tablo 4-4, 4-5, 4-6, 4-7).

Çalışmamızın sonucunda ALL tedavisi için kullanılan L-asparjinaz'ın hastalarda kullanıldığında ne kadar ve ne sürede etki ettiğini ölçebiliriz. Ayrıca hangi asparajinaz türünün ne kadar süreyle etkin olduğunu anlayabiliriz. Yapılan çalışmayla hassas, seçici ve valide bir amino asit analiz yöntemi geliştirilmiştir ve gerçek örneklerde uygulanabilen bir metoddur. Türevlendirme ile çalışmanın biyolojik metaryal için yeterli olmadığı gözlemlenmiş ve HPLC-MS/MS ile metod geliştirilmiştir (28, 29, 34). Optimize edilmiş analitik yöntem, yalnızca kısmi validasyonlarla diğer metabolik olarak aktif amino asitlere ve ilgili bileşiklere genişletilebilir. Çalışmamız kısa analiz süresi, az atık oluşturması ve hızlı ekstraksiyon süresiyle hedefine ulaşmıştır.

Yapılan literatür taramalarında hem L-asparjinaz'ın biyolojik sıvılarda tayini hemde karakterizasyonunu birleştiren etkili bir metoda rastlanmamıştır. Çalışmamızın sonucunda valide bir metod geliştirilerek ALL'li hastaların tedavisini daha da

kolaylaştırmak ve kullanılan ilaç miktarını daha doğru bir şekilde tespit ederek, hastaların doğru miktarda ilaç alarak hastalığın daha hızlı ve etkin bir şekilde tedavi edilmesini sağlamaktır.

Farklı L-asparjinaz türlerinin olması ALL hastaları için avantaj olarak görülebilir. Çünkü L-asparjinazın bir türüyle antikor oluşması nedeniyle tedavi olamayan hastanın tedavisine hekim ve eczacı kontrolünde diğer türle devam edebilir. Böylece tümörlü hücreler aminoasit eksikliğinden hayatta kalmaya daha fazla devam edemez. Bu nedenle ilacın etkililiğinin kontrolü yani TDİ önemli hale gelmektedir. Bu tez çalışması sonucu geliştirilen yöntemle gerekli amino asit analizleri L-asparajin, L-aspartik asit, L-glutamin, L-glutamik asit miktar tayinleri yapılarak etkin tedaviye yardımcı olunması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bay A., Öner A., Cesur Y. ve ark. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi Olgularında L-Asparjinaz'a Bağlı Toksisite. *Van Tıp Dergisi* 2005; **12**: 149-152.
2. Akarsu S., Yılmaz E. ve ark. Akut lenfoblastik lösemili çocuklarda L-asparajinaz tedavisi ve komplikasyonları. *Türk Pediatri Arşivi* 2004; **39**: 162-70.
3. Salzer W., Bostrom B., Messinger Y. Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2018; **59**: 1797-1806.
4. Kloss R., Pieters R., Jumelet F. ve ark. Individualized Asparaginase Dosing in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2020; **38**:715-724.
5. Merlen C., Bonnefoy A., Afeich C. ve ark. Antithrombin and fibrinogen levels as predictors for plasma L-asparaginase activity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood Cancer* 2019; **66**: 27729.
6. Ferreira L. Separation and purification of amino acids. Erişim 14.06.2021, Department of Chemical Engineering Faculty of Engineering University of Porto: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/11802/2/Texto%20integral.pdf>
7. Onko ilaç. Leunase 10000 IU 1 flakon prospektüs. Erişim 14.06.2021. <https://www.ilacabak.com/leunase-10000-iu-1-flakon-4805/prospektus>
8. TFD. Türk Farmakoloji Derneği (İnternette), Erişim 1.11.2021, <http://tfd.org.tr/>
9. Asselin B., Rizzari C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. *Leukemia & Lymphoma* 2015; **56 (8)**: 2273–2280.
10. Gençalp G., Tavil B., Olcay L. Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi tedavisinde L-asparajinaz kullanımına bağlı allerjik reaksiyon sıklığı ve allerjik reaksiyonlara yaklaşım. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2011; **54**: 197-203.

11. Özdoğan M. Aminoasit nedir. Erişim 16.06.2021
<https://www.drozdogan.com/aminoasit-nedir/>
12. Altınışık M. Enzimler. Erişim 15.05.2021,
<https://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf>
13. Diltemiz S. ve ark. Aletli Analiz Laboratuvarı. Eskişehir, T.C. Anadolu Üniversitesi yayını; 2011
14. ESOGÜ. Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS). Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (İnternette) 2018, 26 Aralık. Erişim: 16.06.2021, <https://arum.ogu.edu.tr/Sayfa/Index/72/sivi-kromatografi-kutle-spektrometresi-lc-msms>
15. Vikipedi. Elektrosprey iyonizasyon. Erişim: 16.06.2021,
https://tr.wikipedia.org/wiki/Elektrosprey_ionizasyon
16. Tontala F. Automate system suitability testing with chromatography software. Erişim 15.05.2021,
<https://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/TN-708-Automate-System-Suitability-Testing-TN70092-EN.pdf>
17. Purwaha P. Lorenzi P. ve ark. Targeted metabolomic analysis of amino acid response to L-asparaginase in adherent cells. *Metabolomics* 2014; **10**: 909-919.
18. Le A., NG A. ve ark. A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2014; **994**: 166-174.
19. Abbatiello S., Pan Y. ve ark. Mass spectrometric quantification of asparagine synthetase in circulating leukemia cells from acute lymphoblastic leukemia patients. *Journal of Proteomics* 2008; **71**: 61-70.
20. Lu H., Zeng X., Yu L. ve ark. Development and Validation of a Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Asparagine in Human Serum. *Hindawi International Journal of Analytical Chemistry* 2020; **2020**: 1-9.
21. Jeong H., Kim T, Yang D. ve ark. Development of a UPLC-MS/MS method for the therapeutic monitoring of L-asparaginase. *Transl Clin Pharmacol* 2018; **26**: 134-140.

22. Zhang M., Zhang Y., Ren S. ve ark. Optimization of a precolumn OPA derivatization HPLC assay for monitoring of L-Asparagine depletion in serum during l-asparaginase therapy. *Journal of Chromatographic Science* 2018; **56**: 794–801.
23. Jambor A., Perl I. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride literatur overview and further study. *Journal of Chromatography A* 2009; **1216**: 3064-3077.
24. Huang G., Hou J., Zhou X. A measurement method for atmospheric ammonia and primary amines based on aqueous sampling, OPA derivatization and HPLC analysis. *Environ Sci. Technol.* 2009; **43**: 5851-5856.
25. Lanvers C., Pinherio P., Hempel G. ve ark. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. *Analytical Biochemistry* 2002; **309**: 117-126.
26. Bartolomeo M. ve Maisano F. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *Journal of Biomolecular Techniques* 2006; **17**: 131-137.
27. Nath C., Dallapozza L. ve ark. An isocratic fluorescence HPLC assay for the monitoring of L-asparaginase activity and L-asparagine depletion in children receiving E. coli L-asparaginase for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Biomedical Chromatography* 2009; **23**: 152-159.
28. Boss J., Werber G. ve ark. Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *European Journal of Cancer* 1996; **32A**: 1544-1550.
29. Zhang Y., Wang Y. ve ark. Personalized nanomedicine: a rapid, sensitive, and selective UV-vis spectrophotometry method for the quantification of nanostructured PEG-asparaginase activity in children's plasma. *International Journal of Nanomedicine* 2018; **13**: 6337-6344.
30. Ylikangas P., Mononen I. ve ark. A fluorometric assay for L-asparaginase activity and monitoring of L-asparaginase therapy. *Analytical Biochemistry* 2000; **280**: 42-45.

31. Wang B., Hak L. ve ark. ELISA to evaluate plasma anti-asparaginase IgG concentrations in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Immunological Methods* 2000; **239**: 75-83.
32. Kidd J., Ross P. ve ark. Development of an ELISA to detect circulating anti-asparaginase antibodies in dogs with lymphoid neoplasia treated with *Escherichia coli* L-asparaginase. *Veterinary and Comparative Oncology* 2015; **13**: 77-78.
33. Mesas J., Gil J ve Martin J. Characterization and partial purification of L-asparaginase from *Corynebacterium Glutamicum*. *Journal of General Microbiology* 1990; **136**: 515-519.
34. Karamitros C., Lim J., Konrad M. An Amplex Red-based fluorometric and spectrophotometric assay for L-asparaginase using its natural substrate. *Analytical Biochemistry* 2014; **445**: 20-23.
35. Mahajan R, Kumar V. ve ark. Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from *Bacillus licheniformis*: In vitro evaluation of anti-cancerous properties. *Plos One* 2014; **9**: 1-8.
36. Cruzat V., Rogero M. ve ark. Glutamine: metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients* 2018; **10 (11)**: 1564.
37. ICH. Q2(R1) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (İnternette) 1995, Haziran. Erişim 18.06.2021, <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology>
38. EMEA. *Guideline on bioanalytical method validation* (İnternette) 2011, Temmuz. Erişim 18.06.2021, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
39. Panuwet P, Hunter R, D'Souza P. ve ark. Biological matrix effects in quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: Advancing biomonitoring. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2016; **46**: 93–105

40. Takehana S., Yoshida H., Ozawa S. ve ark. The effects of pre-analysis sample handling on human plasma amino acid concentrations. *Clinica Chimica Acta* 2016; **455**: 68-74.
41. Perl I., Vasanits A. Stability and characteristics of the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/ N-acetyl-l-cysteine reagents and their amino acid derivatives measured by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1999; **835**: 73-91.
42. Chem Z., Lin F., Ye X. ve ark. Simultaneous determination of five essential amino acids in plasma of Hyperlipidemic subjects by UPLC-MS/MS. *Lipids in Health and Disease* 2020; **19**: 1-9.
43. Agilent. *Agilent Zorbax Eclipse AAA Datasheet*. Erişim: 10.08.2021, <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/Public/820941-001b.pdf>
44. Agilent. *Agilent ZORBAX SB-C8 Rapid Resolution Threaded Column Data Sheet*. Erişim: 18.08.2021, <https://www.agilent.com/cs/library/specifications/public/820115-006.pdf>
45. Phenomenex. *Core-shell technology*. Erişim: 19.08.2021, <https://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>
46. Boersema P., Mohammed S., Heck A. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008; **391**:151–159.
47. Nguyen H., Schug K. The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *Journal of Separation Science* 2008; **31**: 1465-1480.
48. Buszewski B., Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012; **402**: 231–247.
49. Lajin B., Goessler W. Fluorinated carboxylic acids as “ion repelling agents” in reversed-phase chromatography. *Journal of Chromatography A* 2020; **1631**: 1-8.
50. Sigma. Product information, Heptafluorobutyric acid. Erişim: 23.08.2021, <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/373/072/h7133pis.pdf>
51. FDA, Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry. Erişim: 18.10.2021,

<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>

52. Moein M., El Beqqali A., Abdel M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *Journal of Chromatography B* 2017; **1043**: 3-11.
53. Gonzales O., Blanco M. Iriarte G. ve ark. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *Journal of chromatography A* 2014; **1353**: 10-27.



HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

AKUT LENFOBlastİK LÖSEMİ TEDAVİSİNDE KULLANILAN L-ASPARAGİNAZ'IN KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE ANALİZİ_2

ORJİNALLİK RAPORU

% 16	% 16	% 2	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 5
2	www.mustafaaltinisik.org.uk İnternet Kaynağı	% 2
3	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	labkolik.com İnternet Kaynağı	% 1
5	www.yumpu.com İnternet Kaynağı	% 1
6	www.drozdogan.com İnternet Kaynağı	% 1
7	tr.wikipedia.org İnternet Kaynağı	% 1
8	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
9	vantipdergisi.yyu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1

EK-1

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

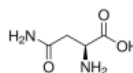
3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sial.comOutside USA: eurtechserv@sial.com**Certificate of Analysis**

Product Name:

L-Asparagine – ≥98% (HPLC)

Product Number: A0884
Batch Number: SLEZ0221
Brand: SIGMA
CAS Number: 70-47-3
MDL Number: MFCD00064401
Formula: C₄H₈N₂O₃
Formula Weight: 132.12 g/mol
Quality Release Date: 14 AUG 2018
Recommended Retest Date: AUG 2023



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
100 mg/ml, 1 N HCl		
Water (by Karl Fischer)	≤ 1 %	0 %
Carbon	35.6 - 37.1 %	36.4 %
Nitrogen	20.8 - 21.6 %	21.5 %
Specific Rotation	33.0 - 36.5 °	35.7 °
(+)		
C = 10, 6N HCL 20 deg C		
Purity (HPLC)	≥ 98 %	100 %

Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.