



**SAFRA ASİTLERİNİN BİYOLOJİK ÖRNEKLERDEN
TAYİNİ İÇİN SK-KS/KS YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ ve VALİDASYONU**

Doktora Tezi

Kadri GÜLEÇ

Eskişehir 2023

**SAFRA ASİTLERİNİN BİYOLOJİK ÖRNEKLERDEN
TAYİNİ İÇİN SK-KS/KS YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ ve VALİDASYONU**

Kadri GÜLEÇ

DOKTORA TEZİ

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Erol ŞENER**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Temmuz 2023**

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından kabul edilen 2110S189 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kadri GÜLEÇ'in "Safranın Asitlerinin Biyolojik Örneklerden Tayini İçin SK-KS/KS Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu" başlıklı tezi 31/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Erol ŞENER	
Üye	: Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR	
Üye	: Doç. Dr. Zeren BARIŞ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Demet DİNCEL	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Sema KOYUTÜRK	

Enstitü Müdürü

ÖZET

SAFRA ASİTLERİNİN BİYOLOJİK ÖRNEKLERDEN TAYİNİ İÇİN SK-KS/KS YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ ve VALİDASYONU

Kadri GÜLEÇ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz, 2023

Danışman: Doç. Dr. Erol ŞENER

Safra asidi atipik steroid molekül olup karaciğer enzimleri ve bağırsak bakterileri tarafından kolesterolden sentezlenir. Birincil ve ikincil safra asidi olarak ikiye ayrılır. Safra asitleri sentez basamaklarında konjuge hale gelerek farklı safra asitlerini oluşturur.

Günümüzde başta analitik kimya olmak üzere çok çeşitli alanda farklı birçok analizde kullanılmakta olan sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi (SK-KS/KS), biyolojik numune analizlerinde de yüksek hassasiyete ve seçiciliğe sahip olması sebebiyle sıklıkla kullanılmaktadır.

Yirmi üç farklı safra asidi ve bir adet döteryumlu iç standart kullanılarak, biyolojik örneklerde safra asidi tayini için SK-KS/KS parametreleri ve farklı sabit fazların optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon için parçalama voltajları, parçalama enerjileri, iyon kaynağı, iyonlaştırıcı ajan, iyon modu gibi MS parametreleri her bir safra asidi için optimize edilmiş, hareketli faz, sıcaklık, akış hızı gibi parametreler ile sabit fazlar denenmiştir. Elde edilen optimizasyon parametrelerine göre negatif iyonlaştırma modunda, elektrosprey iyon kaynağı ile 100 x 3,00 mm, 1,8 µm, 95 Å, C18 sabit fazı kullanılarak 60 °C sıcaklıkta, %0,5 formik içeren su ve %20 asetonitril içeren metanol hareketli fazı ile analiz yapılmıştır ve optimum çalışma şartlarında ICH M10 biyoanalitik validasyon kılavuzuna göre validasyonu yapılmıştır.

Kan, idrar ve gaita örnekleri kantitatif analiz için hazırlama prosedürü uygulanarak analiz edilmiştir. Analiz sonuçları ICH M10 biyoanalitik validasyon kılavuzunda belirtilen limitler çerçevesinde değerlendirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: SK-KS/KS, Safra Asidi, Validasyon, Biyolojik Örnek, Plazma, İdrar, Gaita

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF LC-MS/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF BILE ACIDS FROM BIOLOGICAL SAMPLES

Kadri GÜLEÇ

Department of Analytical Chemistry
Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July, 2023

Supervisor: Assoc. Prof. Erol ŞENER

Bile acid is an atypical steroid molecule synthesised from cholesterol by liver enzymes and intestinal bacteria. It is divided into primary and secondary bile acids. Bile acids become conjugated in the synthesis steps and form different bile acids.

Today, liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS/MS), which is used in many different analyses in many different fields, especially in analytical chemistry, is frequently used in biological sample analysis due to its high sensitivity.

LC-MS/MS parameters and different stationary phases were optimised for bile acid determination in biological samples using twenty-three different bile acids and one internal standard. For optimisation, MS parameters such as fragmentation voltages, fragmentation energies, ion source, ionising agent, and ion mode were optimised for each bile acid, and parameters such as mobile phase, temperature, flow rate, and stationary phases were tested. According to the obtained optimisation parameters, the analysis was performed in negative ionisation mode with an electrospray ion source, 100 x 3.00 mm, 1.8 µm, 95 Å, using C18 stationary phase at a temperature of 60 °C, with water containing 0.5% formic acid and methanol mobile phase containing 20% acetonitrile, and validated according to the ICH M10 bioanalytical validation guideline under optimum operating conditions.

Blood, urine, and stool samples were analysed by applying the preparation procedure for quantitative analysis. The analysis results were evaluated within the limits specified in the ICH M10 bioanalytical validation guideline.

Keywords: LC-MS/MS, Bile Acid, Validation, Biological Sample, Plasma, Urine,
Stool

TEŞEKKÜR

“Dünyada her şey için, medeniyet için, hayat için başarı için en gerçek yol gösterici ilimdir, fendir. İlim ve fennin dışında yol gösterici aramak gaflettir, cahilliktir, doğru yoldan sapmaktır.” Sözleri ile ilme ve fenne biçtiği önemi her fırsatta vurgulayan yaptığı devrimleri, fikirleri ve bizlere bıraktıkları ile her zaman yaşayacak olan Ulu Önder Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK... Ruhun şad olsun. Minnet ve şükranlarımla.

Doktora süreci ve tez çalışmalarım sırasında akademik donanımı, bilgi birikimi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve katkı sağlayan Sayın Danışman Hocam Doç. Dr. Erol ŞENER’e,

Doktora sürecimde bilgi ve tecrübeleriyle her zaman destekleyerek zorlukları aşmamda yardım eden tez izleme komite üyeleri Sayın Hocalarım Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR ve Doç. Dr. Zeren BARIŞ’a

Tez savunma jüri üyeleri değerli Sayın Hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Demet DİNCEL ve Dr. Öğr. Üyesi Sema KOYUTÜRK’e

Akademik deneyimi, bakış açısı ve fikirlerinin yanı sıra desteğini her zaman hissettiğim Sayın Hocam Prof. Dr. Dilek AK’a,

Kapısını hiç çekinmeden çalabildiğim, desteklerini esirgemeyen değerli Sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül DAL POÇAN’a

Her zaman güler yüzlü ve abi gibi yakınlık gösteren Anabilim Dalı Başkanımız, Sayın Hocam Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN’a

Bu aşılması zor yolda motivasyonumu yüksek tutmam için yanımda olan desteklerini hep hissettiğim beni sabırla dinleyen, destek olan, hayatımda ve aynı kuldarda beraber olmaktan büyük mutluluk duyduğum, değerli arkadaşlarım ve hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Saniye ÖZCAN ve Dr. Öğr. Üyesi Sakine ATİLA KARACA’ya,

Doktora tez çalışmalarını gerçekleştirdiğim Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AÜBİBAM) müdürü ve yüksek lisans Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL ve maddi manevi destekçim Sayın Doç. Dr. Evrim AKYIL’a ve AÜBİBAM çalışanlarına,

Hayatımda geçirdiğim en zorlu ve çaresiz zamanlarımda bile yanımda olup düşecekken kaldıran ve sabırla bıkmadan usanmadan beni dinleyip yardımlarını her an her dakika eksik etmeyen, neşesiyle kahkahasıyla samimiyetiyle ve karşılık beklemeden

destek olan arkadaşlarım Uzm. Biyolog Elif APAYDIN YAŞAR, Dr. Burcugül ALTUĞ, Uzm. Moleküler Biyolog Merve Nur SOYKAN'a,

Doktora eğitimimde başarı ödülü ve maddi destek veren 2211 Yurt İçi Doktora Burs Programı ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığına,

Ve tabii ki benim bu yolda her zaman destekleyen bu günlere gelmemde büyük emek ve paya sahip olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.





Çok erken kaybettiğim

Cansu'ya

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Kadri GÜLEÇ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Safra Asitleri.....	3
2.2. Safra Asitleri Sentezi.....	8
2.3. Safra Asiti Sentez Yolakları.....	8
2.3.1. Klasik yol / Nötr yol.....	9
2.3.2. Alternatif yol.....	9
2.4. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi.....	10
2.4.1. Kromatografi ve kromatografinin kısa tarihçesi.....	10
2.4.2. Kütle spektrometrisinin kısa tarihi.....	12
2.4.3. Kütle spektrometrisinin çalışma prensibi.....	13
2.4.4. İyonlaştırma yöntemleri.....	18
2.4.4.1. Elektron etkisi (Electron impact (EI))	19

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
2.4.4.2. Kimyasal iyonizasyon (Chemical ionization (CI))...	20
2.4.4.3. Alan iyonizasyon (Field ionization (FI)).....	21
2.4.4.4. Elektrosprey iyonizasyon (Electrospray ionization (ESI)).....	23
2.4.4.5. Matris yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyonu (Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI)).....	22
2.4.5. Kütle analizörleri.....	24
2.4.5.1. Dört kutuplu kütle analizörü.....	24
2.4.5.2. Uçuş süresi kütle analizörü (Time of flight analyzer (TOF)).....	25
3. KULLANILAN KİMYASAL VE CİHAZLAR.....	27
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	27
3.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler.....	27
4. YÖNTEM.....	28
4.1. Çözücü Sistemi ve Stok Çözeltilerin Hazırlanması.....	28
4.2. Kütle Spektrometresi ve Kromatografik Parametrelerin Optimizasyonu.....	29
4.2.1. Kütle spektrometresinin optimizasyonu	29
4.2.2. Hareketli faz optimizasyonu.....	30
4.2.3. Sabit faz teknolojisi.....	30
4.2.4. Sabit faz fırının optimizasyonu.....	30
4.3. Biyolojik Örneklerin Hazırlaması.....	30
4.4. Yöntem Validasyonu.....	31
4.4.1. Matris etkisi.....	31

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
4.4.2. Doğrusallık (Kalibrasyon eğrisi)	32
4.4.3. Doğruluk.....	32
4.4.4. Kesinlik.....	33
4.4.5. Taşınma (Carry-over)	33
4.4.6. Sağlamlık.....	33
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
5.1. Kütle Spektrometresi ve Kromatografik Parametrelerin Optimizasyonu.....	34
5.1.1. Kütle spektrometresinin optimizasyonu	34
5.1.2. Hareketli faz optimizasyonu.....	35
5.1.3. Sabit faz teknolojisi.....	37
5.1.4. Sabit faz fırının optimizasyonu.....	40
5.2. Yöntem Validasyonu.....	40
5.2.1. Matris etkisi.....	40
5.2.2. Doğrusallık (Kalibrasyon eğrisi)	42
5.2.3. Doğruluk.....	50
5.2.4. Taşınma (Carry-over)	51
5.2.5. Sağlamlık.....	51
5.3. Biyolojik Örnek Analizinin Değerlendirilmesi.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
KAYNAKÇA.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	63

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1 Safra asitleri standartları ve özellikleri.....	28
Tablo 4.2. Kullanılan sabit fazlar.....	30
Tablo 5.1. Safra asitleri MS için optimizasyon koşulları.....	34
Tablo 5.2. Hareketli faz koşulları.....	35
Tablo 5.3. Kan ve idrar biyolojik örneklerinin matris etkisi için nominal pik alanının yüzde değerleri.....	41
Tablo 5.4. Farklı konsantrasyonlarda doğruluk için bağıl standart sapma değerleri.....	50
Tablo 5.5. Kan ve idrar örnek analiz sonuçları pik alanları	52
Tablo 5.6. Gaita örnek analiz sonuçları pik alanları.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Birincil safra asitleri ve kimyasal yapıları.....	5
Şekil 2.2. İkincil safra asitleri ve kimyasal yapıları.....	5
Şekil 2.3. İnsanlarda en çok bulunan safra asitlerinin yapıları ve bunların glisin ve taurin konjugatları.....	6
Şekil 2.4. Sindirim sistemi ve enterohepatik sirkülasyon.....	7
Şekil 2.5. Safra asidi sentezinin klasik nötr yolla şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.6. MS cihazının bileşenleri.....	14
Şekil 2.7. MS cihazı parçalarının şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.8. MS cihazının şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.9. Klinik MS'in evrimindeki bazı önemli olayların yaklaşık zaman çizelgesi.....	17
Şekil 2.10. İyonizasyon tekniklerinin tarihsel gelişimi.....	18
Şekil 2.11. Bir iyonizasyon tekniğinin seçimi için akış şeması.....	19
Şekil 2.12. EI kaynağının şematik diyagramı.....	20
Şekil 2.13. CI kaynağının şematik diyagramı.....	21
Şekil 2.14. ESI kaynağının şematik diyagramı.....	22
Şekil 2.15. MALDI kaynağının şematik diyagramı.....	23
Şekil 2.16. Dört kutuplu kütle spektrumu diyagramı.....	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.17. TOF analizörü diyagramı.....	26
Şekil 5.1. Koşul-1 şartlarında glisin konjuge safra asitlerinin kromatografik ayrımı.....	36
Şekil 5.2. Koşul-2 şartlarında glisin konjuge safra asitlerinin kromatografik ayrımı.....	36
Şekil 5.3. Koşul-3 şartlarında glisin konjuge safra asitlerinin kromatografik ayrımı.....	36
Şekil 5.4. Koşul-4 şartlarında glisin konjuge safra asitlerinin kromatografik ayrımı.....	37
Şekil 5.5. Optimum koşullarda glisin konjuge safra asitlerinin kromatografik ayrımı.....	37
Şekil 5.6. Optimum koşullarda glisin konjuge safra asitlerinin kromatografik ayrımı.....	38
Şekil 5.7. Gemini C6-fenil sabit faz ile kromatografik ayırım.....	39
Şekil 5.8. SiliaChrom sabit faz ile kromatografik ayırım.....	39
Şekil 5.9. Zorbax Eclipse Plus sabit faz ile kromatografik ayırım.....	40
Şekil 5.10. Safra asitlerine ait doğrusallık eğrileri, doğru denklemi ve regresyon katsayısı.....	42
Şekil 5.11. Kan örneğine ait kromatogram.....	54
Şekil 5.12. İdrar örneğine ait kromatogram.....	55
Şekil 5.13. Gaita örneğine ait kromatogram.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

7-KDCA	: 7-Ketodeoksikolik asit
7-KLCA	: 7-Ketolitokolik asit
AA	: Asetik asit
ACA	: Apokolik asit
ACN	: Asetonitril
AF	: Amonyum format
BAAT	: Amino Asit N-Asiltransferaz
CA	: Kolik asit
CDCA	: Kenodeoksikolik asit
CI	: Kimyasal iyonizasyon (Chemical ionization)
d4-LCA	: d4-Litokolik asit
DCA	: Deoksikolik asit
DKA	: Dehidrokolik asit
DLCA	: Dehidrolitokolik asit
EI	: Elektron etkisi (Electron impact)
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon (Electrospray ionization)
FA	: Formik asit
FI	: Alan iyonizasyon (Field ionization)
GCDCA	: Glikokenodeoksikolik asit
GDCA	: Glikodeoksikolik asit
GHCA	: Glikohiyokolik asit
GHDCA	: Glikohiyodeoksikolik asit
GUDCA	: Glikoursodeoksikolik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

HCA	: Hipokolik asit
HDCA	: Hiyodeoksikolik asit
IS	: İç standart
LC	: Sıvı kromatografisi (Liquid chromatography)
LCA	: Litokolik asit
m/z	: Kütle/yük
MALDI	: Matris yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyonu (Matrix assisted)
MCA	: Murikolik asit
MeOH	: Metanol
MS	: Kütle Spektrometresi (Mass spectrometry)
TCA	: Taurokolik asit
TCDCA	: Taurochenodeoksikolik asit
TDCA	: Taurodeoksikolik asit
THCA	: Taurohiyokolik asit
TLCA	: Taurolitokolik asit
TOF	: Uçuş süresi kütle analizörü (Time of flight analyzer)
TUDCA	: Tauroursodeoksikolik asit
UDCA	: Ursodeoksikolik asit

1. GİRİŞ

Safra asitleri, atipik özellikler sergileyen bir steroid molekülü sınıfıdır. Karaciğer enzimlerinin enzimatik aktivitesi ve bağırsak bakterileri sayesinde kolesterolden sentezlenirler. Kolesterolün aksine safra asitleri hem hidrofobik hem de hidrofilik bir yüze sahip olan amfipatik yapıları ile karakterize edilir. Safra asitleri birincil ve ikincil olmak üzere iki ayrı gruba ayrılabilir. Birincil safra asitleri, kolesterolün dönüştürülmesiyle karaciğerde sentezlenirken, ikincil safra asitleri, bakterilerin birincil safra asitleri üzerindeki enzimatik etkisiyle bağırsakta oluşturulur. Safra asitlerinin iki ana sınıflandırması, yan zincir uzunluklarında farklılıklar göstermesinden kaynaklanır ve C27 ve C24 bir yapıya sahiptir. Yüksek omurgalılar tarafından sentezlenen safranın çoğu, esas olarak C24 safra asitlerinden oluşur. Safra asitlerinin birincil metabolik işlevi, lipid emülsifikasyon sürecini gerçekleştirmek ve böylece bağırsak emilimini sağlamaktır. Ayrıca, bağışıklık sistemi, hücrel apoptozun modülasyonunu, glikoz metabolizmasına katılımı gibi çok sayıda önemli rolü vardır.

Kromatografi, sayısız ilerleme ve yeniliğe yol açması nedeniyle bilim tarihinde önemli bir yere sahiptir. Bu, bilim adamlarının karışımları ayırmak ve analiz etmek için kullandıkları metodolojileri temelden değiştirmesine neden olmuştur. Kimyasal analiz, organik sentez, tıbbi teşhis ve biyolojik süreçler dahil olmak üzere çeşitli bilimsel alanda önemli bir etkiye sahiptir. Geniş kapsamlı etkileri, devrim niteliğinde gelişmelere yol açmış birçok bilimsel alanda önemli ilerlemelere ve keşiflere izin vermiştir. Geçen süre boyunca da modern bilim üzerinde önemli bir etkiye sahip olmaya devam etmektedir.

Kütle spektrometrisinin (MS) tesadüfi keşfi, 1897'de çok sayıda önemli bilimsel atılımla tanınan ünlü bir bilim insanı olan J. J. Thomson'ın farklı bir araştırma ile uğraşırken gerçekleşmiştir. 1980'li yıllara gelindiğinde, küçük organik moleküllerin incelenmesi için MS kullanımı yaygın bir teknik haline gelmiş olmasına rağmen proteinlerin, özellikle büyük olanların yanı sıra nükleik asitler ve kompleks karbonhidratlar gibi diğer makro moleküllerin analizi hala zorlu bir sınav olmaya devam etmiştir. Ancak bu zorlu görevin üstesinden, 1988 yılında neredeyse aynı zamanlarda keşfedilen elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) yöntemlerinin tanıtılmasıyla gelinebilmiştir.

Çağdaş bilimsel araştırmalarda, sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi insan ya da canlıların idrar, plazma/serum, safra, bağırsak içeriği, karaciğer ve dışkı gibi çeşitli biyolojik matrislerdeki biyobelirteçlerin veya biyoaktif bileşiklerin kesin olarak

tanımlanması ve ölçülmesi için üstün ve son derece hassas analitik teknik olarak ortaya çıkmaktadır.

Bu tez kapsamında sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi kullanılarak konjuge ve konjuge olmayan safra asidi standartları ile optimizasyon çalışmaları yapılarak biyolojik numenelerde safra asidinin tespit edilmesi adına analitik bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Safra Asitleri

On dokuzuncu yüzyılın başlarında, araştırmacılar ilk olarak safrada bulunan kimyasalların kimyasını incelemeye başladılar. Hem koleik asit hem de safra, ilk olarak Thenard ve Berzelius tarafından gerçekleştirilen olağanüstü deneyler sonucunda keşfedildi. Demarcay, kolik asit (CA) olarak da bilinen nitrojen içermeyen safra asidini izole etmeyi başaran kişiydi. Platner, bir safra asidinin kristalli bir örneğini oluşturan ilk kişiydi, ancak o zamanlar, örnekten herhangi bir yapısal bilgi elde etmek mümkün değildi. Buna rağmen, Strecker ve Mylius gibi bilim adamları safra asitlerinin moleküler formüllerini (hem serbest hem de eşlenik formlarında) bulmak için çok çalıştılar. Kolik asit-yag asidi kompleksinin (koleik asit) oluşumunun ilk gösterimi Wieland ve Sorage tarafından gerçekleştirilmiştir. Yazarlar Wieland ve Windaus, safra asitleri üzerinde derinlemesine yapısal araştırmalar yürüttüler. Rosenheim ve King, Bernal'in 1932'de kolesterolün siklopentanoperhidrofenantren yapısını ortaya çıkarmak için X ışınlarını kullanmasından sonra safra asitlerinin doğru yapısını önerebildiler. 1950'ler, bugün hala devam eden safra asidi araştırmalarının bilimsel aşamasının başlangıcı oldu. Bu süre zarfında, çeşitli türlerden türetilen safra asitlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu gibi diğer faaliyetlerin yanı sıra, kapsamlı fizikokimyasal araştırmalarının ve önemli metabolik araştırmalar yapmaya başlanmıştır (Erlinger, 2022; Kritchevsky ve Nair, 1971; Mukhopadhyay ve Maitra, 2004).

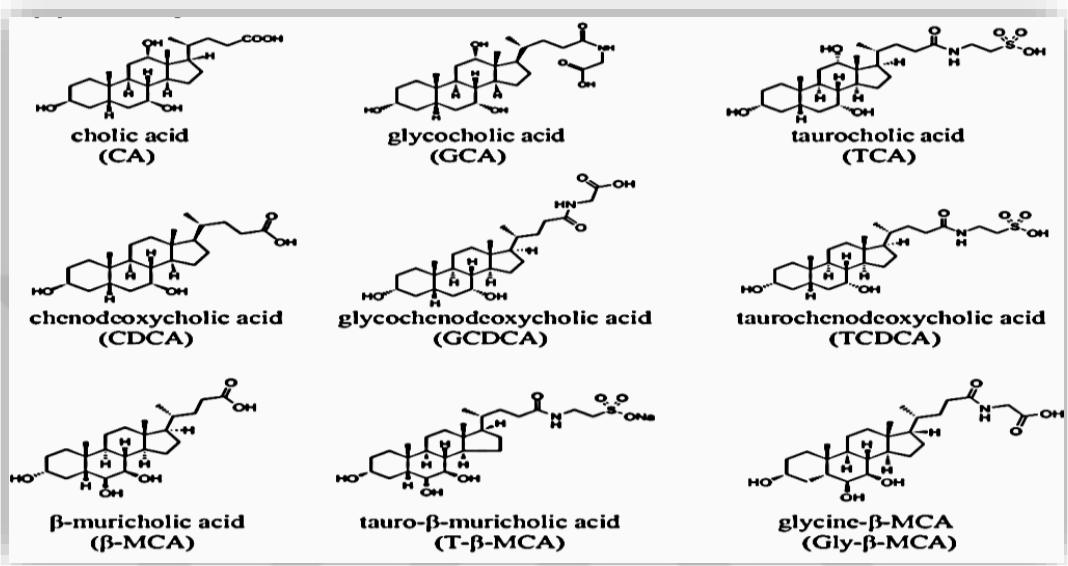
Birincil safra asitleri ve safra alkollerinin oluşumunun arkasındaki kimya safra asidi ve safra alkolünün kimyasını anlamak, doğal olarak oluşan bileşiklerde bulunabilecek çok çeşitli kimyasal yapılar ve bu yapıları adlandırmanın karmaşıklığı nedeniyle zordur. Az çözünür bir zar lipidi olan kolesterolü konjuge safra asitlerine veya safra alkollerine -suda yüksek oranda çözünür, amfipatik, membranolitik moleküller- dönüştürmeye yardım eden çoklu biyokimyasal yolların evrimi, çok sayıda safra asidi ve safra alkolü için bir açıklama sağlayabilir. Bu yollar, kolesterolü konjuge safra asitlerine veya safra alkollerine dönüştürmeye yarar. Bu bileşiklere isimler çok uzun zaman önce verildiğinden, daha kimsenin bileşimlerinin ne olduğu bilinmeden safra asidi ve safra alkolü terminolojisi oldukça karmaşıktır. 19. yüzyılın başlarında, safra asitleri safradan ayrılmış ve safra asidi kimyasının incelenmesi, geleneksel biyokimyanın oluşumundan önce gelmiştir (Hofmann ve Hagey, 2008).

Doğada bulunan safra asitleri ve safra alkollerinin tümünü ifade edecek yeterli toplu

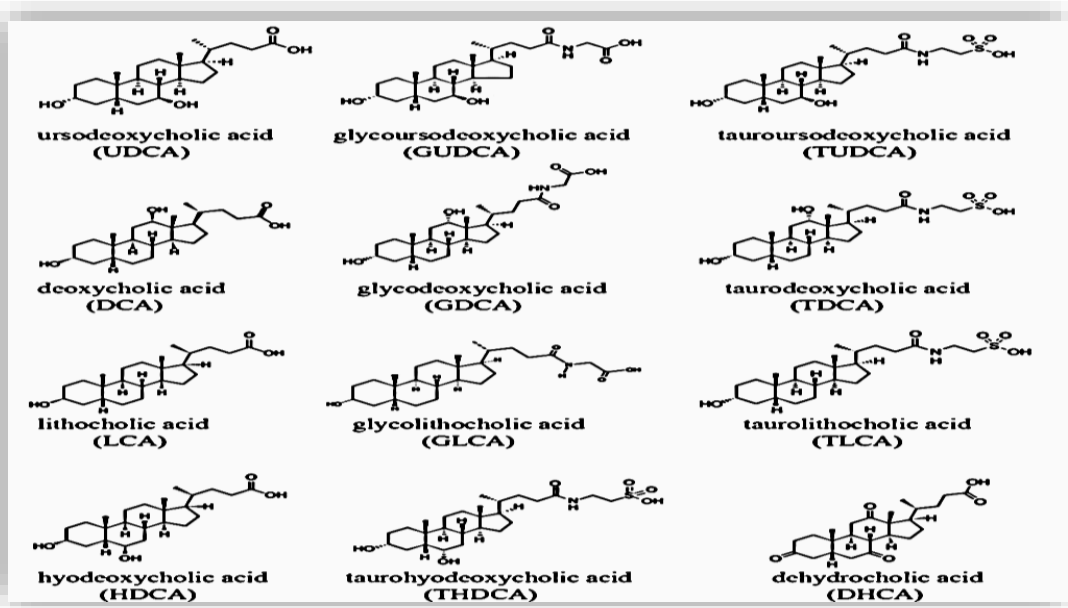
bir ifade yoktur. "Kolanoid" kelimesi C24 karbon numarasına sahip tüm bileşikler, "kolestanoidler" terimi ise C27 karbon numarasına sahip tüm bileşikler kapsamaktadır. "C24 safra asidi" ve "C27 safra asidi" terimlerinin her ikisi de "safra asidi" tanımına dahildir, ancak safra alkollerini dahil değildir. Birçok araştırmacı kolanoidleri ve kolestanoidleri üç ana gruba ayırmanın yararlı olduğu öne sürmüştür. Bu sınıflar C27 safra alkollerini, C27 safra asitleri ve C24 safra asitleridir. Bu ayırım, safra asitlerinin biyolojisi hakkındaki bilgileri basitleştirmeye yardımcı olmaktadır. Bu üç grup, doğa tarafından üretilen kolanoidlerin ve kolestanoidlerin büyük çoğunluğunu oluşturur. Kolesterolün C8 yan zinciri C27 safra alkollerinde ve C27 safra asitlerinde bulunurken, C5 yan zinciri C24 safra asitlerinde bulunabilir. C27 kolestanoidler ve C24 kolanoidler, omurgalıların kolesterolün son ürünleridir. Kolesterol, daha önce bahsedildiği gibi bir izooktan yan zincirinin yanı sıra C5'te bir çift bağa sahip bir C27 steroldür. Üç sınıfın her biri ya bir ana alkol grubuna ya da bir karboksil grubu olan bir yan zincire sahiptir. Kolesterolden safra asidi üretimi süreci boyunca steroid çekirdeği, yan zincir veya her ikisi üzerinde daha fazla hidroksilasyondan geçebilir. Bu hidroksilasyonlar, doğal olarak oluşan kolestanoidler ve kolanoidlerin spektrumuna yol açar. C24 safra asitlerinde meydana gelen iki ek değişiklik daha vardır. İlk yol, ursodeoksikolik asit (UDCA) olarak bilinen bir 3 α ,7 β -dihidroksi safra asidinin oluşumuyla sonuçlanan 7 α -hidroksi grubunun epimerizasyonudur. İkinci yol, bir 3 α -hidroksi, 7-okso-safra asidi oluşumuyla sonuçlanan C7 hidroksi grubunun oksidasyonunu içerir. Kenodeoksikolik asitin (CDCA) izolasyonu ve isimlendirilmesi ile CA'nın keşfi ve isimlendirilmesi arasında yaklaşık bir buçuk asırlık bir süre geçmiştir. CDCA, elementel analize göre kolik asitten bir eksik oksijen atomuna sahip olduğu için bu isim verilen bir safra asididir (Hofmann ve Hagey, 2008).

Safra asitleri, karaciğer enzimleri ve bağırsak bakterileri sayesinde karaciğer ve bağırsaklardaki kolesterolden oluşan bir atipik temel bir hidroksile steroid molekülleridir. Safra asitleri karaciğerde kolesterolden üretilir (Chiang, 2009). Safra asitleri, siklopentanoperi veya drophenantren yapısının varlığı ile karakterize edilen, doğal olarak oluşan bir metabolit sınıfıdır. Kolesterolün aksine, safra asitleri hem hidrofobik bir yüze hem de hidrofilik bir yüze sahip olan amfipatik moleküllerdir. Amfipatik yapılarına göre deterjan özelliği gösterirler. Bu da misellerin içindeki lipitlerin katabolizması için gerekli olması yanında emülsifikasyonu ve yağda eriyen vitaminlerin emilimini kolaylaştırır (Hofmann ve Roda, 1984; Westergaard ve Dietschy, 1976). Safra asitleri ağırlıklı olarak hepatik organda, kolesterolü bir öncü olarak kullanan bir dizi enzimatik aracılı katabolik

metabolik süreç yoluyla sentezlenir. Safra asitleri birincil (primer) ve ikincil (sekonder) olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Primer safra asitleri, karaciğerde kolesterolde üretilirken, dejenere safra asitleri olarak da bilinen sekonder safra asitleri ise bağırsakta primer safra asitlerinden bakteriyel bir enzimler yardımıyla üretilirler (Xue vd., 2021)

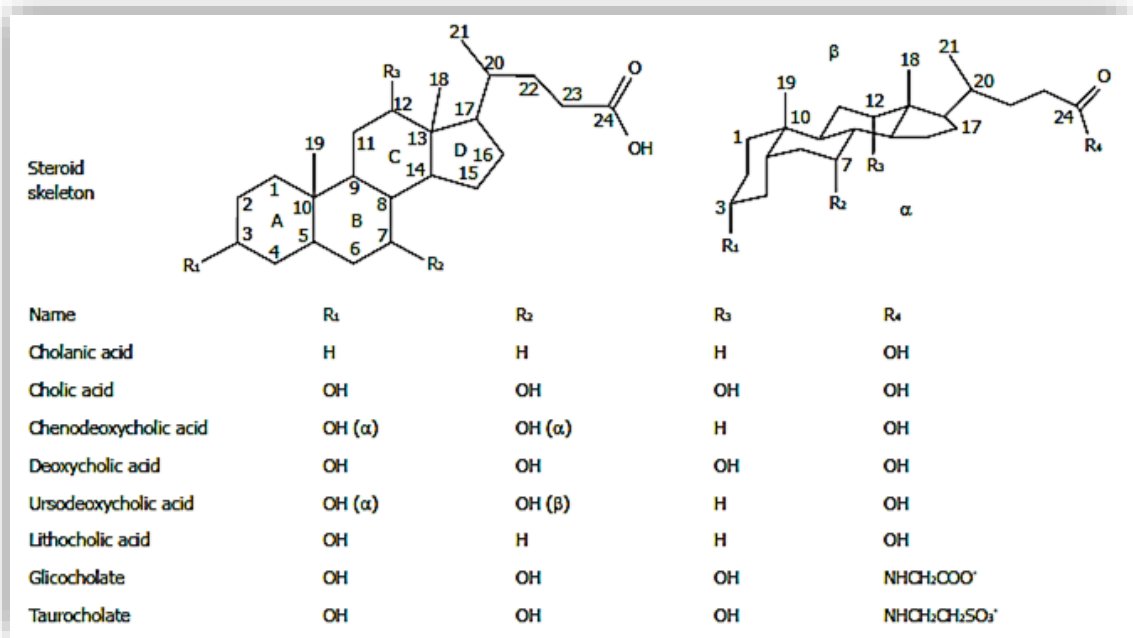


Şekil 2.1. Birincil safra asitleri (Mukhopadhyay ve Maitra, 2004).



Şekil 2.2. İkincil safra asitleri (Mukhopadhyay ve Maitra, 2004).

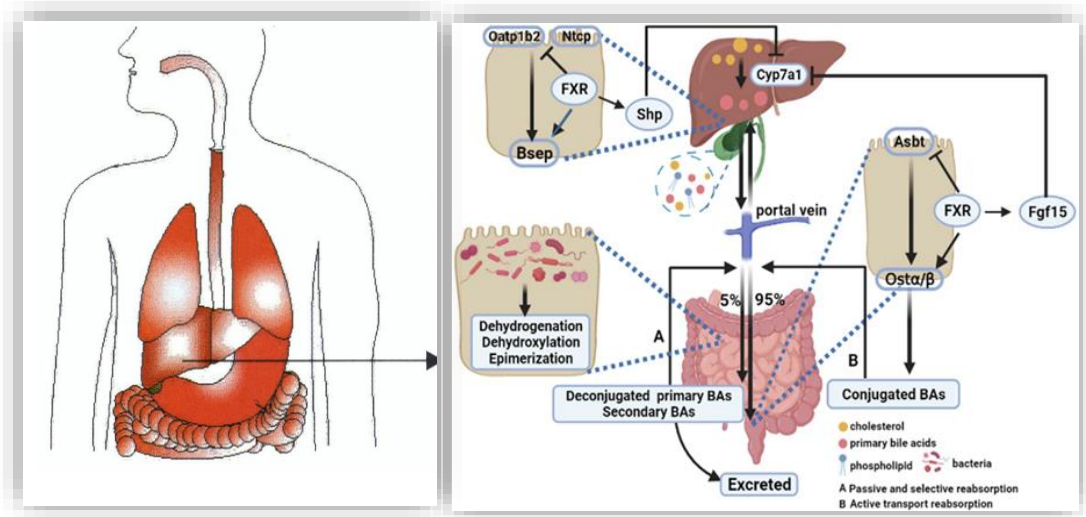
Sert bir steroid çekirdeği ve kısa bir alifatik yan zincir, her safra asidinde bulunan iki bağlayıcı bileşendir. Safra asitlerinin steroid çekirdeği, doymuş tetrasiklik hidrokarbon perhidrosiklopentanofenantrenden oluşur. Bu yapı, her biri altı üyeli üç halkadan (A, B ve C) ve beş üyeli bir halkadan (D) oluşur. Ayrıca C18 ve C19 noktalarında açılı konfigürasyonda metil grupları vardır. A ve B halkaları daha yüksek omurgalılarda bir cis konfigürasyonunda birbirine kaynaşmış olduğundan, safra asidi çekirdeği bazen gaga şekli olarak bilinen kavisli bir şekle sahiptir. 5 α -stereokimya olarak bilinen bir A/B transfüzyonu nedeniyle, alt omurgalılarda bulunan ve allo-safra asitleri olarak bilinen bazı safra asitlerinin yapısı düzdür. Bileşiğin yan zincirinin yapısı, safra asitleri veya safra alkollerі sınıfına ait olup olmadığını belirler. Sırasıyla C21, C26, C25 ve C24 sayıları ile gösterilen dört farklı safra alkolü çeşidi vardır. Bu alkoller daha az gelişmiş yaşam formlarında bulunur. C27 ve C24 safra asitleri, safra asitlerinin iki ana kategorisidir ve yan zincirin uzunluğuna göre birbirinden farklı olabilir. Yüksek omurgalılar tarafından üretilen safranın çoğu C24 safra asitlerinden oluşur. Safra asitlerinin konjuge formunu üretmek için, bu safra asitlerinin önce glisin veya taurine konjuge edilmesi gerekir (Li ve Chiang, 2020; Mukhopadhyay ve Maitra, 2004).



Şekil 2.3. İnsanlarda en çok bulunan safra asitlerinin yapıları ve bunların glisin ve taurin konjugatları (Monte vd., 2009).

İki ana safra asidi CA ve CDCA'dır. Bağırsak mikrobiyal florası, birincil safra asitlerinin bir kısmının, ana ürünler olan deoksikolik asit (DCA) ve litokolik asit (LCA) ile ikincil safra asitlerine dönüştürülmesinden sorumludur. İleumdaki enterohepatik dolaşım, gastrointestinal sistem boyunca tutarlı bir safra asitleri havuzu boyutunun korunmasından sorumludur. Safra asitlerinin yaklaşık %95'i kapı toplar damarında yeniden emilir ve daha sonra karaciğere geri taşınırken, yaklaşık %5'lik sadece küçük bir fraksiyon fekal atılım yoluyla elimine edilir. Safra asidinin metabolik rolü, lipidlerin emülsifikasyonunu kolaylaştırmak ve böylece bağırsak tarafından emilimini arttırmaktır (Xue, 2021).

Buna ek olarak, immünolojik yanıtların yönetimi, hücrelerde apoptozun kontrolü, glikoz metabolizmasına katılım ve daha pek çok şey dahil olmak üzere çok çeşitli şaşırtıcı ve önemli görevleri yerine getirme yeteneğine sahiptirler. Safra taşları, primer biliyer siroz ve kolorektal kanser dahil olmak üzere bir dizi rahatsızlık geçmişte bazı safra asitleri ile tedavi edilirken diğerleri kullanımları ile önlenmiştir. Apoptoz, nekroz ve iltihaplanma, zararlı safra asitlerinin birikmesinin nihai sonuçlarıdır. Metabolik hastalıkların patofizyolojisi, safra asitlerinin metabolizmasındaki değişikliklerin yanı sıra bu safra asitleriyle etkileşime giren bağırsak mikrobiyotasına kadar izlenebilir (Xie, 2021).



Şekil 2.4. Sindirim sistemi ve enterohepatik sirkülasyon (Mukhopadhyay ve Maitra, 2004).

2.2. Safra Asitleri Sentezi

Safra asitleri kolesterolden sentezlenir ve karaciğer kolesterolden safra asitlerini sentezleyebilen tek organdır. Safra asitlerine amfipatik yeteneklerini veren ve etkili lipid emülgatörleri olarak işlev görmelerini sağlayan, safra asidi oluşumu sırasında kolesterol molekülüne hidroksil gruplarının eklenmesidir. İnsanlarda safra asitlerinin yaklaşık %95'i klasik, geri kalan %5'i ise asidik sentez yolu kullanılarak oluşturulur (Zhang vd., 2021).

Hepatositler, kolesterolden türetilen birincil safra asitlerinin üretiminden sorumludur. Taurin veya glisin ile konjugasyonun ardından, kolonda safra yoluyla salınır ve burada lipidlerin parçalanmasına ve yağda çözünen vitaminlerin emilmesine yardımcı olurlar. Bağırsaktaki bakteriyel enzimler, ikincil safra asitlerinin oluşumuna yol açan birincil safra asitleri dekonjuge etme ve dehidroksile etme yeteneğine sahiptir. Yeniden emilen safra asitlerin büyük çoğunluğunun karaciğere geri taşınmasından portal akış sorumludur. İlacın ihmal edilebilir bir kısmı enterohepatik döngüyü atlayabilir veya sistemik dolaşıma ulaşır ya da dışkıda elimine edilir (Dawson ve Karpen, 2015; Hofmann ve Hagey, 2014).

İnsanlarda CA ve CDCA baskın safra asitleridir, ancak farelerde birincil safra asitleri CA, CDCA, ursodeoksikolik asit (UDCA) ve murikolik asit (MCA) içerir. CA ve CDCA safra tuzlarında da bulunur. Hepatositler safra asitlerini salgılamadan önce taurin veya glisin amino asidiyle konjuge ederek safra salgılarının suda çözünürlüğünü artırır. Bu, biliyer sekresyonların hazırlanmasında yapıldı. Konjuge CA ve CDCA başlangıçta kolonda bağırsak bakteriyel safra tuzu hidrolaz (BSH) tarafından dekonjuge edilir. Daha sonra CA ve CDCA, insanlarda 7-dehidroksilaz tarafından deoksikolik asit (DCA), litokolik asit (LCA) ve UDCA dahil olmak üzere sekonder safra asitlerine dönüştürülür. Enterohepatik resirkülasyon olarak adlandırılan bir süreçle, safra asitlerinin büyük çoğunluğu ileumdan portal sisteme ve daha sonra karaciğere geri emilir. Bu, sindirim sistemi boyunca gerçekleşir (Nguyen, ShawAnakk, 2022; Xie vd., 2021)

2.3. Safra Asitleri Sentez Yolakları

Safra asitleri, karaciğerde kolesterolden klasik/nötr yol veya alternatif yol olarak adlandırılan iki farklı yoldan biriyle üretilirler. Ara metabolitleri nötr steroller olduğu için "nötr" yol olarak da bilinen klasik yol, yalnızca karaciğerde bulunur ve insanlarda iki birincil safra asidini sentezler: CA ve CDCA. Bu yol, sitozol, mikrozomlar, mitokondri

ve peroksizomlarda bulunan enzimler tarafından katalize edilen bir dizi reaksiyondan oluşur (Monte vd., 2009; Xie vd., 2021).

2.3.1. Klasik yol / Nötr yol

Klasik yol, sadece karaciğerde lokalize yolun hız sınırlayıcı enzimi olan bir sitokrom P450 enzimi ile mikrozomal kolesterol 7 α -hidroksilaz (CYP7A1) tarafından katalize edilen C7'de kolesterolün hidroksilasyonu ile başlar. Kolesterol 7 α -hidroksilaz (CYP7A1) ve sterol 12-hidroksilaz (CYP8B1) enzimleri tarafından birincil safra asitleri olan CA ve CDCA'ya dönüştürülür.

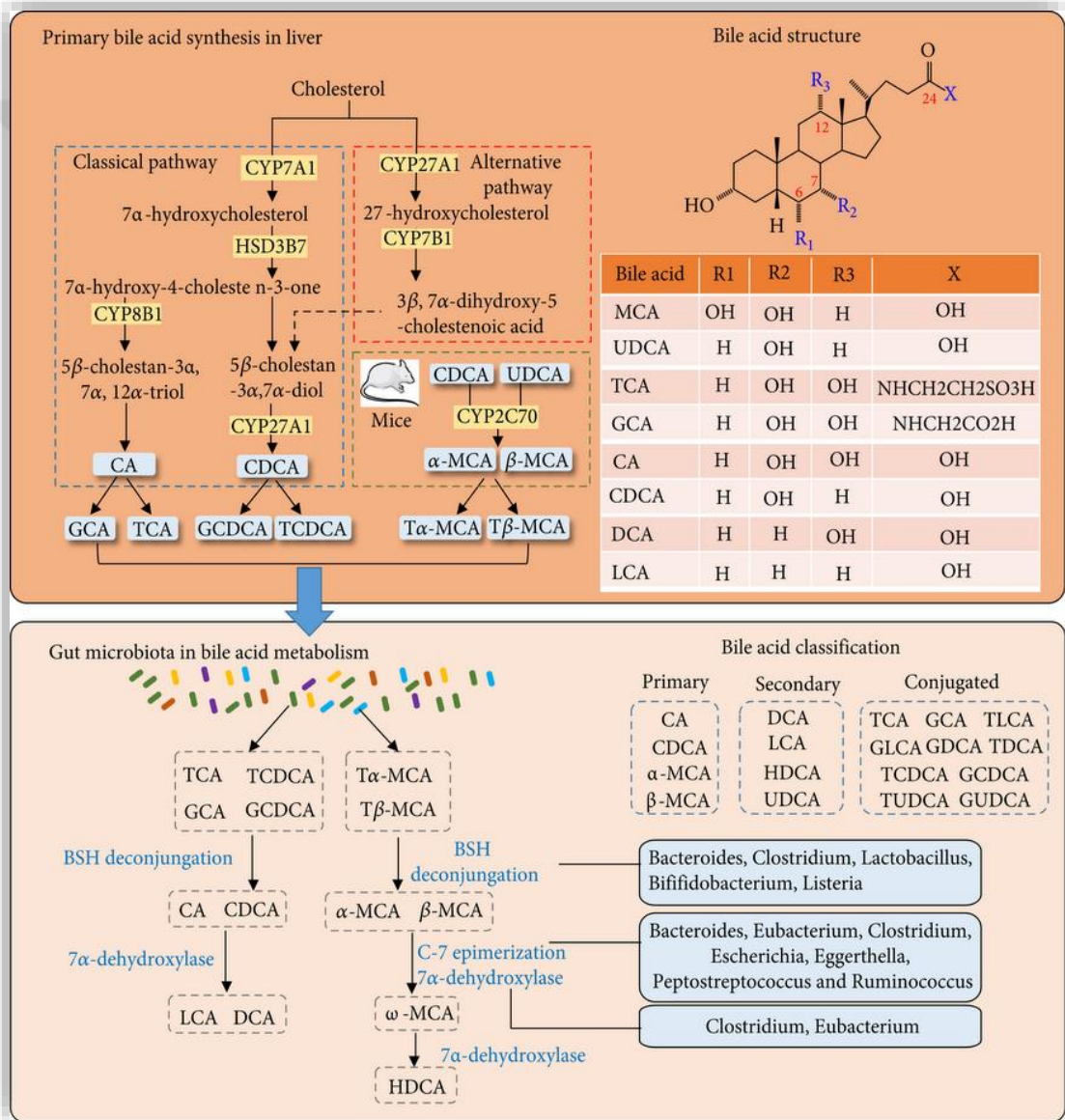
2.3.2. Alternatif yol

Alternatif yol sterol 27-hidroksilaz (CYP27A1) tarafından başlatılır ve esas olarak CDCA üretir. 7 α -hidroksikolesterol, yine mikrozomal olan 3 β -hidroksi- Δ 5-C27-steroid dehidrogenaz/izomeraz (HSD3B7) tarafından 7 α -hidroksi-4 kolesten-3-on'a dönüştürülür. CA'nın sentezi, yüksek oranda düzenlenmiş başka bir mikrozomal enzim olan sterol 12 α -hidroksilaz (CYP8B1) tarafından gerçekleştirilen, C12 pozisyonunda 7 α -hidroksi-4-kolesten-3-on'un hidroksilasyonunu gerektirir.

Sonraki adımda, CDCA ve CA elde etmek için sırasıyla CDCA ve CA'nın öncüleri olan 5 β -kolestan-3 α ,7 α -diol ve 5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α -triol'ün çift bağın indirgenmesini gerçekleştiren iki sitozolik enzim, Δ 4-3-oksosteroid-5 β -redüktaz (AKR1D1) ve 3 α -hidroksisteroid dehidrogenaz (AKR1C4) tarafından katalize edilir. Mitokondriyal sterol 27-hidroksilaz (CYP27A1) bu öncüllerin yan zincirine önce bir hidroksil grubu ekleyerek, önce bir aldehite ve daha sonra bir karboksilik aside oksitler. Bu reaksiyonlarda C27 pozisyonuna hidroksil grubu ekleyerek oksitlenme gerçekleştirilir. Sırasıyla 3 α ,7 α -dihidroksi-5 β -kolestanoik asit (DHCA) ve 3 α ,7 α ,12 α -trihidroksi-5 β -kolestanoik asit (THCA) ürünleri, safra asidi CoA sentetaz (BACS) veya çok uzun zincirli asil CoA sentetaz (VLCS) ile aktive edilir. Bu iki enzimde endoplazmik retikulumda lokalize halde bulunmaktadır. Ortaya çıkan kolestanoil-CoA'lar daha sonra, dört peroksizomal enzimin etkisini içeren bir süreç olan β -oksidasyon ile yan zincirin kısaltıldığı peroksizomlara taşınır.

Safra asidi CoA olarak da bilinen amino asit N-asiltransferaz (BAAT), terminal yan zincir karboksilik asidin amino asit glisin veya taurin ile konjugasyonu olan safra asidi üretiminin son aşamasından sorumludur. Peroksizomlar ve sitozol, BAAT'ın lokalize

olduğu bulunan iki yer olmasının yanı sıra peroksizomal BAAT'ın birincil safra asitlerinin peroksizom içinde konjugasyonundan sorumlu olduğunu, sitozolik BAAT'ın ise geri dönüştürülmüş safra asitlerinin yeniden konjugasyonunda rol oynayabileceğini gösterir. Ancak yapılan son araştırmalara göre, karaciğere dönen dekonjuge safra asitlerinin yeniden konjugasyon için peroksizoma gitmesinin gerekmesi BAAT'ın büyük ölçüde sitozolde ihmal edilebilir seviyelerde bulunan bir peroksizomal enzim olduğu varsayımını desteklemektedir (Monte vd., 2009; Weng vd., 2022; Zhang vd., 2021).



Şekil 2.5. Safra asidi sentezinin klasik nötr yolla şematik gösterimi (Weng vd., 2022).

2.4. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi

2.4.1. Kromatografi ve kromatografinin kısa tarihçesi

Kromatografinin Tswett tarafından keşfi, bu analitik tekniğin tarihinde, başlangıcını ve sonraki gelişimini işaret eden önemli bir an olarak kabul edilmektedir. Tswett'in çığır açan keşfinin kromatografi alanında önemli bir dönüm noktası olduğu, yaygın uygulama ve daha ileri gelişmelerin temelini attığı yaygın olarak kabul edilmektedir. Tswett tarafından tanımlanan süreç, bir numune çözeltisinin katı kalsiyum karbonat ile doldurulmuş bir cam kolondan geçirilmesini içeriyordu. Bu teknik, numune çözeltisinde bulunan farklı bileşenleri ayırmak için kullanılmıştır. Tswett, bu yöntemi kullanarak, kolon içindeki katı kalsiyum karbonatla olan diferansiyel etkileşimlerine dayanarak çeşitli maddeleri etkili bir şekilde izole edebilmiş ve tanımlayabilmiştir. Orta Çağ boyunca Venedik'te ve antik Roma'da, ilkel kromatografi olarak bilinen ilginç bir yöntemin kullanıldığını belirtmek gerekir. Bu prosedür, boyaların kalitesini belirleme ve bir karışım içindeki tek tek pigment boyaları ayırt etme amacına hizmet etmiştir. Bu tarihsel uygulama, renk analizi alanında kromatografi tekniklerinin erken dönem kullanımına ışık tutmaktadır. Modern kâğıt kromatografisinin öncüsü olarak kabul edilen kapiler analiz, bu özel görevi yerine getirmek için kullanılmıştır. Daha sonra, ilk keşfinden sonra, Schönbein tarafından filtre kâğıdı spot-test analizi yöntemi tanıtıldı. Bu yenilikçi teknik, filtre kâğıdı kullanılarak çeşitli maddelerin tanımlanmasına ve analiz edilmesine olanak sağlamıştır. Schönbein'in bu çalışma alanına katkısı, bilim insanlarına ve araştırmacılara değerli bir kaynak sağlaması açısından önemliydi (Wixom ve Gehrke, 2010).

Tswett'in yöntemi esasen bir elüsyon işlemidir. Gradient elüsyon Alm ve arkadaşları tarafından uygulamaya konulmuştur. Tswett'in deneylerinde, renkli bileşenler çözülmüş ve görsel olarak tespit edilmiştir. Renksiz maddeler kromatografik olarak ayrıldığında, bunların tespiti için başka araçlar kullanılmalıdır. Graf ve Skat yağ asitlerinin ayrılmasını takip etmek için magnezyum kolon üzerinde fenol kırmızısı kullanmıştır.

Kromatografi süreci, adını Yunanca "chromos" ve "graphy" kelimelerinden türeten Tswett tarafından verilmiştir. "Chromos" terimi "renk" anlamına gelirken, "graphy" "yazmak" anlamına gelmektedir. Dolayısıyla, Tswett bu bilimsel tekniği tanımlamak için uygun bir şekilde "kromatografi" adını seçmiştir. Kromatografi, şüphesiz analitik, organik ve klinik kimyanın yanı sıra biyokimya ve biyoteknoloji gibi çeşitli alanlar

üzerinde muazzam bir etkiye sahip olan benzersiz bir ayırma tekniği olarak durmaktadır. Modern zamanlarda kromatografik ayırma tekniği hem canlı renklere sahip olan hem de belirgin bir renk tonu içermeyen çok çeşitli maddelerin analizi ve saflaştırılması için yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Bu güçlü teknik, bilim insanlarının ve araştırmacıların bir karışım içindeki farklı bileşenleri, benzersiz kimyasal özelliklerine ve kromatografik sistemle etkileşimlerine göre ayırmalarına ve izole etmelerine olanak tanır. Kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi (TLC), kağıt kromatografisi, gaz kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, jel permeasyon kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve afinite kromatografisi bunlara birkaç örnektir (Coskun, 2016).

Çok kullanışlı bu teknik, hareketli fazın ardışık küçük fraksiyonlarının toplanması ve bunların refraktometri, radyometri, UV-spektroskopisi, kızılötesi spektroskopisi, kütle spektroskopisi (MS), kondüktimetri ve biyolojik aktivite gibi farklı analitik tekniklerle analiz edilmesidir. Renksiz maddeler renkli, UV-emici, IR-emici, floresan ve hatta radyo-etiketli maddelere dönüştürülerek tespit edilebilir. Uzun vadede, sıvı kromatografisinin (LC) gelişimini engelleyen en önemli faktör kullanışlı ve hassas dedektörlerin eksikliği idi. Bununla birlikte, 1942 yılında Tiselius ve Claesson tarafından kırılma indisi dedektörü ve daha sonra 1951 yılında Martin ve Randall tarafından elektriksel iletkenlik dedektörünü icat edilmiştir. Fakat, LC dedektörleri alanındaki gerçek ilerleme sadece son 30 yılda gerçekleşmiştir (Brondz, 2002).

2.4.2. Kütle spektrometresinin kısa tarihi

Kütle spektrometresi (MS) günümüzde analitik kimyanın sıklıkla kullandığı bir enstrümantal cihaz olsa da diğer birçok benzer enstrümantal cihaz gibi, MS’de fizik alanındaki gelişmeler sonucunda keşfedilmiştir. MS’de, pek çok önemli bilimsel keşfin sahibi olan J. J. Thomson tarafından farklı bir hedefin peşindeyken şans eseri icat edilmiştir. 1897’de Thomson, elektronların yük-kütle oranını (e/m) belirlemek için deneysel bir çalışma gerçekleştirmiştir. O dönemlerde fizikçiler arasında mevcut m/z yerine e/m ifadesi daha yaygındı. Sonraki iki yıllık dönemde, J. J. Thomson, asistanı Ebenezer Everett’in yardımıyla, yükün kütleye oranını (e/m) ve bir elektronun yükünü (e) aynı anda ölçebilen bir alet yapmıştır. Bu, elektronun kütlelerinin dolaylı olarak ölçülmesine izin vermiştir. Elektronu "keşfetme" konusundaki çalışmalarından dolayı 1906 Nobel Fizik Ödülü’ne layık görülmüştür (McLafferty, 2011).

Thomson'ın katot ışınları çalışmasına yaptığı ilk katkılar, MS alanının temelini atmıştır. Thomson, daha sonra 1922'de kendi Nobel Kimya Ödülü'nü alacak olan öğrencisi Francis Aston ile iyonize atomların kütlelerinin belirlenmesi için yüklü atomların kütlelerini ölçebilen ilk kütle spektrometresini başarıyla inşa etmişlerdir. (Münzenberg, 2013).

1980'lerde, küçük organik moleküllerin MS kullanılarak analizi yaygın bir uygulama haline gelmiştir. Proteinler, özellikle büyük olanlar, ayrıca nükleik asitler ve kompleks karbonhidratlar gibi diğer makro moleküller daha büyük bir zorluk oluşturmaktaydı. Sorun, o dönemde iyonlaşmanın, analit ile yüklü bir parçacık arasındaki gaz fazındaki çarpışmalara bağlı olmasıydı (Berdie vd., 2012; Siuzdak, 2006).

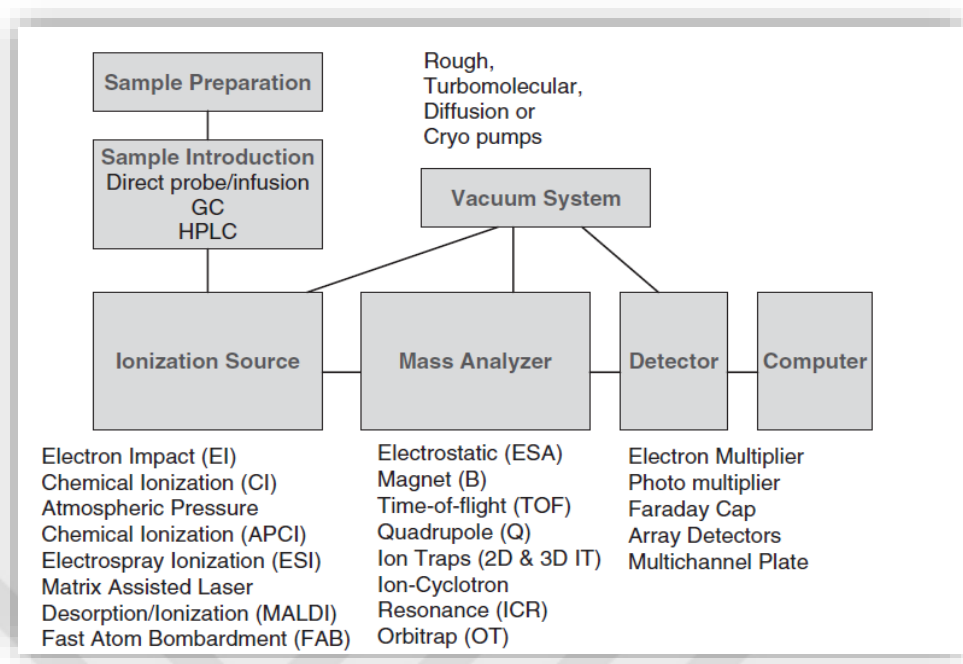
1988 yılı, kütle spektrometrisi alanında iki önemli tekniğin, yani Elektrosprey İyonlaştırma (ESI) ve Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma (MALDI)'nın neredeyse aynı anda ortaya çıkışı biyolojik kütle spektrometresinde devrim yaratmıştı ve günümüzde makro molekülleri iyonize etmek için birincil yöntemler olarak kullanılmaya devam etmektedir (Siuzdak, 2006).

MS, gelişen teknolojik analiz yöntemleri içerisinde son derece sağlam ve çok yönlü bir analitik teknik olarak, moleküler kütlelerin hassas ve doğru bir şekilde belirlenmesi, kimyasal bileşiklerin tanımlanması ve yapısal özelliklerinin aydınlatılması için modern analitik metodolojilerin ön saflarına itilmiş, çeşitli bilimsel disiplinlerde büyük ilgi görmüş ve yaygın olarak kullanılmıştır.

2.4.3. Kütle spektrometresinin çalışma prensibi

MS, çeşitli bilimsel alanlarda kullanılan çok değerli bir analitik tekniktir. İyonların kütle-yük oranının (m/z) ölçülmesine olanak tanıyarak moleküllerin bileşimi ve yapısı hakkında önemli bilgiler sağlar. MS, belirli bir bileşiğin yanı sıra biyomoleküllerin, polimerlerin ve diğer parçacıkların kesin moleküler ağırlığını belirleyerek, özelliklerinin aydınlatılmasında çok önemli bir rol oynar.

MS ile yapılan analizlerde en önemli adımlardan biri numunede bulunan analitlerin iyonlaştırılmasıdır. Bu adım, nötr moleküllerin analiz için yüklü hale getirilmesi ve MS içerisinde doğru bir şekilde yönlendirilebilmesi için son derece önemlidir. Moleküller iyonizasyona tabi tutularak elektron kazanması veya kaybetmesi sağlanır (Siuzdak, 2006).

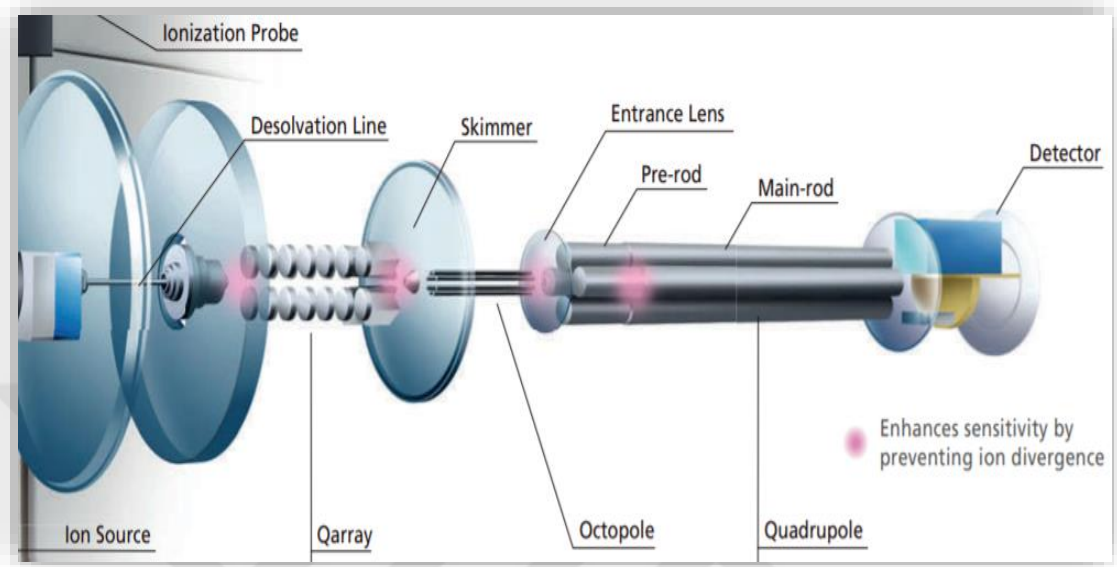


Şekil 2.6. MS cihazının bileşenleri (Somogyi, 2008)

Yüklü hale gelen moleküller parçalanarak birden fazla küçük moleküle dönüşebilirler. Alternatif olarak, moleküller herhangi bir parçalanma olmadan da bir yük kazanabilir. Bu iki farklı olasılık, analizin bu aşamasında moleküllerin üstlenebileceği çeşitli yolları vurgulamaktadır. MS içerisine gönderilen moleküller iyonik hale geldiklerinde önce hızlandırılır ve ardından bir elektrik veya manyetik alana maruz bırakılır. Bu alanlar iyonlar üzerinde bir kuvvet uygulayarak m/z oranlarına bağlı olarak farklı yönlerde hareket etmelerine neden olur. Bu sayede de numunede bulunan iyonların bileşimi ve bolluğu hakkında bilgiler sağlar. Bir kütle spektrumu, iyonların yoğunluğunu ilgili kütle-yük oranlarına karşı çizilerek, analiz edilen maddelerin moleküler kütleleri hakkında fikir verir (Dass, 2006; Siuzdak, 2006).

Bu analitik teknik, kimya, biyokimya ve adli bilimler de dahil olmak üzere çeşitli alanlarda bileşikleri tanımlamak ve miktarlarını belirlemek, moleküler etkileşimleri incelemek ve karmaşık biyolojik sistemleri araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel olarak kütle spektrumu, araştırmacıların ve bilim insanlarının karmaşık moleküllerin kütlelerini tespit etmek, ayrımını yapmak ve daha derin bir anlayış kazanmaları için güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır. Bilim insanları bu spektrumları kullanarak numunede bulunan belirli kimyasal bileşenlere ilişkin değerli bilgiler elde edebilirler. Bu analitik teknik, numunedeki çeşitli bileşiklerin ve elementlerin

tanımlanmasında ve karakterize edilmesinde çok önemli bir rol oynar. Böylece araştırmacıların kimyasal içeriğini daha iyi anlamalarını sağlar (Rončević vd., 2023).



Şekil 2.7. MS cihazının şematik gösterimi (<http-3>)

Başlangıçta sınırlı sayıda analitin hedefe yönelik kalitatif ve kantitatif analizi için kullanılırken, son zamanlarda gelişen teknoloji ile birlikte modern MS ölçüm modları, özellikle klinik ve akademik araştırmaların bir parçası olarak bilinen-bilinmeyen bileşiklerin analizi için yeni olanaklar yaratmıştır. Son yıllarda, geçirdiği bu gelişmeler onu kimya, biyokimya, eczacılık ve tıp alanlarında vazgeçilmez bir analitik araç haline getirmiştir. Kütle spektrometresinin kullanımı hem kalitatif hem de kantitatif analizleri kapsayan geniş bir uygulama yelpazesini kapsar (Berdié vd., 2012; Muguruma vd., 2022).

MS verilerinin çoğunluğu tipik olarak m/z olarak bilinen kütle-yük oranı birimlerinde ifade edilir. Bu bağlamda, "m", iyonun dalton cinsinden moleküler ağırlığını temsil ederken, "z", ölçülen moleküle ilişkili yüklerin sayısını belirtir. Bunun yanı sıra prensipte, kimyasal bileşikler iyonizasyon sürecine tabi tutarak çalışır, böylece yüklü moleküller veya molekül parçaları üretir. İyonların MS'e iletilmesini sağlayan kapilerin etrafından iyonlaşma odasına püskürtülen ve spreyin kurutularak iyon verimini artıran gaz sıcaklığı ve akış hızı, iyon kaynağı parametrelerinden bazılarıdır. "Sheath gas" olarak bilinen gaz, numunenin dağılmasını engelleyerek ve MS'e daha fazla iyonun iletilmesine yardımcı olur. "Nebulizer" olarak adlandırılan sprey gazı, sıvı haldeki bir örneği

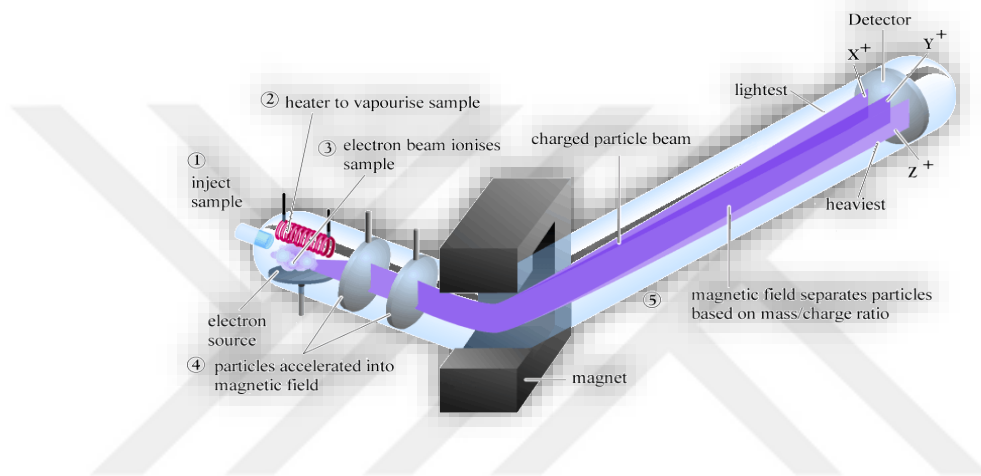
iyonlaşma odasına spreylere ve basınçla ayarlanır. Kolondan gelen örneğin akış hızı, hareketli faz içeriği Nebulizer'in optimizasyonunu birbirine bağlı parametrelerdir. İyonlaşma odasında ve parçalama hücrelerinde kullanılan gaz ise azot gazıdır. Kapilere voltaj uygulanarak elektrik alan oluşturulurken, iyonlar MS içerisinde kütle analizörüne gönderilir. Molekül ağırlığına bağlı olarak optimum hale getirilir. İğnenin ağız kısmına uygulanan "Nozzle voltage" ise analiz edilecek bileşiğin polaritesine bağlı olarak değişebilen bir parametredir. Elde edilen yüklü moleküllerin veya molekül parçalarının m/z oranları daha sonra dedekte edilerek ölçülür.

Bir iyon kaynağı (iyonizasyon), bir kütle analizörü (iyon ayırma) ve bir dedektör (iyon algılama ve niceleme), bir MS'in üç ana bileşenidir (Fenn, 2003). Kütle analizörü, dedektör ve bazı iyon kaynakları için yüksek vakum koşulları gereklidir, böylece iyonlar diğer gaz molekülleri veya atomlarla çarpışmadan dedektöre gidebilir. Kütlesi 1000 Da'dan az olan moleküllerde genellikle tek bir yük olduğundan, m/z oranının değeri moleküler iyonun kütlesi ile aynıdır. Bununla birlikte, proteinler veya peptidler gibi daha büyük moleküller incelendiğinde, bu tür moleküller genellikle çok sayıda iyonik yük içerdiğinden, z değeri 1'den büyük bir tam sayıdır. Bu gibi durumlarda, m/z sayısı iyonun toplam kütlelerinin yüzdesi olarak ifade edilir (Rockwood, KushnirClarke, 2018).

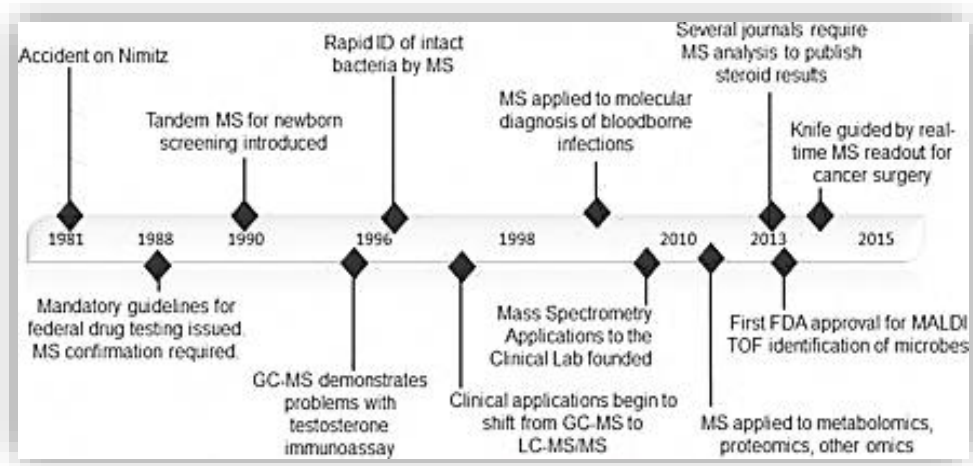
Bileşiklerin iyonizasyonu, kaynakta, protonasyon (protonation), katyonizasyon (cationization), deprotonasyon (deprotonation), elektron yakalama (electron capture), nötr bir molekülün elektron fırlatma yoluyla iyonizasyonu, yüklü bir molekülün gaz fazına transferi dahil olmak üzere çeşitli farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilir (Siuzdak, 2006). Sonuçlar, iki boyutlu bir gösterim olan kütle spektrumu biçiminde sunulur. Dikey eksen (ordinat) iyonik türlerin sinyal yoğunluğunu veya bolluğunu gösterilirken, yatay eksen (apsis) m/z değerlerini temsil eder (Berdie vd., 2012).

MS veya tandem kütle spektrometresi (MS/MS) ile birleştirilmiş LC, günümüzde klinik ve bilimsel alanda özellikle birçok bileşiğin analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak biyoanalitik araştırmalarda, son derece hassas, kantitatif, geniş aralıklı ve yüksek verimli bir SK-KS/KS tahlilinin geliştirilmesi, hedeflenen metabolomik için zorlu bir görevdir. Bu durum özellikle karmaşık biyoakışkanlardan gelen polar metabolitler göz önüne alındığında bu zorluk daha da artmaktadır. SK-KS/KS, minimum numune hazırlama gereksinimleri, etkili ayırma yetenekleri ve son derece hassas tespit yetenekleri dahil olmak üzere çeşitli avantajlar sağlar (David, MoldoveanuGalaon, 2021; Toyo'Oka, 2017)

SK-KS/KS, insan ve kemirgen idrarı (Alnouti, CsanakyKlaassen, 2008; Ikegawa vd., 1999), plazma/serum (Alnouti, CsanakyKlaassen, 2008; Bootsma vd., 1999), safra (Perwaiz vd., 2001; Plumb vd., 2009), bağırsak içeriği (Hagio vd., 2009; Hamilton vd., 2007), karaciğer (Hagio vd., 2009; Suzuki vd., 2013) ve dışkı (Cai vd., 2012; Hagio vd., 2009) gibi çeşitli biyolojik matrislerde ilgilenilen biyobelirteçlerin veya biyoaktif bileşiklerin doğru bir şekilde tespit edilmesi ve miktarının belirlenmesi için tercih edilen ve oldukça hassas bir analitik yöntemdir.



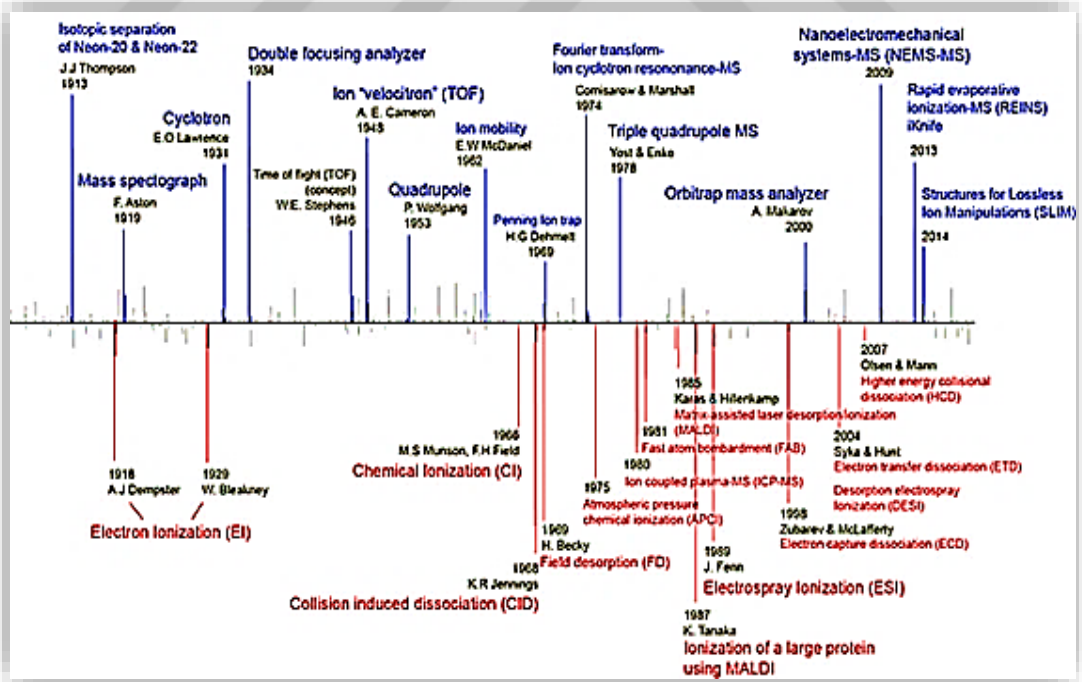
Şekil 2.8. MS cihazının şematik gösterimi (http-4)



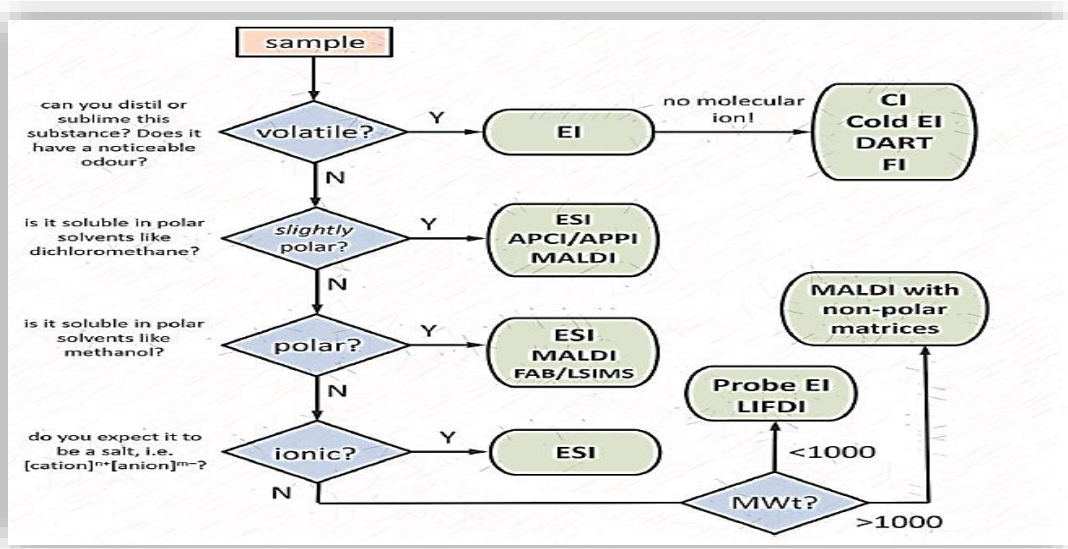
Şekil 2.9. Klinik MS'in bazı önemli olayların yaklaşık zaman çizelgesi (Jannetto ve Fitzgerald, 2016).

2.4.4. İyonlaştırma yöntemleri

Analizi yapılacak olan bir analitin uygun iyonizasyon yönteminin seçimi, söz konusu molekülün doğasına, spesifik kimyasal özelliklerine sıkı sıkıya bağlıdır. Her molekülün mevcut tüm iyonizasyon yöntemleri kullanılarak etkili bir şekilde iyonize edilemeyeceğini unutmamak önemlidir. Örneğin, uçucu olmayan ve biyomoleküllerin önemli bir kısmı gibi ısı hassasiyetine sahip olan bazı moleküllerin elektron iyonizasyonuna (EI) tabi tutulduğunda bazı sınırlamalarla karşılaşılır. Bu özel iyonizasyon yöntemi, başarılı bir iyonizasyon için ön koşul olarak numunenin termal buharlaştırılmasını gerektirir. Uçucu olmayan ve ısıya duyarlı moleküller, bu gereksinimi karşılayamamaları nedeniyle EI yoluyla iyonizasyona tabi tutulamazlar. İyonizasyon yöntemlerinin uygulanabilirliği, incelenen moleküllerin spesifik özelliklerine ve niteliklerine bağlı olarak değişmektedir ve bu sebeple de en iyi sonucu elde etmek için farklı iyonizasyon tekniklerinin uygunluğunu dikkatle değerlendirilmelidir (Somogyi, 2008).



Şekil 2.10. İyonizasyon tekniklerinin tarihsel gelişimi (http-5).



Şekil 2.11. Bir iyonizasyon tekniğinin seçimi için akış şeması (Vikse ve Scott McIndoe, 2018)

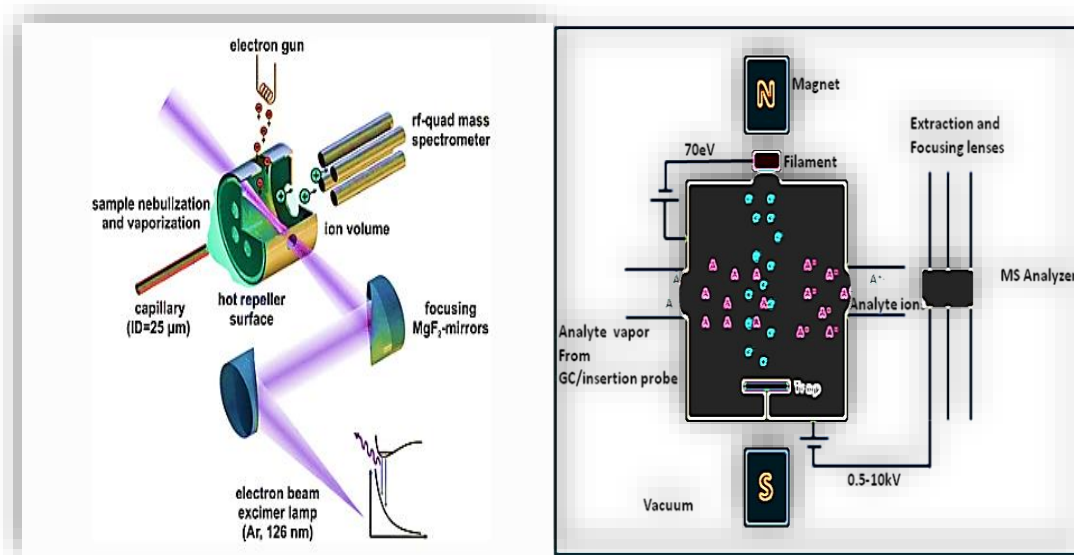
2.4.4.1. Elektron etkisi (Electron impact (EI))

Elektron Etkisi (EI) basit ve sık kullanılan bir sert iyonizasyon işlemidir. EI İkinci Dünya Savaşı sırasında Amerikalı-Kanadalı bilim adamı Arthur Jeffrey Dempster tarafından ortaya atılmıştır. EI prensibinde yüksek enerjili elektronlar kullanarak gaz fazı moleküllerinden radikal katyonlar üretir. İyon bu süreçte iç enerji kazanır ve bir elektron kaybederek molekülsüz parçalanmaya neden olur. Temelde, bir numunenin doğrudan analizöre bağlı bir vakum sisteminde bulunan kaynakta uçurulmasıyla yapılır. Numune girişi gaz halinde olduğu için katı prob ve kaynağın ısıtılması gereklidir. Bu sayede bir elektron demeti tarafından bombardımana tutulmuş olur. Isıtılmış Tungsten veya Renyum filamentten üretilen bir elektron ışını kullanır. Ön gerilim voltajı en yaygın olarak -70 voltur. Işıktan gelen bir elektron, pozitif yüklü iyonlar oluşturmak için analit atomlarından veya moleküllerinden bir elektron koparır. Elektron demeti gaz fazı molekülünden bir iyon fırlatarak radikal bir iyon üretir. Konsantre ışın için iyonlar kaynaktan yarıklara doğru hareket eder. Bu iyonik ışın, manyetik alanda tarandıktan sonra iyonların kütle/yük oranına göre ayrıldığı bir elektromıknatısın kutupları arasındaki bir uçuş tüpünden geçer. Yoğunluğa karşı kütle/yük oranı grafiği, numunenin kütle spektrumunu gösteren iyonların elektron veya foto çoğaltıcı tespitine dayanmaktadır. Uçucu metal içeren bileşiklerin net EI spektrumları vardır. Metal içeren bileşiklerin çoğu, yüksek vakum koşullarında bile anlamlı bir buhar basıncı oluşturmadan önce ısıtılmış bir

yüzey üzerinde parçalanır, bu nedenle ilgili türü bozulmadan gaz fazına sokmak ana zorluktur. Kütleleri 1000 Da'un altında olan metal karboniller, ana grup organometalikler ve metalosenler iyi EI-MS üretir. EI, GC-MS için en yaygın kullanılan yöntemdir (Medhe, 2018; Vikse ve Scott McIndoe, 2018).

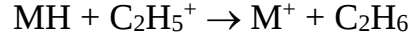
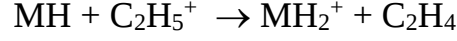
2.4.4.2. Kimyasal iyonizasyon (Chemical ionization (CI))

Kimyasal iyonizasyon (CI), Elektron Darbe kütle spektrumunda moleküler iyon bulunmadığında kullanılabilen yumuşak bir iyonizasyon yöntemidir. Burnaby Munson ve Frank H. Field 1966 yılında kimyasal iyonizasyona öncülük etmiştir (Harrison, 2018). Bu teknik elektron iyonizasyonundan çok daha az enerji gerektirir. Daha düşük bir enerji bazen parçalanma olmaması ve/veya daha basit bir spektrum ile ilişkilidir. Daha yumuşak bir iyonizasyon yaklaşımı olarak, daha az parçalanma üretir ve moleküler iyonları bulmayı daha basit hale getirir. Bir reaktif gaz olan metanın nispeten yüksek bir basınçta (1 mbar), yaygın bir elektron darbe kaynağında iyonize edilmesini gerektirir. Gaz fazı reaksiyonu, oluşturulan reaktif iyon gazı proton transfer mekanizmasının gerçekleştiği analitik molekülle çarpıştığında meydana gelir. Reaktif gazlar olarak genellikle metan, izobüten ve amonyak kullanılır (Medhe, 2018).

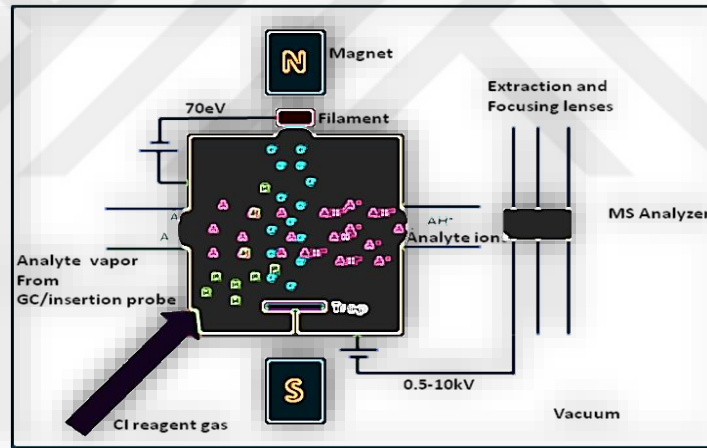
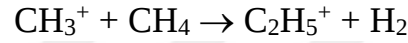
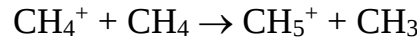


Şekil 2.12. EI kaynağının şematik diyagramı (Schepler vd., 2013)(<http-6>).

CI'de bir reaktif iyonu, proton veya hibrit transferi yoluyla iyonlar oluşturmak için analit molekülleriyle reaksiyona girer:



Reaktif iyonları, bir EI iyon kaynağına (analite kıyasla) önemli miktarda metan enjekte edilerek oluşturulur. Elektron çarpışmaları metan ile reaksiyona girerek CH_5^+ ve $C_2H_5^+$ veren CH_4^+ ve CH_3^+ üretir:



Şekil 2.13. CI kaynağının şematik diyagramı (http-1).

2.4.4.3. Alan iyonizasyon (Field ionization (FI))

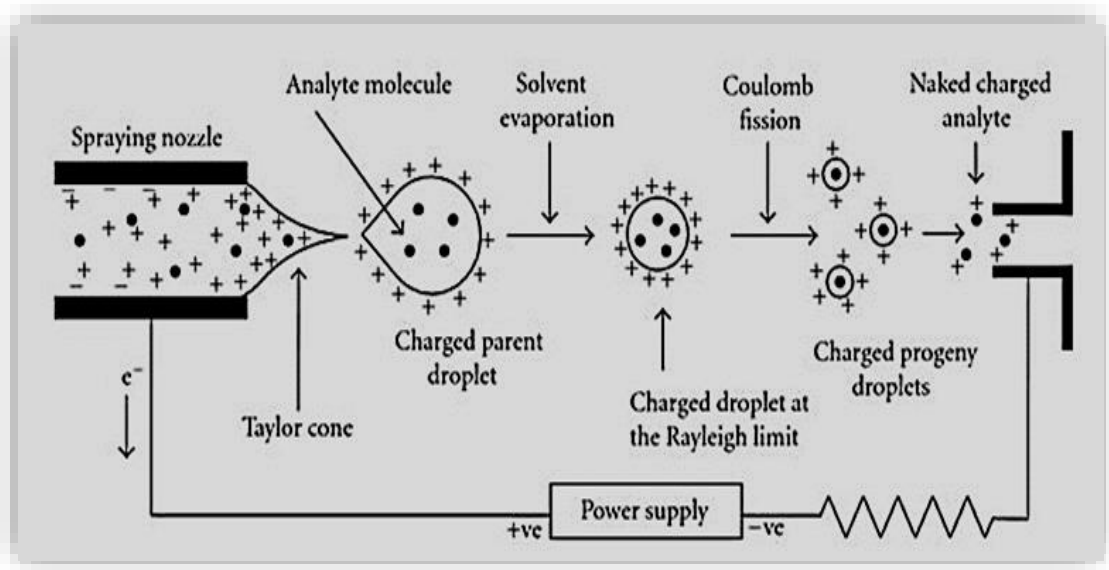
Alan iyonizasyonu uçucu, termal olarak kararlı maddelere uygulanabilecek bir iyonizasyon yöntemidir. Parçalanma olmadan moleküler iyonlar oluşturulur. Gaz fazındaki bir örnek molekül, birbirine yakın ve yüksek elektrik alanına sahip iki elektrot arasına konarak elektrostatik kuvvet ve vakum altında uygun şekilde sahip bir metal yüzey ile örnek moleküllerden elektronların fazla enerji iletmeden dışarı atılması sağlanır. Termal olarak kararsız ve uçucu olmayan numuneler için uygun olmaması ve elektron

çarpma iyon kaynağından daha az hassasiyete sahip olup düşük parçalanma sebebiyle yapısal bilgi üretmemesi negatif yönleridir (Vikse ve Scott McIndoe, 2018).

2.4.4.4. Elektrosprey iyonizasyon (Electrospray ionization (ESI))

En çok kullanılan iyonizasyon yöntemi ESI'dir. Elektrosprey, atmosferik basınçtaki bir sıvı akışına, bazen gaz yardımı ile yüksek voltaj uygulanarak oluşturulur. Sprey özellikle MS vakum sistemi içindeki bir açıklığa doğru hedeflenir. Bu sistem içinde damlacıklar, ısı, vakum ve voltajların neden olduğu hızlanma kombinasyonu ile elde edilen bir çözülme sürecine tabi tutulur. Daha sonra iyonların damlacıklardan dışarı atılması ve kütle analizörüne doğru hızlandırılması, voltajların uygulanmasıyla sağlanır. Daha büyük moleküller söz konusu olduğunda, iyonlar birden fazla yüke sahip olabilir. Bu özellik, kısıtlı kütle-yük oranı aralıklarına sahip analizörlerde çok büyük moleküllerin tanımlanmasını sağlar.

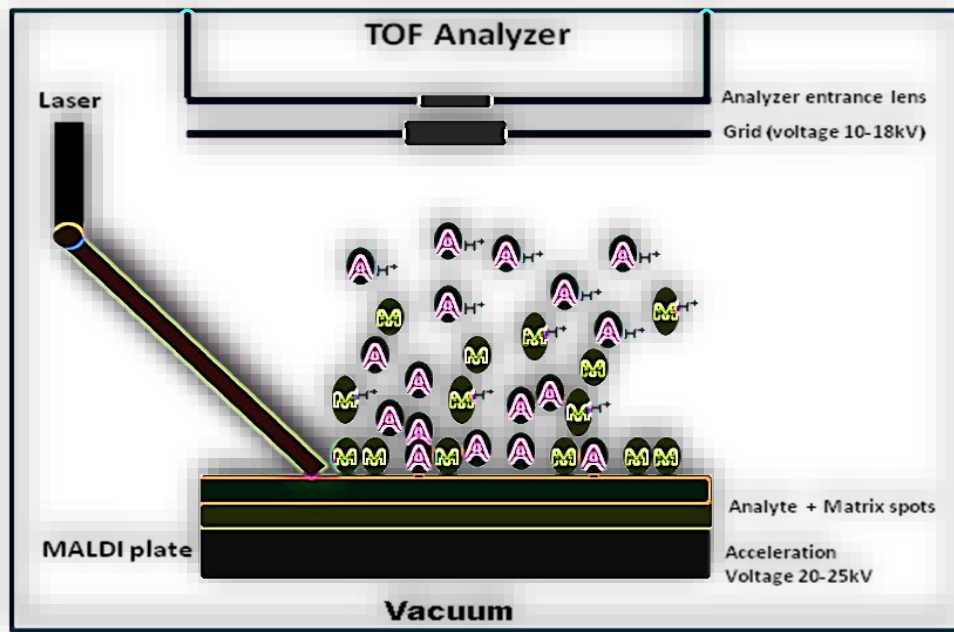
2002 yılı Nobel Ödülü sahibi Fenn, 1980'lerde bu yöntemin öncülüğünü yapmıştır ve son derece büyük biyolojik makromoleküller için de kütle spektrumu oluşturabilme imkanının olduğunu göstermiştir (Fenn, 2003). Çığır açan bu yenilik, MS'in uygulama alanını tamamen değiştirerek, birçok uygulamada da kullanılmasının yolunu açmıştır (Vikse ve Scott McIndoe, 2018; Yamashita ve Fenn, 1984).



Şekil 2.14. ESI kaynağının şematik diyagramı (<http-7>).

2.4.4.5. Matris yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyonu (Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI))

Analitlerin bir yüzeyden desorbe edilmesi amacıyla yüksek hızlı partiküllerin kullanıldığı iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmesi önemli bir araştırma alanı olmuştur. Önceleri alfa parçacıkları kullanımı plazma desorpsiyonu için temel oluşturmuştu. Bununla birlikte, numune ablasyonunda lazerlerin kullanımı, işlem sırasında numuneleri ayrıştırma eğilimi nedeniyle engel oluşturmaktaydı. Bu sınırlama ise 2002 yılında Nobel ödüllüne layık görülen Koichi Tanaka'nın kobalt tozunun etkinliğinin tekniğin potansiyelini tam olarak gerçekleştirmesini sağlayan uygun matrislerin geliştirilmesiyle aşıldı. Daha sonra Karas ve Hillenkamp, biyomoleküler analiz için öncelikle aromatik asitlerden oluşan organik matrisleri tanıtarak kayda değer katkılarda bulunmuştur. Bu gelişmeler, mevcut tekniklerin yelpazesini genişletmiştir (Karas vd.; Tanaka vd., 1988) Matris maddesi, gelen ışığın önemli bir bölümünü absorbe eder ve bunun sonucunda matris gaz fazına geçerek ablasyona uğramaktadır. Bu esnada, ilgili analit ablasyona uğramış matris ile birlikte taşınır. Gaz fazında çok sayıda karmaşık süreç meydana gelir ve lazer atımı tarafından üretilen yüksek enerjili katyon bulutu, uyarılmış moleküller ve yüklü iyonların ortaya çıkmasına yol açar (Vikse ve Scott McIndoe, 2018).



Şekil 2.15. MALDI kaynağının şematik diyagramı (http-1).

2.4.5. Kütle analizörleri

Kütle spektrometresinin çok önemli bir bileşeni olan kütle analizörü, iyonize kütlelerin ayrılmasında ve saptanmasında çok önemli bir rol oynar. Yük-kütle oranları ilkelerinden yararlanan bu cihaz, iyonları etkili bir şekilde ayırır ve ardından onları dedektöre yönlendirir. Dedektör tarafından yakalandıktan sonra, bu iyonlar titizlikle algılanır ve ardından daha fazla analiz ve yorumlama için dijital bir çıktıya dönüştürülür. İyonların ayrılması ve analizi için yaygın olarak kullanılan bir teknik olan kütle spektrometresi alanında, altı kapsayıcı kütle analiz cihazı kategorisi vardır.

Analit iyonlarının gaz halinde üretilmesi üzerine, iyonları kütle-yük oranlarına (m/z) göre ayırmak amacıyla çok çeşitli kütle analizörleri kullanılır. Kütle spektrometreleri, vakum ortamında elektrik ve manyetik alanlarda yüklü parçacık dinamiği ilkelerini kullanan bilimsel araçlardır. Bu dinamikler, yüklü parçacıklar ve elektromanyetik alanlar arasındaki etkileşimi tanımlayan köklü Lorentz kuvvet yasası Denklem 2.1 ve bir parçacığa etki eden kuvvetleri onun ivmesi ile ilişkilendiren Newton'un ikinci hareket yasası Denklem 2.2 tarafından yönetilir.

$$F = z(E + v \times B) \quad (2.1)$$

$$F = m \times a \quad (2.1)$$

Bu denklemlerin eşitliği, yüklü parçacıkların dinamiklerini karakterize eden bir denklem verir Denklem 2.3.

$$(m/z) \times a = (E + v \times B) \quad (2.3)$$

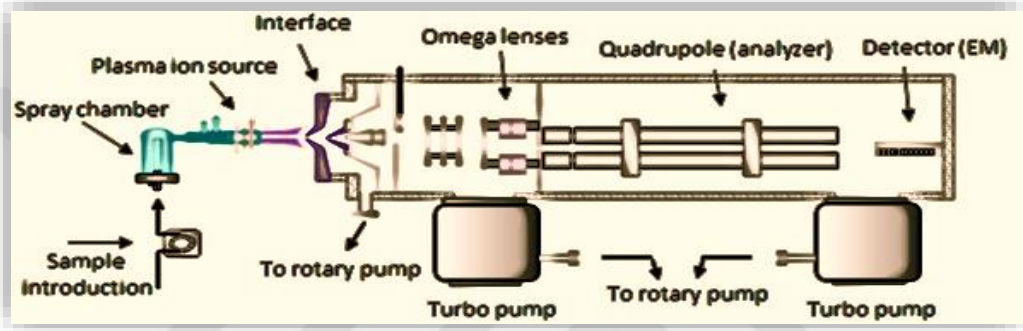
Kütle spektrometresi alanında, m/z olarak gösterilen eşdeğer bir fiziksel niceliğe sahip iki parçacığın ayırt edilemez davranış sergilediği gözlemlenir. Sonuç olarak, tüm kütle spektrometrelerinin, parçacıkların mutlak kütlesini ölçmenin aksine, m/z ölçmesinin ve ölçülen parametre olarak m/z 'ye yönelik bu tercihin, kütle spektrometresi alanında yaygın bir uygulama olmasını ortaya koyar (Rubakhin ve Sweedler, 2010).

2.4.5.1. Dört kutuplu (Quadrupole) kütle analizörü

Ucuz fiyatı, dayanıklılığı ve güvenilirliğinin bir sonucu olarak, dört kutuplu kütle analizörleri, çok çeşitli laboratuvarlarda ve disiplinlerde kütle spektrometreleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Doğru akım uygulanması sonucunda tüm yüklü moleküllerin hızlandırılması ve bu

sayede de yüklü moleküllerin merkezi ekseninde dedektöre doğru ilerlemesi sağlanır. Bu fenomen, m/z oranıyla doğru orantılı bir şekilde gerçekleşmektedir. Rotalarının önemli ölçüde sapması durumunda, metalik çubuklarla veya kabın sınırlarıyla çarpışacak ve bu da çarpışma sonucunda momentumlarının soğurulmasına neden olacaktır. Gelen partiküllerdeki farklı m/z oranlarını ayarlamak, spesifik m/z 'lerin dedektöre doğru yönelmek ve dedektörde optimum algılama için kütle spektrumunun manyetik alanı olarak düşünülebilir (Haag, 2016)



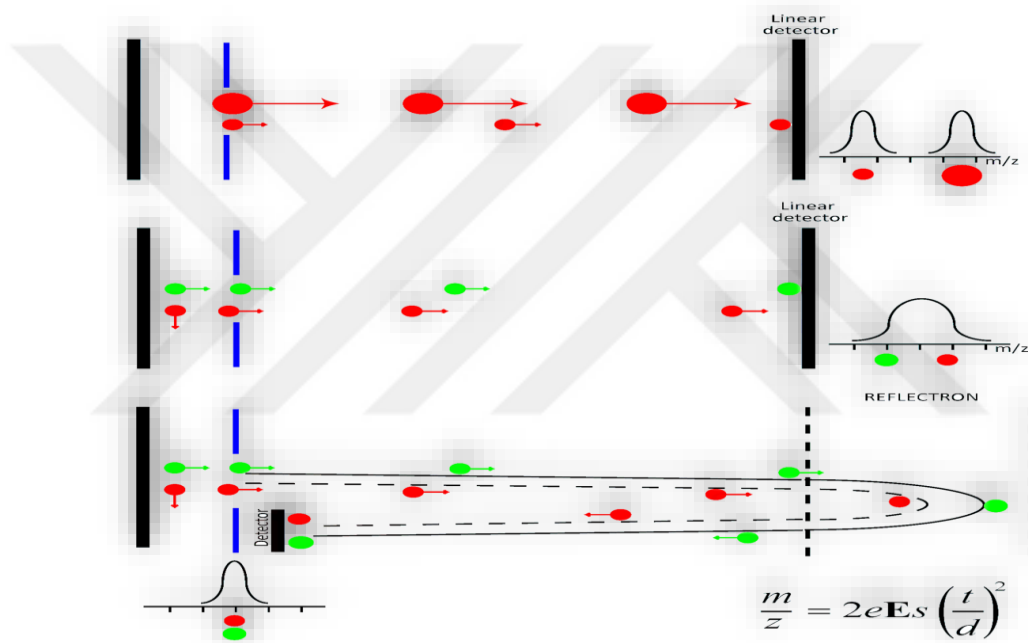
Şekil 2.16. Dört kutuplu Kütle Spektrumu diyagramı (http-1).

2.4.5.2. Uçuş süresi kütle analizörü (Time of flight analyzer (TOF))

TOF kütle analizörü, nispeten basit bir mekanizma ile çalışır. Doğrusal modda, iyonların bir iyon kaynağından çıkarılmasını ve ardından kısa elektrostatik alan darbeleri kullanılarak tek yönlü bir şekilde hızlandırılması sağlanır. İyonlar daha sonra bir sürüklenme alanına girerek serbestçe hareket etmeleri sağlanır. Tüm iyonlar eşit kinetik enerji ile hızlandırılarak farklı yüklere sahip iyonların hareketinin kütlelerinden etkilenmesi ve bu sayede de daha hafif kütleli ve aynı yüke sahip iyonların, daha ağır kütleli iyonlara göre daha yüksek hızlar sergilemeleri ve dedektöre daha ağır iyonlardan önce ulaşması sağlanır. Bu temelde uzamsal ayırım, zamansal algılamaya yol açar. Doğrusal modun, iyonların değişen konumlara ve hızlara sahip olduğu ve dedektöre iyon varış sürelerinin yayılmasına neden olduğu bir dezavantaj söz konusudur. Bu bağlamda sinyallerin uzaysal dağılımı, dedektörde daha düşük genliklere sahip geniş sinyallerin oluşmasına neden olmakta sonuç olarak da çözünürlük ve algılamada hassasiyetinin azaldığı durumların ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir.

TOF kütle analizörleri, çözünürlüğü artırmak için iki farklı yaklaşım kullanır. EI

ekstraksiyonu olarak da bilinen gecikmeli ekstraksiyon tekniği, MALDI iyon kaynağında üretilen iyonların gecikmeli olarak kütle analizörüne enjekte edilmesi prensibine dayanmaktadır. Belirli uygulamalarda alternatif bir yöntem ise, yansıtıcı iyon optiğinin, özellikle reflektör veya reflektör modunda çalışan iyon aynalarının kullanımını şeklinde ortaya çıkar. Metabolitlerin, peptitlerin ve küçük ila orta ölçekli proteinlerin analizinde her iki yaklaşım da yaygın olarak kullanılır. Gecikmeli ekstraksiyonlu lineer çalışma modu, büyük molekülleri ve moleküler agregatları analiz etmek için hala tercih edilen seçimdir (Haag, 2016).



Şekil 2.17. TOF analizörü diyagramı (<http-2>).

3. KULLANILAN KİMYASAL VE CİHAZLAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Asetonitril	: Sigma-Aldrich marka ($\geq$ %99.9; gradiyent saflıkta)
Metanol	: Sigma-Aldrich marka ($\geq$ %99.9; gradiyent saflıkta)
Formik asit	: Merck, Almanya
Asetik asit	: Merck, Almanya
Amonyum Format	: Merck, Almanya
Su	: Sigma Aldrich, Almanya

3.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Sıvı Kromatografisi cihazı	: Agilent 1290 Infinity Binary, Almanya
Kütle Spektrometresi	: Agilent 6460 Triple Quad MS
Sabit faz	: Agilent Zorbax Eclipse C18 (2.1mm x 100 mm)
Buzdolabı	: Arçelik, No Frost & Electronic, Türkiye
Hassas Terazi	: Mettler Toledo, XP205, İsviçre
Ultrasonik Banyo	: Millipore Ultrapure Water System, Fransa
pH metre	: Mettler Toledo
Ultra saf su cihazı	: Millipore Ultrapure Water System, Fransa
Vorteks Karıştırıcı	: Jeio Tech, VM 96 B, Kore
Pipet	: Eppendorf AG, Almanya
Su Banyosu	:Mettler, WNB 14. Almanya

4. YÖNTEM

4.1. Çözücü Sistemi ve Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan 23 adet konjuge ve konjuge olmayan safra asidi stokları ile iç standart (IS) olarak kullanılacak olan döteryumlu Litokolik asit standart maddesi uygun saklama koşullarında muhafaza edilmiştir. Daha sonra her bir standart madde tartılarak metanol ile çözündürülmüştür. Optimizasyon parametrelerinin belirlenmesi için tüm çözeltiler karıştırılarak 1000 ng/mL son konsantrasyonu olacak şekilde metanol ile seyreltme yapılmıştır. Çözeltiler -84 °C buzdolabında saklanmıştır. Safra asitlerine ait moleküler kütlesi, LogP değeri ve pKa değerinin olduğu liste **Tablo.4.1**'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Safra asitleri standartları ve özellikleri

No	Safra Asidi	Molekül Ağırlığı	Molekül Formülü	LogP	pKa (Güçlü asit)
1	Dehidrolitoklik asit	374,60	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	6,13	6,52
2	Litokolik asit	376,60	C ₂₄ H ₄₀ O ₃	6,70	4,79
3	d4-Litokolik asit (İç Standart)	380,60	C ₂₄ H ₃₆ D ₄ O ₃	-	-
4	7-Ketolitokolik asit	390,60	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	3,52	5,82
5	Apokolik asit	390,60	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	3,93	5,70
6	Chenodeoksikolik asit	392,60	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	4,15	4,6
7	Deoksikolik asit	392,60	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	3,30	4,65
8	Hiyodeoksikolik asit	392,60	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	3,71	4,79
9	Ursodeoksikolik asit	392,60	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	3,71	4,6
10	Dehidrokolik asit	402,50	C ₂₄ H ₃₅ O ₅	3,37	4,35
11	7-Ketodeoksikolik asit	406,60	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	2,61	4,44
12	Kolik asit	408,60	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	2,02	4,48
13	Hipokolik asit	408,60	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	2,72	4,6
14	Glikokenodeoksikolik asit	449,60	C ₂₆ H ₄₃ O ₅	2,12	3,77
15	Glikodeoksikolik asit	449,60	C ₂₆ H ₄₃ O ₅	2,25	3,77
16	Glikohiyodeoksikolik asit	449,60	C ₂₆ H ₄₃ O ₅	2,36	3,77
17	Glikoursodeoksikolik asit	449,60	C ₂₆ H ₄₃ O ₅	2,02	3,77
18	Glikohiyokolik asit	465,60	C ₂₆ H ₄₃ O ₆	1,90	3,77
19	Taurolitokolik asit	483,70	C ₂₆ H ₄₅ NO ₅ S	2,48	-0,63

Tablo 4.1 (Devam). Safra asitleri standartları ve özellikleri

No	Safra Asidi	Molekül Ağırlığı	Molekül Formülü	LogP	pK _a (Güçlü asit)
20	Taurochenodeoksikolik asit	499,70	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	1,38	-0,98
21	Taurodeoksikolik asit	499,70	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	1,19	-0,75
22	Tauroursodeoksikolik asit	499,70	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	1,38	-0,98
23	Taurokolik asit	515,70	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	-0,24	-0,88
24	Taurohiyokolik asit	515,70	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	-0,10	-0,98

4.2. Kütle Spektrometresi ve Kromatografik Parametrelerin Optimizasyonu

4.2.1. Kütle spektrometresinin optimizasyonu

MS/MS sistemindeki kütle spektrometresi, negatif modunda (ESI-) elektrosprey iyon kaynağı kullanılmıştır. Kütle analizörüne öncelikle her bir safra asidinin molekül kütlesi dikkate alınarak ‘MS2 Scan’ olarak bilinen tarama yöntemi ile 100 ila 1000 m/z kütleleri aralığında tarama yapılmıştır.

Bir sonraki aşamada m/z kütleleri parçalar üzerinden MRM yöntemi ile çalışılacağı için parçalama voltajı taraması yapılması gerekmektedir. Parçalama voltajı, iyonlaşma odası ve kütle analizörünün ilk dörtlüsü arasında yer alan kapilerin son çıkışına uygulanan ve ana kütle seçilip parçalama hücresine ulaştırılmasını sağlayan voltajdır. Cihaz uygulanabilirlik açısından 0-380 V arasında tarama yapabilmekte ve fabrika çıkışı olarak cihazın varsayılan değeri 135 V olarak belirlenmiştir. Her bir m/z değeri-için parçalama voltajı taraması SIM yöntemi incelenmiş ve optimum voltaj seçilmiştir.

Elde edilen parçalama voltajı ile birlikte MRM yönteminde kullanabilmek için her bir safra asidinin ‘Product iyon’ olarak bilinen parçalanma iyonları için uygun voltajın belirlenmesi gerekmektedir. Her bir standart safra asidi için 50 ila 800 m/z aralığında kütle taraması yapılmıştır. Parçalama hücresinde iyonları parçalara ayırabilmek adına belli bir enerji gereklidir. Terminolojik olarak çarpışma enerjisi (collision energy) adı verilen bu enerji cihazda 0-250 eV arasında bir enerji uygulamaya izin vermektedir. Bazı maddeler bu enerji sonucunda yeni bir kütle oluştururken bazı maddeler yeni bir kütle oluşturamamakta ancak uygulanan voltaj sebebiyle hassasiyet artmaktadır.

4.2.2. Hareketli faz optimizasyonu

Benzer şekilde optimizasyon çalışmasında çeşitli hareketli fazlar ve hareketli fazların oranları kullanılmıştır. Bunun için amonyum format, asetik asit, formik asit gibi iyonlaştırıcı ajanlar ve asetonitril, metanol gibi organik çözücüler kullanılmıştır.

4.2.3. Sabit faz teknolojisi

Optimizasyon çalışmalarında üç farklı sabit faz kullanılarak analizler yapılmıştır. Bunun için sırasıyla Phenomenex (Ca, USA), SiliCycle (Quebec, CA) ve Agilent (Ca, USA) sabit fazları kullanılmıştır. Sabit fazlar ile analizler yapılarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde ayırım gücü, sinyal/gürültü oranı, pik alanları gibi parametreler göz önüne alınmıştır. Sabit fazlar ile yapılan analizler sonucunda Agilent sabit fazı kullanılmaya karar verilmiştir. Kullanılan sabit fazlar **Tablo 4.2’de** listelenmiştir.

Tablo 4.2. *Kullanılan sabit fazlar*

Etiket	Uzunluğu (mm)	İç Çapı (mm)	Tanecik Boyutu (µ)	Partikül Çapı (Å)	Fonksiyonel Grup	Firma
Gemini	150	3	5	110	C6-Fenil	Phenomenex
SiliaChrom Plus	100	3	3	100	C8	SiliaCycle
Zorbax Eclipse Plus	100	2,1	1,8	95	C18	Agilent

4.2.4. Sabit faz fırının optimizasyonu

Sabit faz fırının 40-50-60 °C sıcaklıklara ayarlanarak analiz yapılmış ve sıcaklığa bağlı sinyal/gürültü oranı, pik ayırımı ve pik alanı dikkate alınarak analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

4.3. Biyolojik Örneklerin Hazırlaması

Optimum koşullara göre Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı’na bağlı Çocuk Gastroenteroloji Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zeren BARIŞ gözetiminde, etik kurul izniyle bilimsel çalışmalarda

kullanılmak üzere serum, idrar ve gaita biyolojik örnekleri protein çöktürme yöntemiyle analize hazırlanmış ve optimum koşullarda MRM analizi yapılmıştır. Plazma ve idrar örnekleri, toplam hacmin %80'i asetonitril, son konsantrasyonu 1000 ng/mL ve 10 ng/mL safra asidi standart karışım çözeltisi ve son konsantrasyonu 100 ng/mL olacak şekilde IS çözelti içeren örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler ayrıca içerisine standart çözelti karışımı içermeyecek şekilde örnekler de hazırlanmış ve analiz değerlendirmeleri bu çözeltilerin karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. Diğer biyolojik örnek olan gaita -84 °C'de bekletilmiş ve donduktan sonra tartım alınarak dondurarak kurutma işlemi uygulanmıştır. Kurutma sonrasında tekrar tartım alınarak buharlaşan kısım not edilmiştir. Analiz için hazırlık aşamasında tekrar tartım alınarak plazma ve idrar için kullanılan oranlarda çözücü ve standart çözeltiler eklenmiştir. Bütün biyolojik örnek çözeltileri bir dakika vorteks ile karıştırılmış ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Yirmi dakika sonrasında +4 °C sıcaklıkta ve 4000 x g dönüş hızında 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant ile çökelek ayrılarak 0,22 µm filtreden geçirilerek analiz edilmiştir.

4.4. Yöntem Validasyonu

ICH kılavuzunun M10 Biyoanalitik yöntem validasyonunda tavsiye ettiği şekilde validasyon işlemleri optimizasyonu yapılan yöntem uygulanmış ve yöntemin analitik açıdan kabul edilebilir veriler sağladığı gösterilmiştir (ICH, 2022). Yöntemin validasyonu için ICH kılavuzunda da belirtildiği şekilde matris etkisi, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, taşınma (carry-over) ve sağlamlık analizleri yapılmıştır.

4.4.1. Matris etkisi

Matris etkisi terimi, numune matrisi içinde genellikle girişim yapan bileşenlerin varlığının bir sonucu olarak analitin yanıtının değiştirildiği bir durumu ifade eder. Metot validasyonu sürecinde, birkaç bağımsız kaynak kullanıldığında ortaya çıkabilecek matris etkisini değerlendirmek gerekir (ICH, 2022).

Her bir biyolojik örnek hazırlandıktan sonra matris içerisine 1000 ng/mL konsantrasyon içeren standart safra asidi ve 100 ng/mL konsantrasyonunda IS ile 100 ng/mL konsantrasyon içeren safra asidi ve 100 ng/mL konsantrasyonunda IS eklenerek standart safra asidi eklenmemiş ancak 100 ng/mL IS içeren örnek hazırlanmış ve farklı

kaynaklardan alınan üç biyolojik örnek altı tekrarlı şekilde analiz edilmiş ve elde edilen verilerin nominal konsantrasyonun %15'i aralığında olup olmadığı değerlendirilmiştir. Kan ve idrar dört farklı kaynaktan, gaitalar bunlardan farklı olarak üç farklı kaynaktan olmak üzere yedi farklı kaynaktan alınmıştır.

4.4.2. Doğrusallık (Kalibrasyon eğrisi)

Doğrusallık, nominal analit konsantrasyonu ile analitik platformun analite verdiği yanıt arasındaki bağlantıyı gösterir. Kalibrasyon standartları, matrise önceden belirlenmiş miktarda analit eklenerek oluşturulur. Alt nicelik sınırı (LLOQ) ve üst nicelik sınırı (ULOQ), kalibrasyon aralığını belirlemek için kullanılan iki standarttır. LLOQ kabul edilebilir hassasiyet ve doğrulukla niceliksel olarak belirlenebilen en düşük analit miktarıdır., ULOQ bir numunedeki analitin kantitatif olarak kesinlik ve doğrulukla belirlenebilen en yüksek miktarıdır.

Doğrusallık analizi için 1-5-10-50-100-250-500-1000 ng/mL konsantrasyonunda standart safra asitleri karışımı ve her bir konsantrasyon 100 ng/mL IS içeren çözeltiler üç ayrı günde her noktada üç tekrarlı olacak şekilde MRM modunda analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda pik normalizasyonu için her bir safra asidinin pik alanlarının alıkonma zamanına oranının, IS pik alanının alıkonma zamanına oranına bölünmesiyle konsantrasyona bağlı bir oran elde edilmiştir. Bu oran ile konsantrasyon arasında doğrusallık eğrisi kütle spektrometresine ait yazılım ile oluşturulmuştur. Ve her bir doğrusallık eğrisine ait doğrusallık denklemi ile regresyon katsayısı yine yazılım ile hesaplanmıştır.

4.4.3. Doğruluk

ICH M10 biyoanalitik validasyon yönergesine göre yöntemin validasyonu sürecinde doğruluk çalışmaları için kalibrasyon eğrisi aralığında en az dört konsantrasyon düzeyinde hazırlanmalıdır. 10-50-250-500-1000 ng/mL standart safra asidi karışım çözeltisi ve her bir konsantrasyonda 100 ng/mL IS ile hazırlanan çözeltiler altı tekrarlı olarak analiz edilmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Bunun için aşağıdaki formüle göre geri kazanım hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \left(\frac{\text{Gözlenen değer}}{\text{Teorik değer}} \right) \times 100 \quad (1)$$

4.4.4. Kesinlik

ICH M10 biyoanalitik validasyon yönergesine göre yöntemin validasyonu sürecinde doğruluk çalışmaları için kalibrasyon eğrisi aralığında en az dört konsantrasyon düzeyinde hazırlanmalıdır. 10-50-250-500 ng/mL standart safra asidi karışım çözeltisi ve her bir konsantrasyonda 100 ng/mL IS ile hazırlanan çözeltiler beş tekrarlı olarak üç farklı günde analiz edilmiş ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

4.4.5. Taşınma (Carry-over)

Taşınma, analiz yapılırken önceki numuneden kalan analit nedeniyle ölçülen konsantrasyonun değişmesidir. Yöntem geliştirme sırasında taşınma değerlendirilmeli ve en aza indirilmelidir. ULOQ kalibrasyon standardından sonra boş numuneler analiz edilerek değerlendirilmeli ve en yüksek kalibrasyon standardını takip eden boş numunelerdeki taşınma, LLOQ analit yanıtının %20'sinden ve IS yanıtının %5'inden fazla olmamalıdır.

Taşınma analizi için 1000 ng/mL konsantrasyon olan standart safra asidi karışımı ve 100 ng/mL IS içeren çözelti analiz edilmiş daha sonra sadece 100 ng/mL konsantrasyon IS içeren boş numune analiz edilerek ICH M10 kılavuzunda belirtilen değerler için analiz sonucu değerlendirilmiştir.

4.4.6. Sağlamlık

Bir analitik yöntemin sağlamlığı yöntem parametrelerindeki gözlenen küçük değişmelerin analitik yanıtta etkisinin kabul edilebilir düzeylerde olduğunun gösterilmesidir. Bu amaçla sıvı kromatografisi açısından akış hızı 0,33 ve 0,37 mL/dk, kolon sıcaklığı 59 °C ve 61 °C, hareketli faz FA oranı % 0,45 ve % 0,55 olacak şekilde parametreler değiştirilmiş, kütle spektroskopisi açısından gaz sıcaklığı 295 °C ve 305 °C gaz akışı 4,9 L/dk ve 5,1 L/dk olacak şekilde analiz edilmiştir.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Kütle Spektrometresi ve Kromatografik Parametrelerin optimizasyonu

5.1.1. Kütle spektrometresinin optimizasyonu

MS/MS sistemindeki kütle spektrometresi, negatif modda (ESI-) elektrosprey iyonizasyonu kullanarak, m/z 100 ila m/z 1000 arasında başlayan kütle aralığında çalıştırıldı. MS koşulları aşağıdaki gibi optimize edilmiştir. Kurutma gazı (azot) akış hızı: 15 L/dk; nebülize edici gaz (azot) akış hızı: 3,0 L/dk; çarpışma gazı: Argon; CDL sıcaklığı: 250 °C ve ısı bloğu sıcaklığı: 450 °C. Tüm analizlerde Çoklu Reaksiyon İzleme (MRM) modu kullanılmıştır. Herbir safra asidi için fragmentör voltajı (FV), collision cell voltajı (CV) ve parçalanma iyonları (Quantifier ve Qualifier) tespit edilerek MRM modu bu parametrelere göre kullanılmıştır. Safra asitleri kütle spektrometresi için optimizasyon koşulları **Tablo 5.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 5.1. Safra asitleri kütle spektrometresi için optimizasyon koşulları

No	Safra Asidi	Öncü İyon	FV	CV	Qnt	Qlf
1	Dehidrolitik asit	373,60	225	2	373,6	373,60
2	Litokolik asit	375,60	224	4	375,6	375,60
3	d4-Litokolik asit (İç Standart)	379,60	180	7	379,0	379,60
4	7-Ketolitokolik asit	389,60	175	15	389,6	389,60
5	Apokolik asit	389,60	160	4	389,6	389,60
6	Chenodeoksikolik asit	391,60	236	7	391,6	391,60
7	Deoksikolik asit	391,60	168	0	391,6	391,60
8	Hiyodeoksikolik asit	391,60	179	0	391,6	391,60
9	Ursodeoksikolik asit	391,60	182	15	391,6	391,60
10	Dehidrokolik asit	401,50	173	7	401,5	401,50
11	7-Ketodeoksikolik asit	405,60	168	13	405,6	405,60
12	Kolik asit	407,60	210	13	407,6	407,60
13	Hipokolik asit	407,60	207	13	407,6	407,60
14	Glikokenodeoksikolik asit	448,60	166	38	74,0	448,60
15	Glikodeoksikolik asit	448,60	132	38	74,0	448,60
16	Glikohiyodeoksikolik asit	448,60	156	41	74,0	448,60
17	Glikoursodeoksikolik asit	448,60	143	39	74	448,60

Tablo 5.1(Devamı). Safra asitleri kütle spektrometresi için optimizasyon koşulları

No	Safra Asidi	Öncü İyon	FV	CV	Qnt	Qlf
18	Glikohiyokolik asit	464,60	119	37	74	464,60
19	Taurolitokolik asit	482,70	306	73	80	106,7
20	Taurochenodeoksikolik asit	498,70	330	70	80	106,7
21	Taurodeoksikolik asit	498,70	330	70	80	106,7
22	Tauroursodeoksikolik asit	498,70	330	70	80	106,7
23	Taurokolik asit	514,70	330	81	80	106,7
24	Taurohiyokolik asit	514,70	330	81	81	106,7

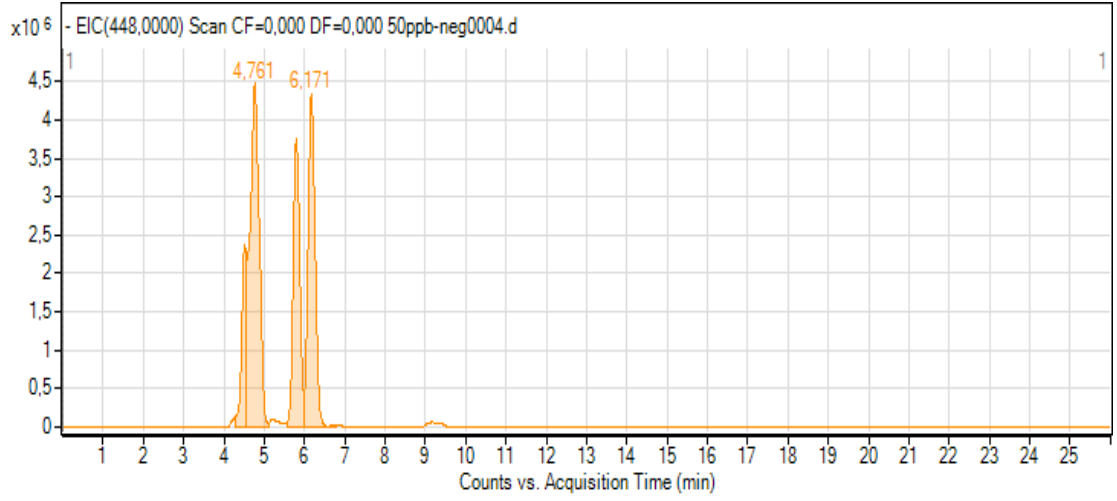
5.1.2. Hareketli faz optimizasyonu

Hareketli faz için tablo 5.1’de gösterilen safra asitlerinin her birinin son konsantrasyonu 500 ng/mL olarak hazırlanan karışım çözelti farklı mobil faz koşullarında analizleri yapılmıştır. Sonuçlar kromatografik olarak ayırım gücü, pik alanı ve sinyal/gürültü parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre %0,5 formik asit içeren su (A) ve %0,5 formik asit içeren metanol: asetonitril ((MeOH: ACN (%20)) karışımı (B) optimum mobil faz olarak karar verilmiştir. Hareketli faz koşulları **Tablo 5.2’**de gösterilmiştir.

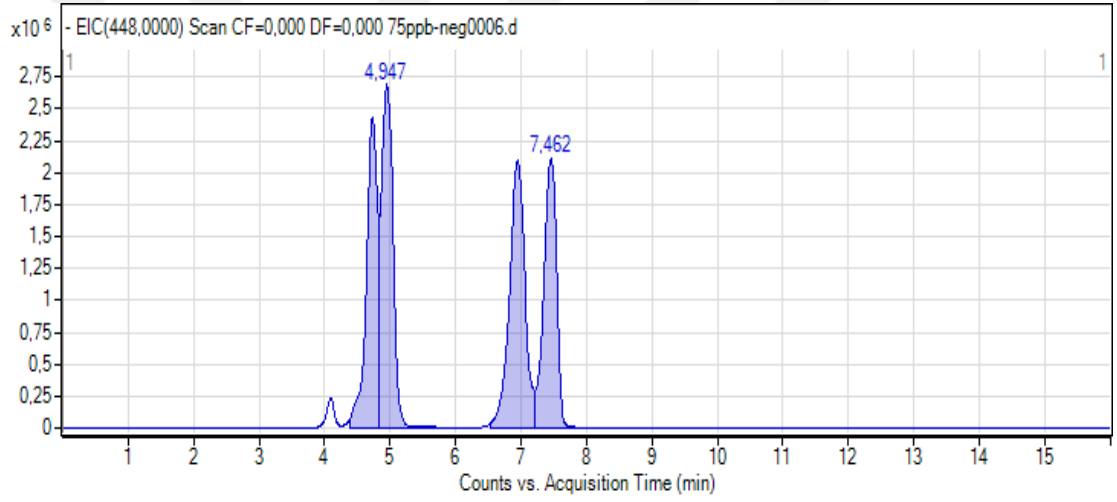
Tablo 5.2. Hareketli faz koşulları

Koşul	A Hattı	B Hattı	Karışım Oranları	pH Değeri
1	Su (10 mM AF)	ACN	60:40 – 10:90	4,63
2	Su (10 mM AF)	MeOH	30:70 – 10:90	4,63
3	Su (10 mM AF)	MeOH	40:60 – 10:90	4,63
4	Su (10 mM AF)	MeOH (%10 ACN)	40:60 – 10:90	4,63
5	Su (20 mM AF)	MeOH (%10 ACN)	40:60 – 10:90	3,2
6	Su (%0,5 AA)	MeOH (%20 ACN) (%0,5 AA)	50:50 – 0:100	-
7	Su (%0,5 FA)	MeOH (%20 ACN) (%0,5 FA)	50:50 – 0:100	2,53

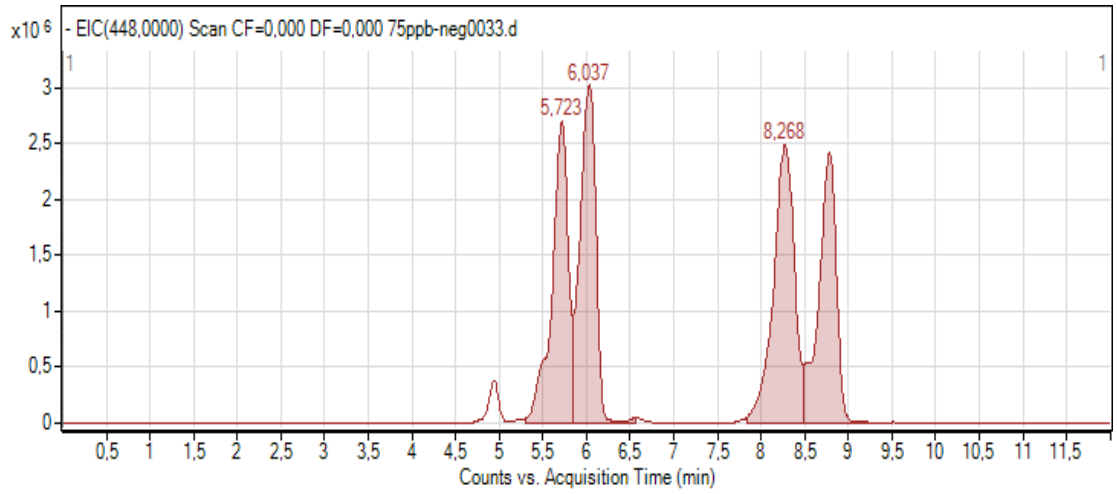
Analizi yapılan glisin konjuge safra asitlerinin kromatogramları **Şekil.5.1-Şekil.5.4**’te, optimum koşullarda glisin konjuge safra asidi kromatogramı **Şekil.5.5**’te ve 23 safra asidinin karışımına ait kromatogramı **Şekil 5.6** ve **Şekil 5.7**’de gösterilmiştir.



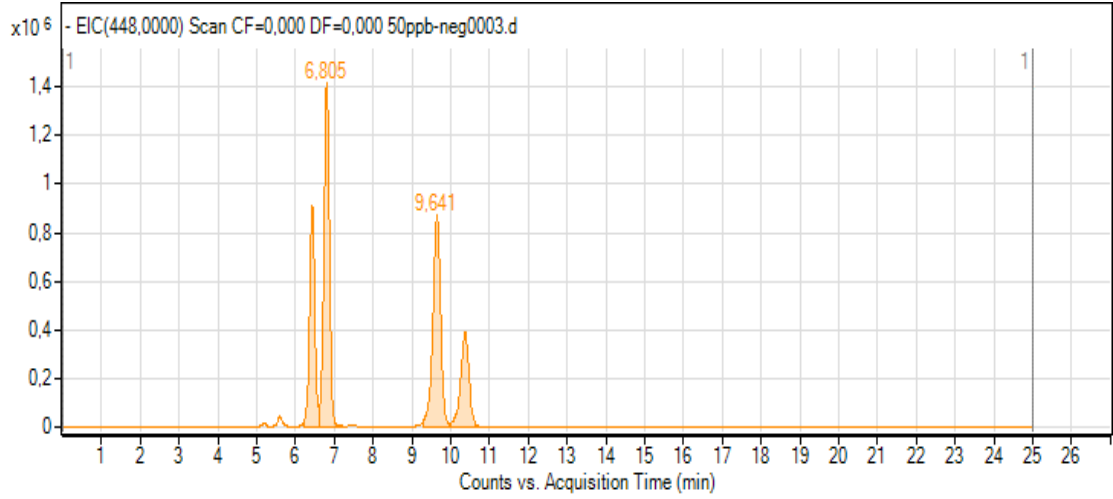
Şekil 5.1. Koşul-1 şartlarında glisin konjuge safra asitlerinin kromatografik ayrımı



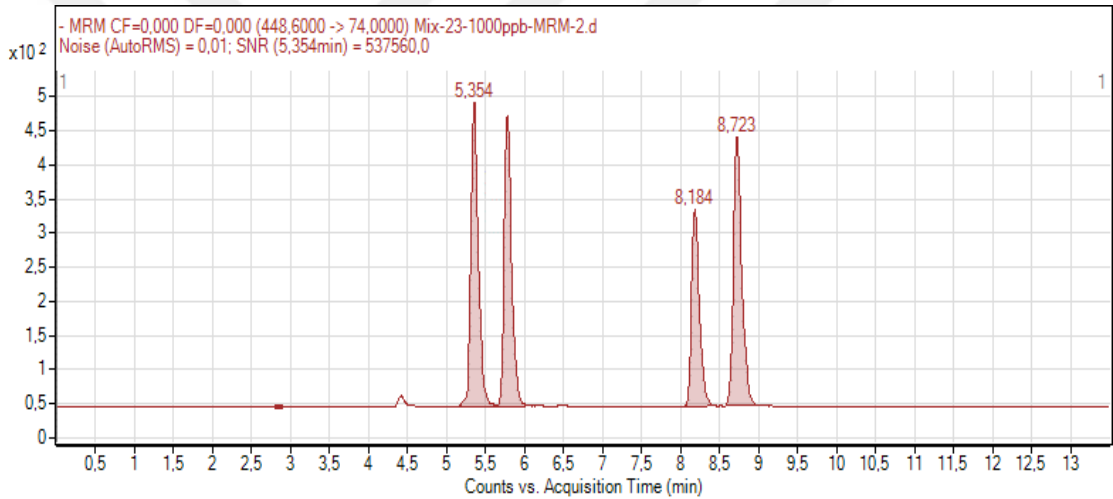
Şekil 5.2. Koşul-2 şartlarında glisin konjuge safra asitlerinin kromatografik ayrımı



Şekil 5.3. Koşul-3 şartlarında glisin konjuge safra asitlerinin kromatografik ayrımı



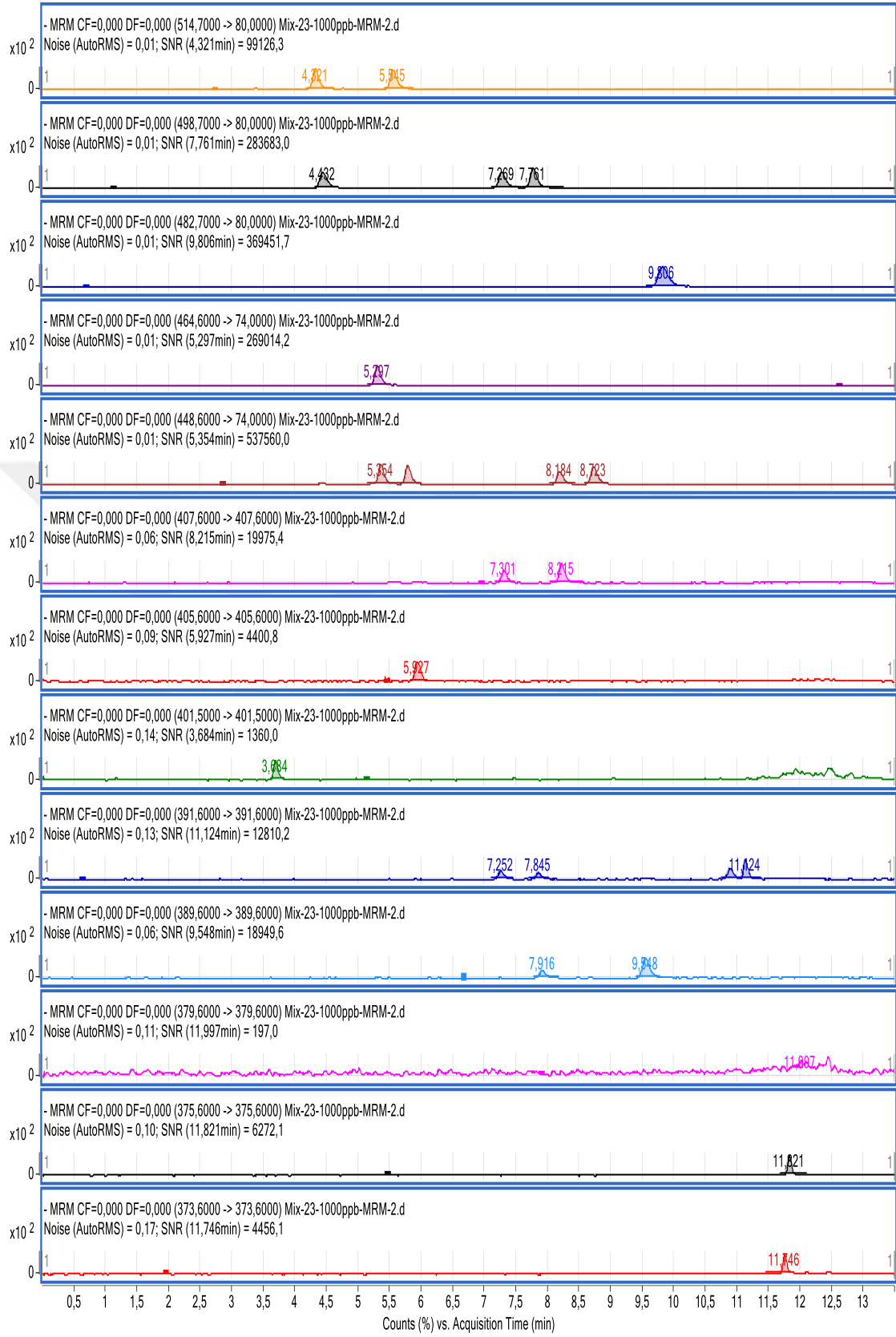
Şekil 5.4. Koşul-4 şartlarında glisin konjuge safra asitlerinin kromatografik ayrımı



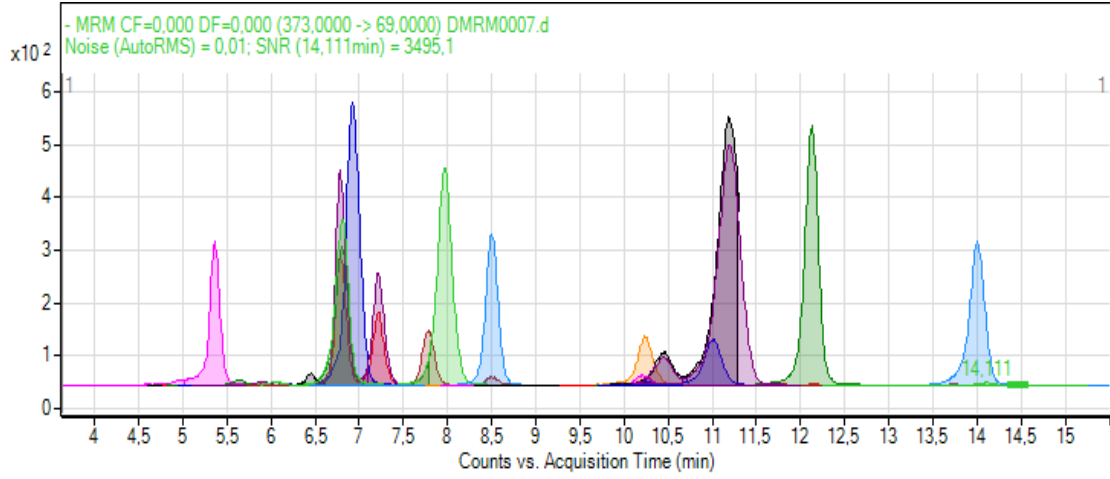
Şekil 5.5. Optimum koşullarda glisin konjuge safra asitlerinin kromatografik ayrımı

5.1.3. Sabit faz teknolojisi

Optimizasyon çalışmalarında üç farklı sabit faz kullanılarak analizler yapılmıştır. Analiz sonucunda sabit fazların ayırma gücü, sinyal/gürültü oranı ve pik morfolojisi üzerindeki etkisi konusunda C6-fenil kolon analitik parametrelere göre en az etkili sonuç vermiştir. Piklerin ayırmasının, alanlarının ve morfolojileri kabul edilebilir değerlerin altında kalmıştır. Bu sabit faz ile yapılan kromatogram görüntüsü Şekil 5.7’de gösterilmiştir.

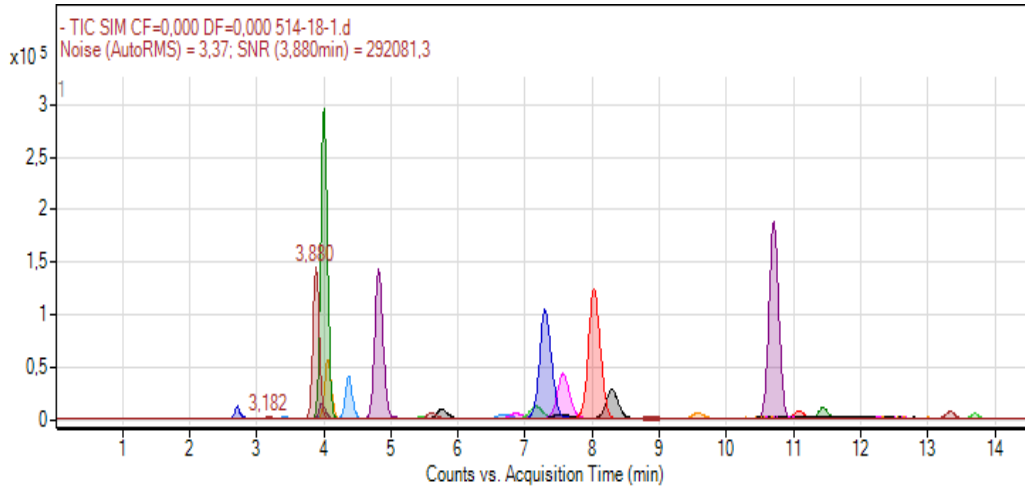


Şekil 5.6. Optimum koşullarda safra asitlerinin kromatografik ayrımı



Şekil 5.7. Gemini C6-fenil sabit faz ile kromatografik ayırım

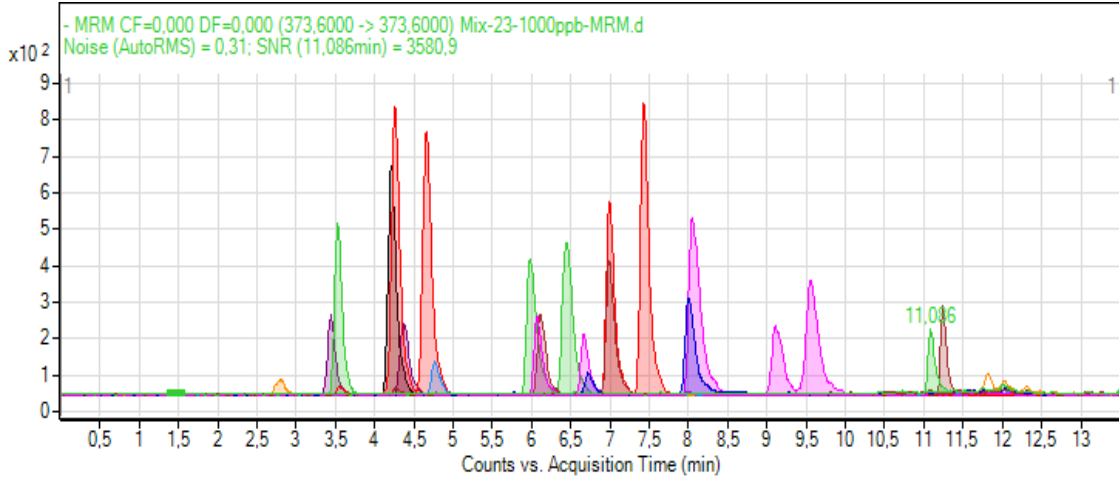
SiliaChrom C8 ile analiz sonucunda C6-fenil sabit fazına göre daha etkin bir ayırım elde edilmiştir. Pik morfolojisi ve ayırım gücü daha etkin olmasına karşın literatüre kazandırmak adına biyolojik örneklerden tespit edilebilecek en alt düzey için yeteri kadar bir pik alanı ve sinyal/gürültü oranı elde edilememiştir. Bu sabit faz ile yapılmış analizin kromatogram görüntüsü **Şekil.5.8**'de gösterilmiştir.



Şekil 5.8. SiliaChrom sabit faz ile kromatografik ayırım

Zorbax Eclipse Plus C18 ile analiz sonucunda hem C6-fenil hem de C8 sabit fazına göre daha etkin bir ayırım, morfolojik açıdan kabul edilebilir sınırlar içinde ve pik alanı ve sinyal/gürültü oranına göre alanının hesap edilebilmesi ve kromatogramının elde edilebilmesi en zor safra asidi için bile yaklaşık 36 ng/mL bir seviyeye kantitatif olarak

inilebileceğini göstermiştir. Bu sabit faz ile yapılmış analizin kromatogram görüntüsü **Şekil.5.9**'de gösterilmiştir.



Şekil 5.9. Zorbax Eclipse Plus sabit faz ile kromatografik ayırım

5.1.4. Sabit faz fırının optimizasyonu

Sabit faz fırının 40-50-60 °C sıcaklıklara ayarlanarak analiz yapılmış ve sıcaklığa bağlı sinyal/gürültü oranı, pik ayrımı ve pik alanı dikkate alınarak analiz sonuçları en yüksek değerleri 60 °C’de elde edilmiştir.

5.2. Yöntem Validasyonu

5.2.1. Matris etkisi

Her bir biyolojik örneğe protein çöktürme prosedürü uygulandıktan sonra matris içerisine 1000 ng/mL konsantrasyonunda standart safra asidi karışım çözeltisi ve 100 ng/mL konsantrasyonunda IS eklenmiş çözelti, 100 ng/mL konsantrasyonunda safra asidi karışım çözeltisi ve 100 ng/mL konsantrasyonunda IS eklenmiş çözeltiler ile standart safra asidi karışım çözeltisi eklenmemiş ancak 100 ng/mL IS içeren biyolojik örnek analiz çözeltileri hazırlanmış ve edilmiştir. Farklı dört örnekten altı tekrarlı yapılan analiz sonucunda verilerin nominal konsantrasyonun %15 aralığında olup olmadığı değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin ortalama değerleri **Tablo 5.3**'te gösterilmiştir.

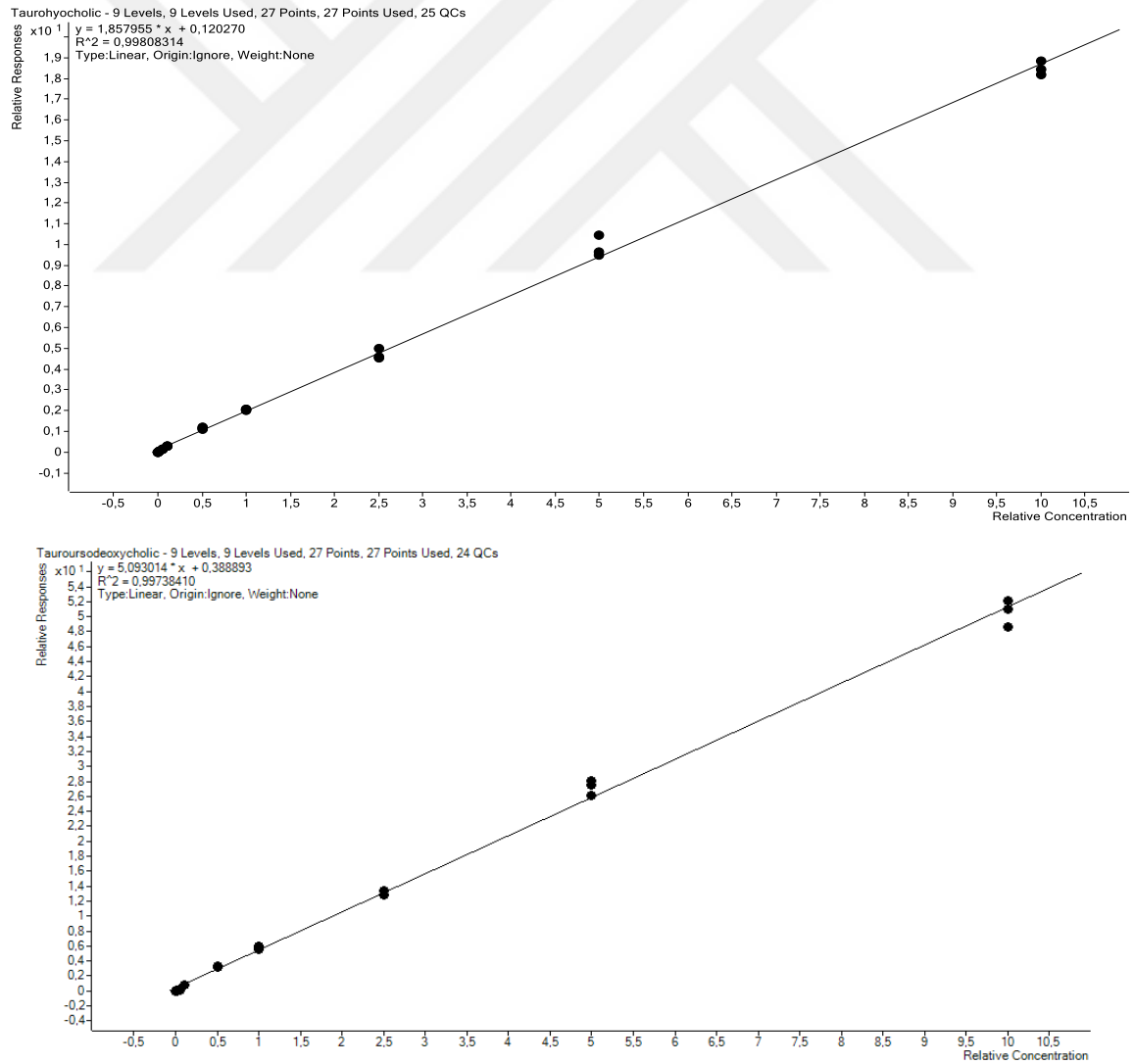
Tablo 5.3. Kan ve idrar biyolojik örneklerinin matris etkisi için nominal pik alanının yüzde değerleri

No	Safra Asidi	Kan	İdrar
1	Dehidrolitokolik asit	87,813 ± 5,573	103,497 ± 4,194
2	Litokolik asit	91,073 ± 3,361	106,608 ± 4,785
3	7-Ketolitokolik asit	90,174 ± 1,460	94,399 ± 3,515
4	Apokolik asit	95,990 ± 9,952	93,357 ± 15,210
5	Kenodeoksikolik asit	113,187 ± 7,329	104,038 ± 4,726
6	Deoksikolik asit	102,959 ± 6,208	105,242 ± 3,545
7	Hiyodeoksikolik asit	99,977 ± 11,446	93,941 ± 5,317
8	Ursodeoksikolik asit	88,216 ± 2,464	96,234 ± 4,322
9	Dehidrokolik asit	102,534 ± 2,774	95,156 ± 3,006
10	7-Ketodeoksikolik asit	96,975 ± 5,346	108,427 ± 2,245
11	Kolik asit	93,307 ± 3,818	107,772 ± 3,976
12	Hiyokolik asit	104,413 ± 7,587	103,566 ± 8,476
13	Glikokenodeoksikolik asit	102,162 ± 12,217	103,018 ± 7,819
14	Glikodeoksikolik asit	93,007 ± 23,311	102,688 ± 6,614
15	Glikohiyodeoksikolik asit *	116,134 ± 5,623 *	105,961 ± 5,013
16	Glikoursodeoksikolik asit	103,739 ± 5,644	98,827 ± 4,192
17	Glikohiyokolik asit	114,542 ± 1,898	112,943 ± 1,861
18	Taurolitokolik asit	97,328 ± 6,350	101,626 ± 7,257
19	Taurokenodeoksikolik asit	89,205 ± 17,850	113,966 ± 12,643
20	Taurodeoksikolik asit	88,135 ± 19,243	97,948 ± 7,837
21	Tauroursodeoksikolik asit	88,277 ± 3,444	109,410 ± 7,790
22	Taurokolik asit *	115,427 ± 3,891 *	99,708 ± 8,809
23	Taurohiyokolik asit *	15,953 ± 8,456 *	102,218 ± 2,350

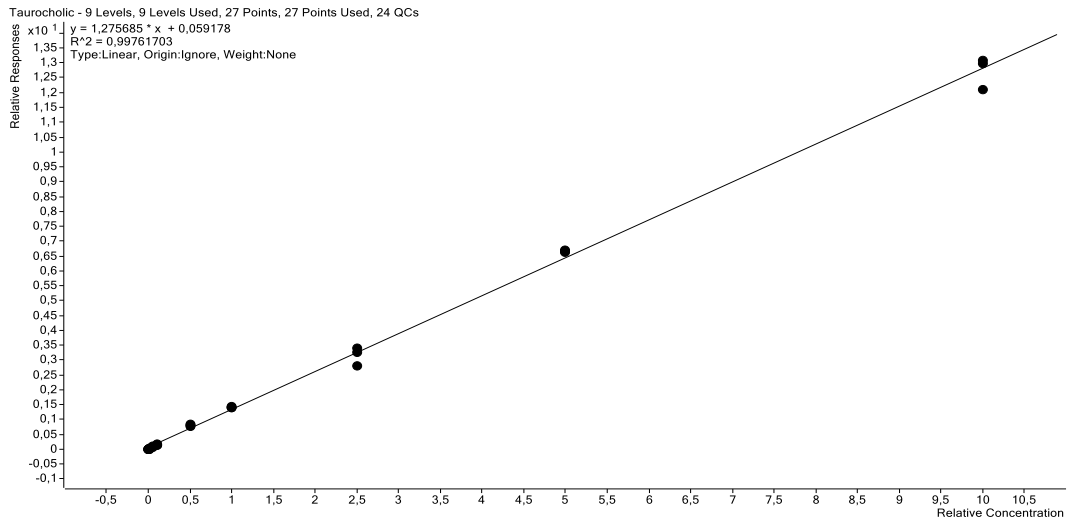
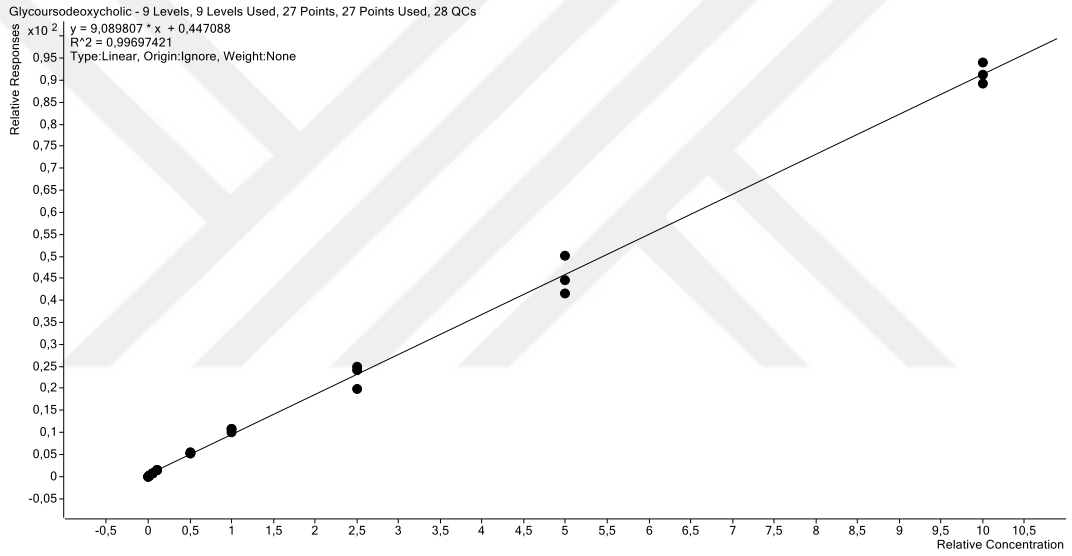
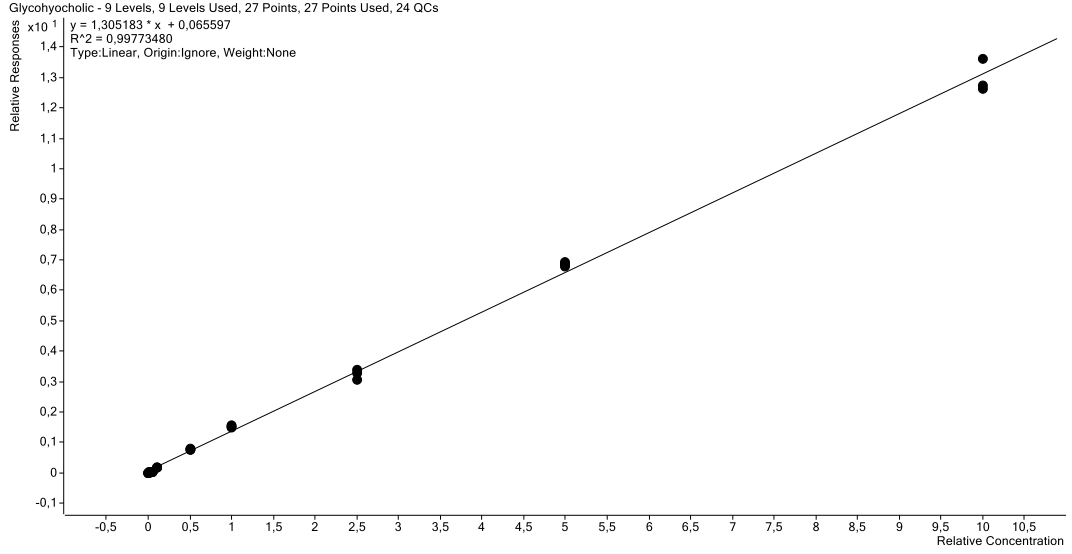
Tablodaki değerlere göre kan ve idrar örneklerinin matris etkisinin ICH M10 biyoanalitik validasyon kılavuzuna göre kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu görülmektedir. Buna karşın Glikohiyodeoksikolik asit, Taurokolik asit ve Taurohiyokolik asit kan örneklerinde belirtilen limitin dışında bir değer elde edilmiştir. Gaita ile yapılan analiz sonuçları ICH kılavuzundaki limitlerin dışında olup sağlıklı değerler elde edilememiştir.

5.2.2. Doğrusallık (Kalibrasyon eğrisi)

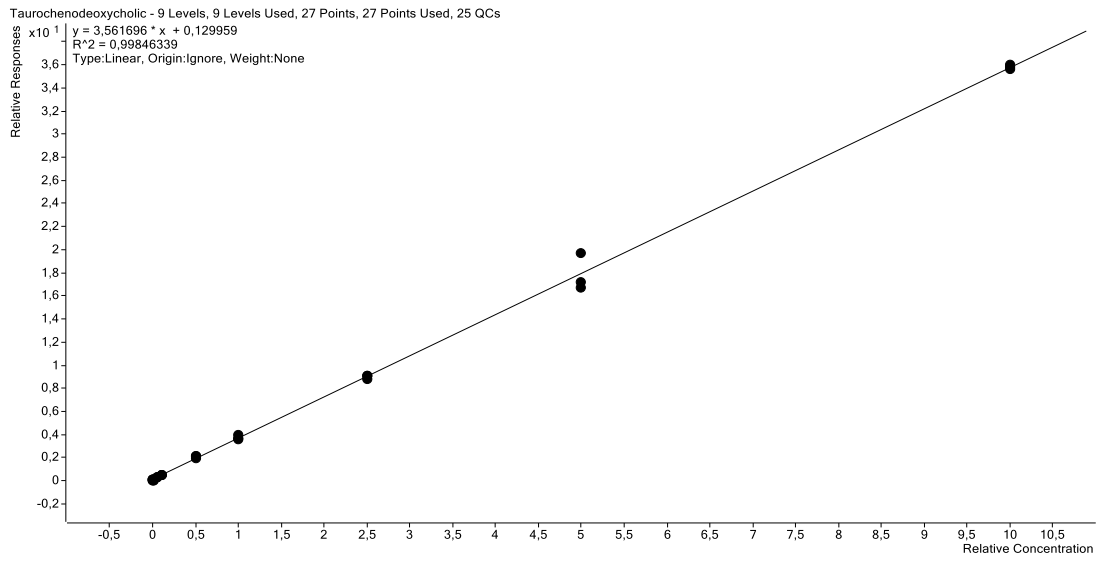
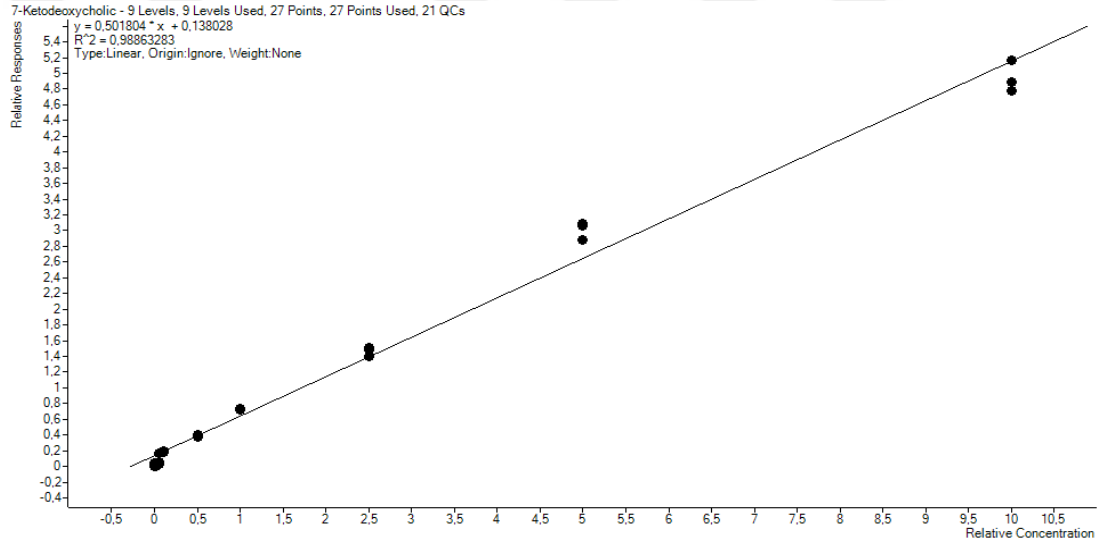
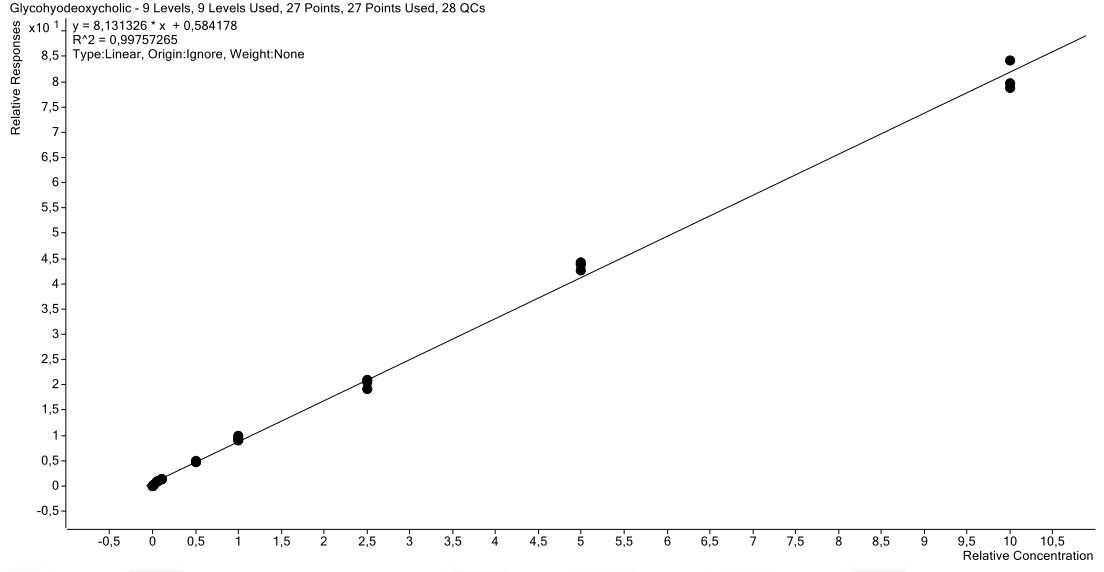
Doğrusallık analizi için 1-5-10-50-100-250-500-1000 ng/mL konsantrasyonunda standart safra asitleri karışımı ve her bir konsantrasyon 100 ng/mL IS içeren çözeltiler üç ayrı günde her noktada üç tekrarlı olacak şekilde MRM modunda analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda pik normalizasyonu için her bir safra asidinin pik alanlarının alıkonma zamanına oranının, IS pik alanının alıkonma zamanına oranına bölünmesiyle konsantrasyona bağlı bir oran elde edilmiştir. Bu oran ile konsantrasyon arasında doğrusallık eğrisi ve her bir doğrusallık eğrisine ait doğrusallık denklemi ile regresyon katsayısı kütle spektrometresine ait yazılım ile oluşturulmuştur. Standart safra asitlerine ait saptama alt sınırı 1,71-25,92 ng/mL ve tayin alt sınırı 5,7-86,4 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Safra asitlerine ait doğrusallık eğrileri Şekil 5.10'da gösterilmiştir.



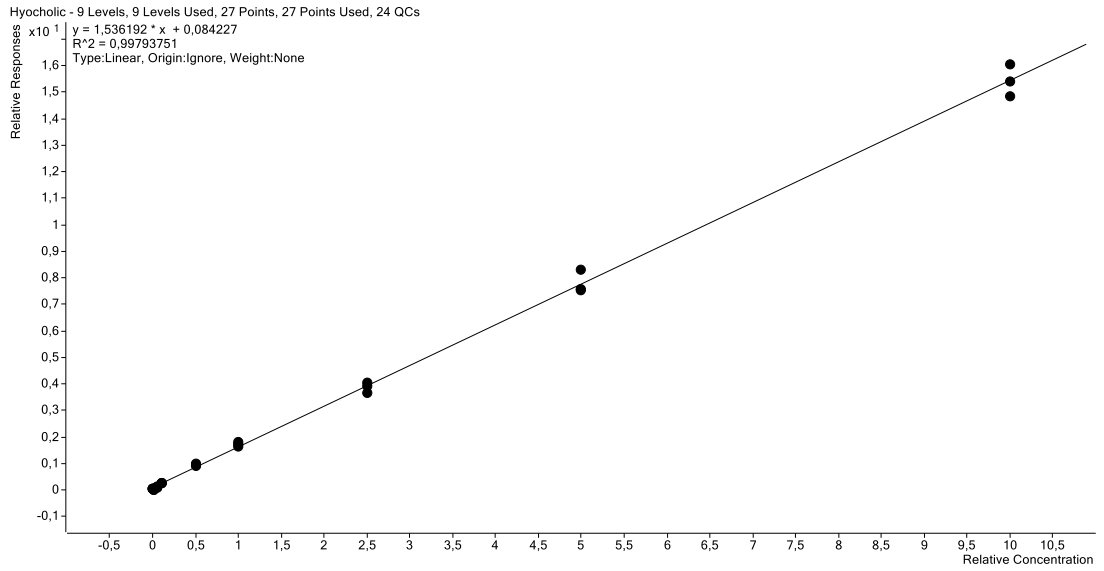
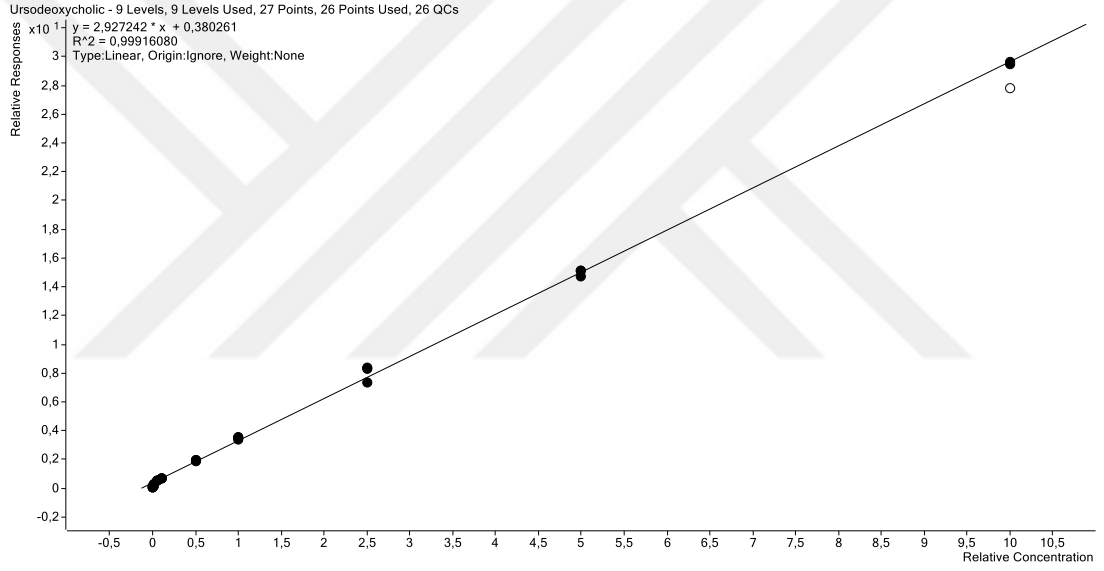
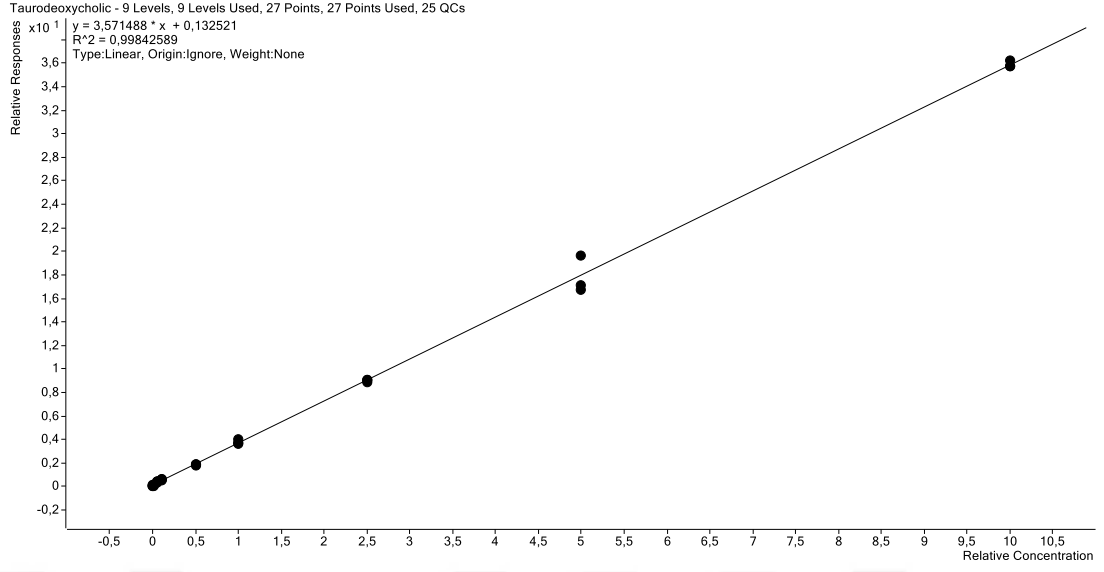
Şekil 5.10. Safra asitlerine ait doğrusallık eğrileri, doğru denklemi ve regresyon katsayısı.



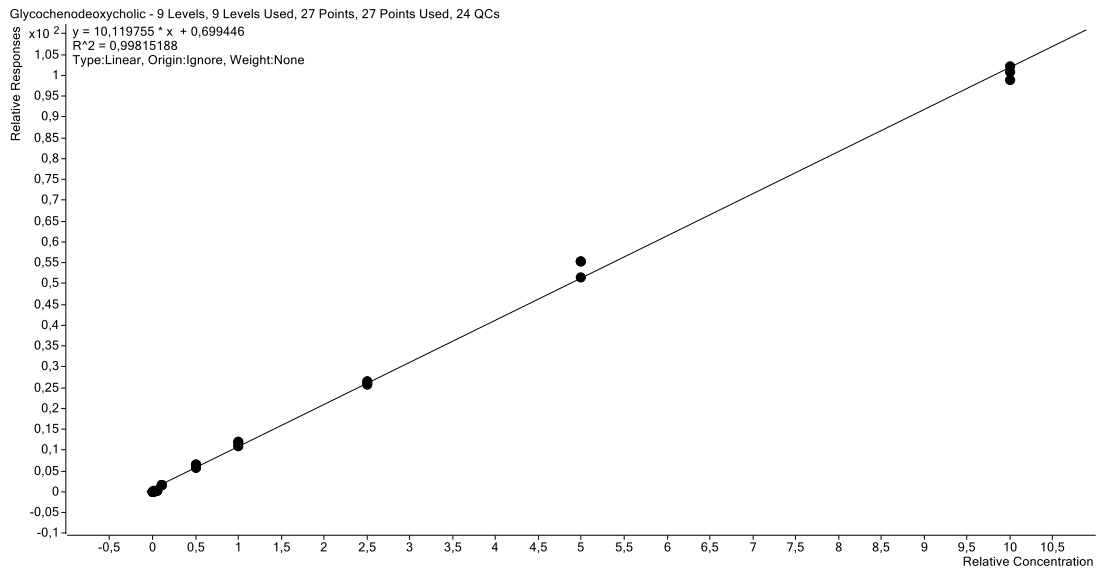
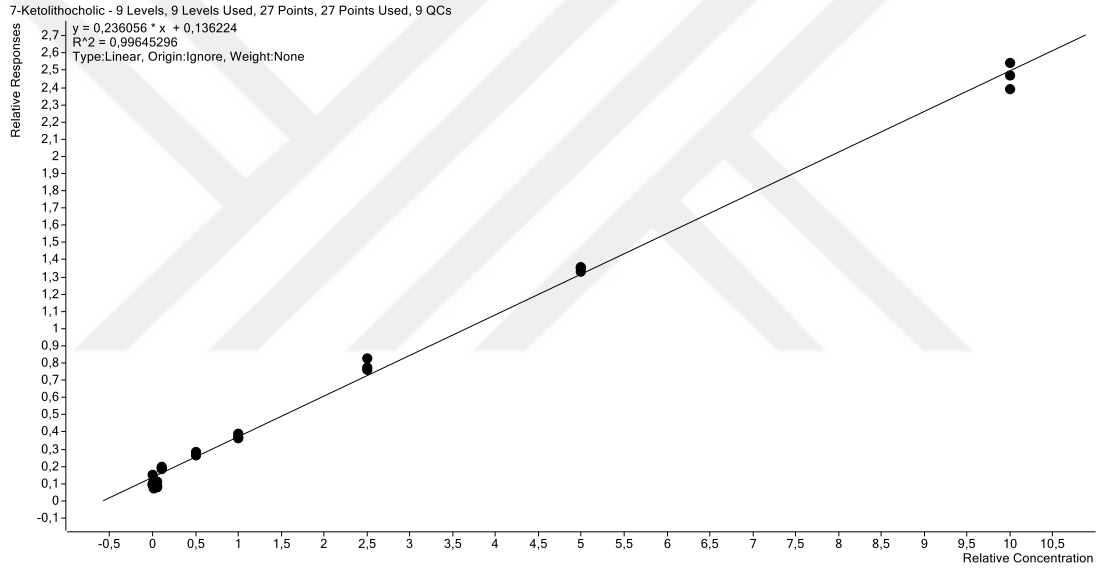
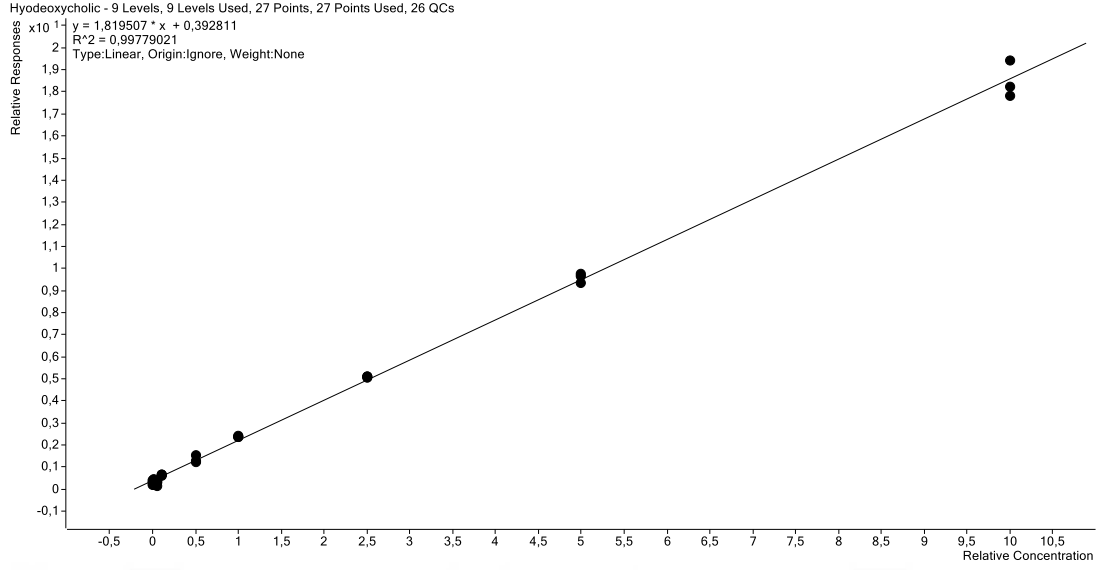
Şekil 5.10 (Devam). Safra asitlerine ait doğrusallık eğrileri, doğru denklemi ve regresyon katsayısı.



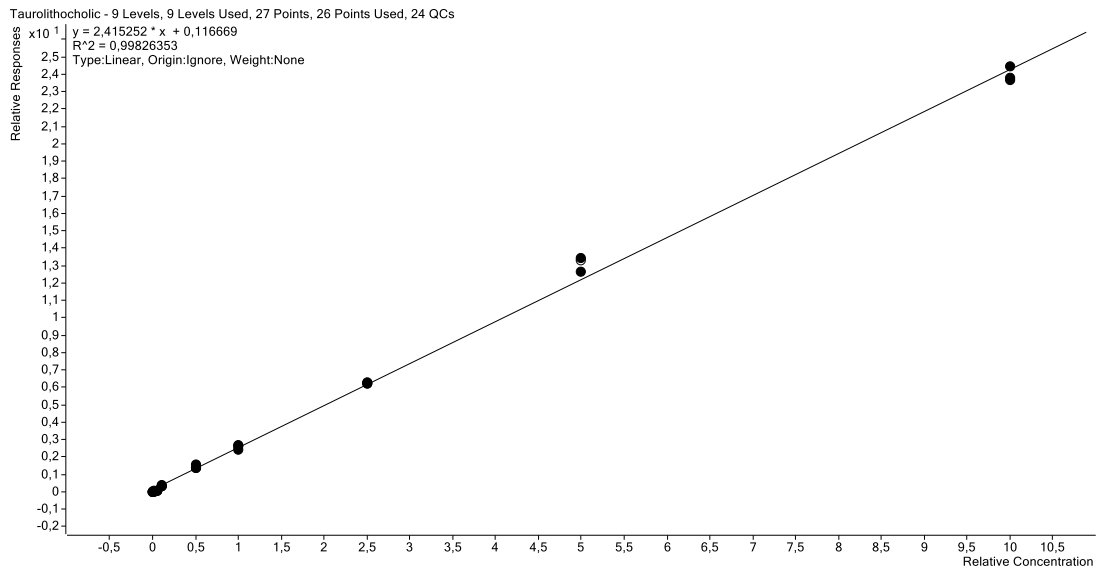
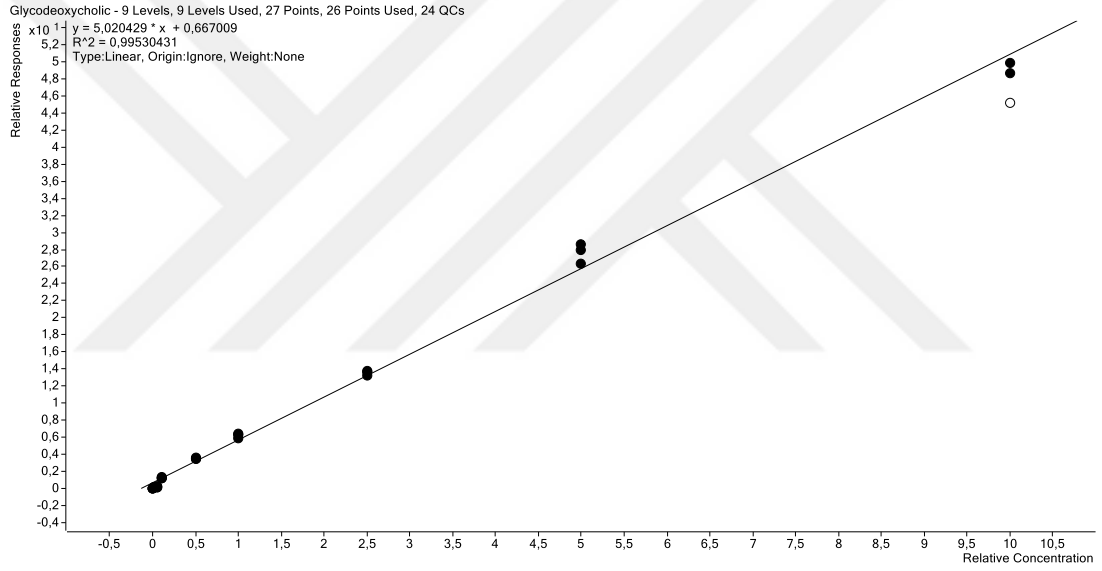
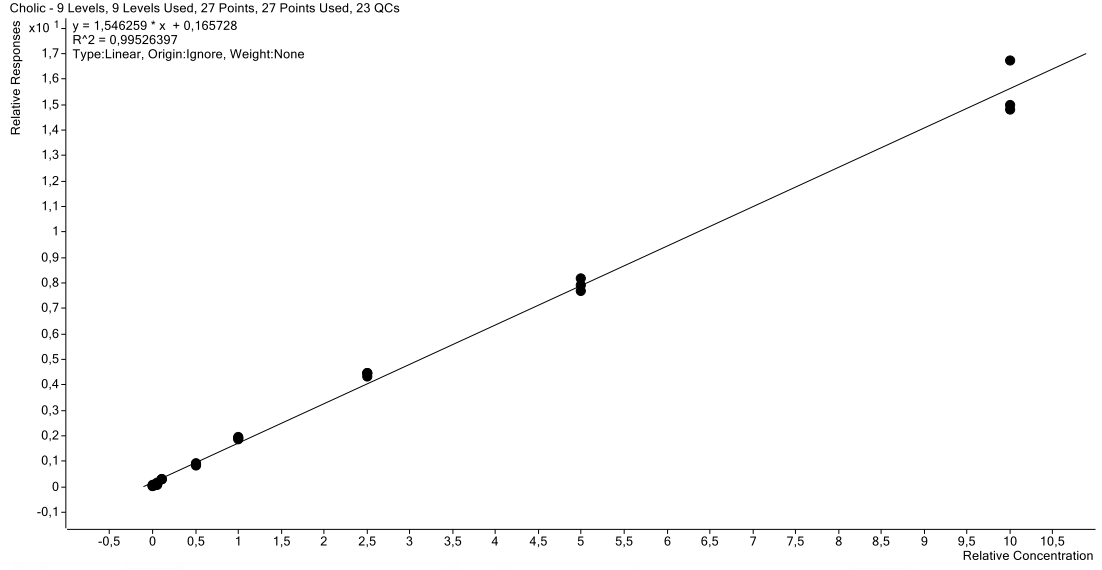
Şekil 5.10 (Devam). Safra asitlerine ait doğrusallık eğrileri, doğru denklemi ve regresyon katsayısı.



Şekil 5.10 (Devam). Safra asitlerine ait doğrusallık eğrileri, doğru denklemi ve regresyon katsayısı.



Şekil 5.10 (Devam). Safra asitlerine ait doğrusallık eğrileri, doğru denklemi ve regresyon katsayısı.



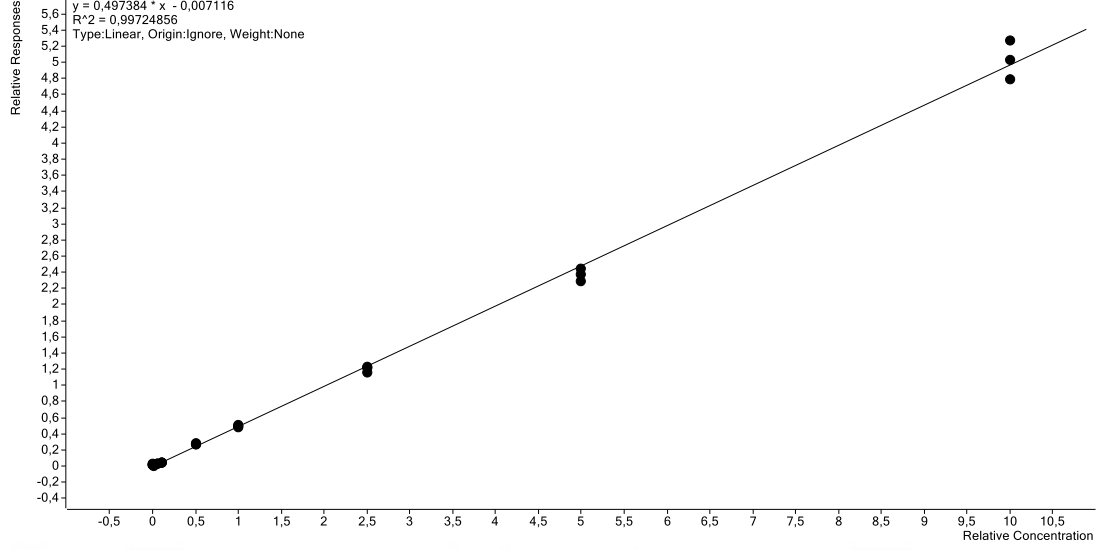
Şekil 5.10 (Devam). Safra asitlerine ait doğrusallık eğrileri, doğru denklemi ve regresyon katsayısı.

Apochoholic - 9 Levels, 9 Levels Used, 27 Points Used, 23 QCs

$$y = 0.497384 \cdot x - 0.007116$$

$$R^2 = 0.99724856$$

Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:None

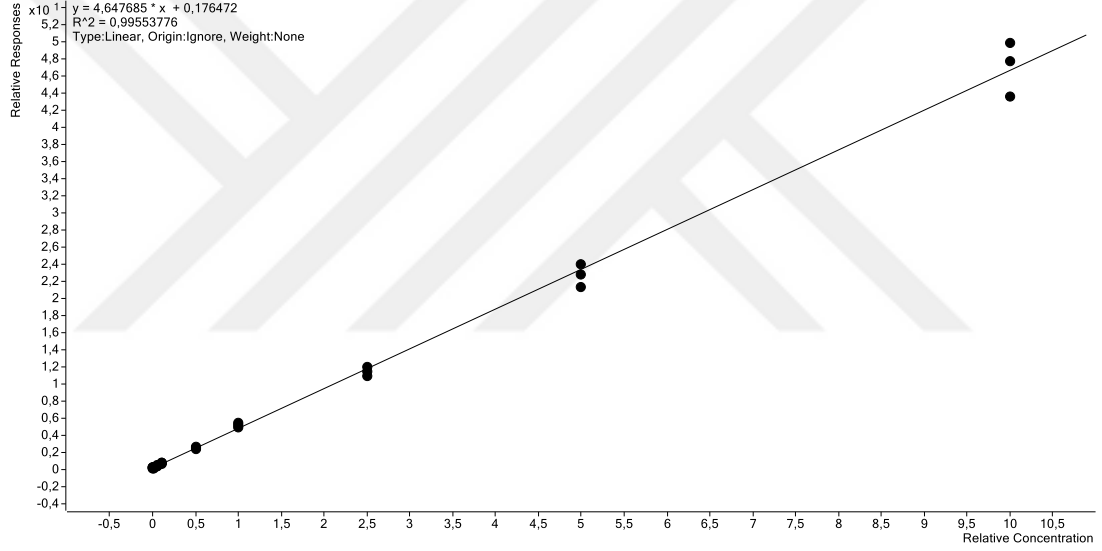


Chenodeoxycholic - 9 Levels, 9 Levels Used, 27 Points, 27 Points Used, 30 QCs

$$y = 4.647685 \cdot x + 0.176472$$

$$R^2 = 0.99553776$$

Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:None

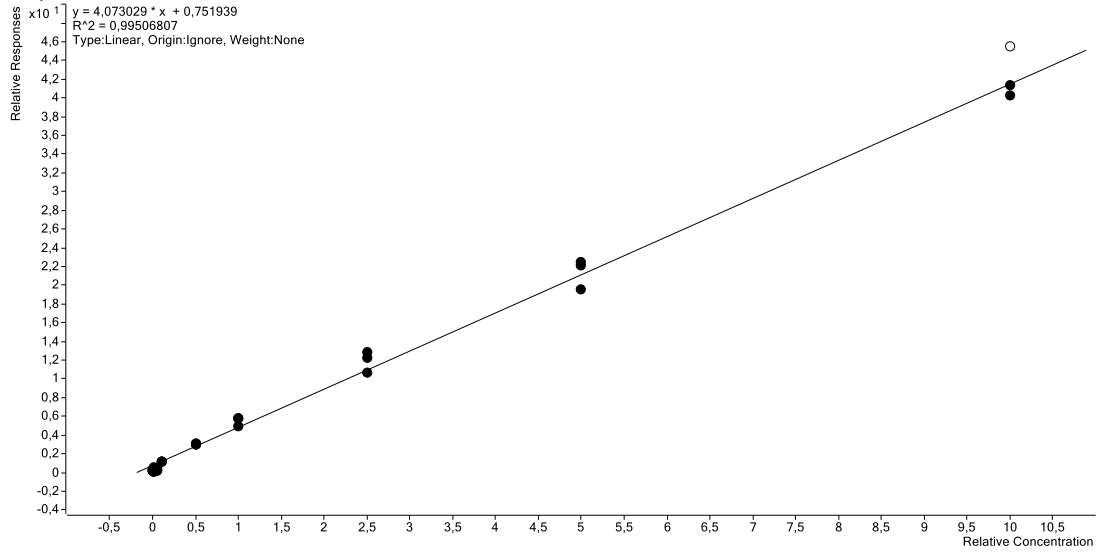


Deoxycholic - 9 Levels, 9 Levels Used, 27 Points, 26 Points Used, 30 QCs

$$y = 4.073029 \cdot x + 0.751939$$

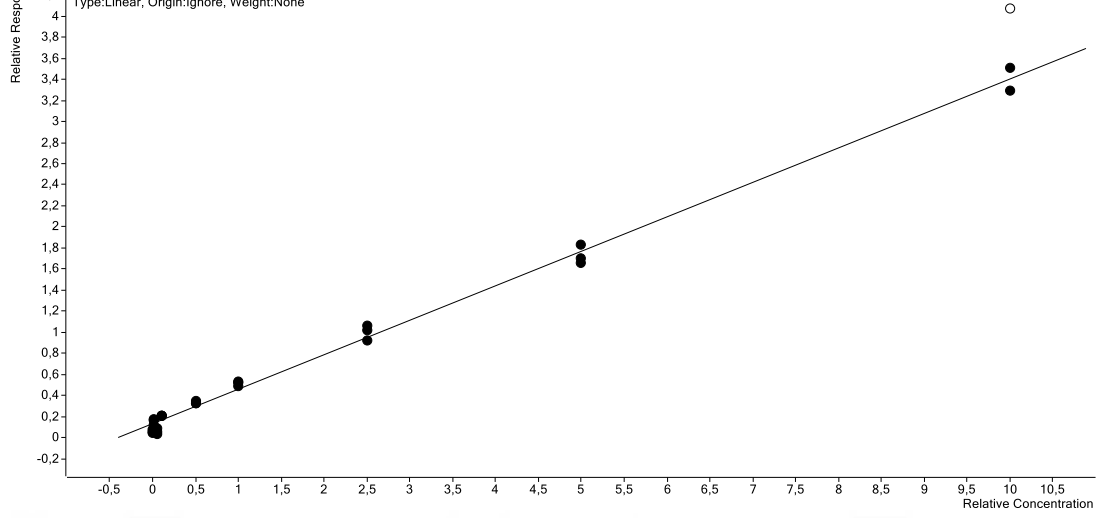
$$R^2 = 0.99506807$$

Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:None

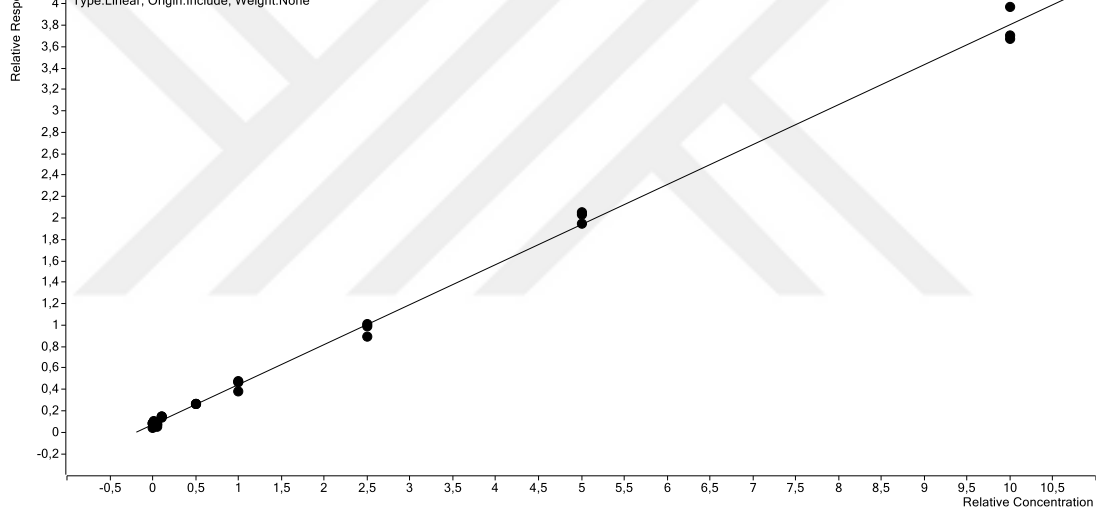


Şekil 5.10 (Devam). Safra asitlerine ait doğrusallık eğrileri, doğru denklemi ve regresyon katsayısı.

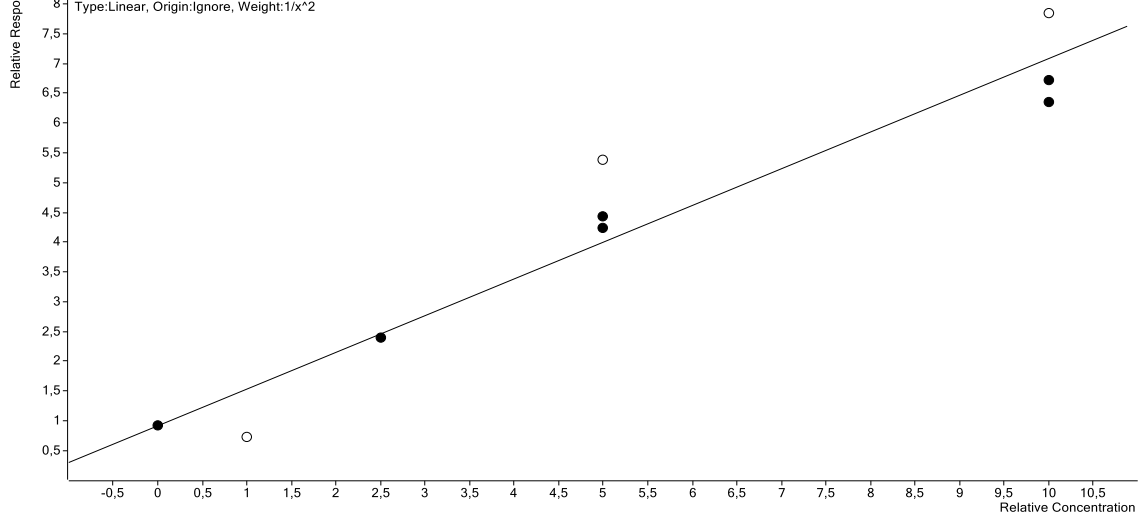
Dehydrolithocholic - 9 Levels, 9 Levels Used, 27 Points, 26 Points Used, 30 QCs
 $y = 0,327186 \cdot x + 0,131522$
 $R^2 = 0,99424574$
Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:None



Lithocholic - 9 Levels, 9 Levels Used, 27 Points, 27 Points Used, 30 QCs
 $y = 0,373290 \cdot x + 0,071199$
 $R^2 = 0,99723076$
Type:Linear, Origin:Include, Weight:None



Dehydrocholic - 5 Levels, 4 Levels Used, 9 Points, 6 Points Used, 5 QCs
 $y = 0,061725 \cdot x + 0,091159$
 $R^2 = 0,99091645$
Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:1/x^2



Şekil 5.10 (Devam). Safra asitlerine ait doğrusallık eğrileri, doğru denklemi ve regresyon katsayısı.

5.2.3. Doğruluk

ICH M10 biyoanalitik validasyon yönergesine göre yöntemin validasyonu sürecinde doğruluk çalışmaları için kalibrasyon eğrisi aralığında en az dört konsantrasyon düzeyinde hazırlanmalıdır. 10-50-250-500-1000 ng/mL standart safra asidi karışım çözeltisi ve her bir konsantrasyonda 100 ng/mL IS ile hazırlanan çözeltiler altı tekrarlı olarak analiz

Tablo 5.4. Farklı konsantrasyonlarda doğruluk için bağıl standart sapma değerleri

No	Safra Asidi	50 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL	1000 ng/mL
1	Dehidrolitokolik asit ±	0,82 ± 0,86	1,12 ± 1,29	1,89 ± 3,06	0,34 ± 0,35
2	Litokolik asit	1,83 ± 2,44	1,83 ± 2,72	1,73 ± 2,42	1,62 ± 1,54
3	7-Ketolitokolik asit	0,31 ± 0,34	1,15 ± 1,20	1,86 ± 2,70	0,99 ± 1,01
4	Apokolik asit	0,87 ± 0,96	0,77 ± 0,82	1,69 ± 2,48	1,22 ± 1,16
5	Kenodeoksikolik asit	1,89 ± 3,38	1,52 ± 1,63	1,86 ± 3,01	0,89 ± 0,94
6	Deoksikolik asit	1,72 ± 2,98	0,88 ± 0,99	1,94 ± 3,44	1,79 ± 2,97
7	Hiyodeoksikolik asit	1,89 ± 2,12	0,33 ± 0,34	2,03 ± 2,05	1,84 ± 2,87
8	Ursodeoksikolik asit	0,67 ± 0,69	1,89 ± 1,88	1,24 ± 1,24	1,82 ± 1,72
9	Dehidrokolik asit	1,78 ± 2,98	0,88 ± 0,99	1,82 ± 2,99	1,91 ± 2,97
10	7-Ketodeoksikolik asit	1,93 ± 3,06	0,62 ± 0,67	1,75 ± 2,87	1,88 ± 2,69
11	Kolik asit	1,49 ± 1,66	1,98 ± 3,11	1,88 ± 2,59	1,64 ± 2,70
12	Hiyokolik asit	1,80 ± 2,09	1,79 ± 2,70	1,59 ± 2,36	0,76 ± 0,80
13	Glikokenodeoksikolik asit	1,86 ± 3,21	1,77 ± 2,91	1,76 ± 3,42	1,78 ± 2,07
14	Glikodeoksikolik asit	1,02 ± 1,14	1,37 ± 1,60	1,82 ± 3,01	1,59 ± 1,76
15	Glikohiyodeoksikolik asit	0,34 ± 0,34	1,88 ± 2,39	1,67 ± 1,76	1,17 ± 1,15
16	Glikoursodeoksikolik asit	0,03 ± 0,04	0,73 ± 0,86	1,90 ± 2,04	1,89 ± 1,99
17	Glikohiyokolik asit	1,94 ± 2,08	1,93 ± 2,47	0,90 ± 0,94	1,85 ± 2,97
18	Taurolitokolik asit	1,62 ± 1,63	1,03 ± 1,04	1,67 ± 2,87	1,77 ± 2,11
19	Taurokenodeoksikolik asit	0,93 ± 1,05	1,96 ± 3,01	0,71 ± 0,70	1,82 ± 2,88
20	Taurodeoksikolik asit	0,17 ± 0,20	0,84 ± 0,83	1,81 ± 3,09	1,91 ± 3,30
21	Tauroursodeoksikolik asit	0,92 ± 0,98	2,88 ± 3,31	1,95 ± 3,22	0,91 ± 0,87
22	Taurokolik asit	1,22 ± 1,35	0,85 ± 0,95	0,41 ± 0,42	1,74 ± 2,13
23	Taurohiyokolik asit	1,96 ± 2,49	1,53 ± 1,76	1,78 ± 2,81	1,11 ± 1,01

5.2.4. Taşınma (Carry-over)

Taşınma analizi için 1000 ng/mL konsantrasyon olan standart safra asidi karışımı ve 100 ng/mL IS içeren çözelti analiz edilmiş daha sonra sadece 100 ng/mL konsantrasyon IS içeren boş numune analiz edilerek ICH M10 kılavuzunda belirtilen değerler için analiz sonucu değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda taşıma gözlenmemiştir.

5.2.5. Sağlamlık

Bir analitik yöntemin sağlamlığı yöntem parametrelerindeki gözlenen küçük değişimlerin analitik yanıtı etkisinin kabul edilebilir düzeylerde olduğunun gösterilmesidir. Bu amaçla sıvı kromatografisi açısından akış hızı 0,33 ve 0,37 mL/dk, kolon sıcaklığı 59 °C ve 61 °C, hareketli faz FA oranı %0,45 ve % 0,55 olacak şekilde parametreler değiştirilmiş, kütle spektroskopisi açısından gaz sıcaklığı 295 °C ve 305 °C gaz akışı 4,9 L/dk ve 5,1 L/dk olacak şekilde 500 ng/mL standart safra asidi ve 100 ng/mL IS içeren çözelti analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda değişim gözlenmemiştir.

5.3. Biyolojik Örnekler Analizinin Değerlendirilmesi

Optimum koşullara göre analizi yapılan serum, idrar ve gaita biyolojik örnekleri protein çöktürme yöntemiyle analize hazırlanmış ve optimum koşullarda MRM analizi yapılmıştır. Her bir biyolojik örneğe aynı konsantrasyonda safra asidi içerek karışım çözeltisi eklenmiş karışım çözeltisi, biyolojik örneğin safra asidi karışım çözeltisi içermeyen formu ve mobil fazın analiz sonrasında pik alanları karşılaştırılmıştır. Kan ve idrar örneklerine ait sonuçlar **Tablo 5.5'te**, gaita örneklerine ait sonuçlar **Tablo 5.6'da** ve bu biyolojik örneklere ait kromatogramlar **Şekil 5.11, Şekil 5.12 ve Şekil 5.13'te** gösterilmiştir.

Tablo 5.5. Kan ve idrar örnek analiz sonuçları pik alanları (ng/mL, Alanlar Sırasıyla yukarıdan aşağı kan ve idrar örneklerine aittir)

	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	4. Örnek
Dehidrolitokolik asit	25,56	44,48	NA	NA
	NA	NA	NA	NA
Litokolik asit	9,77	4,57	9,58	1,63
	5,29	11,43	1,53	91,53
7-Ketolitokolik asit	NA	NA	NA	NA
	NA	NA	NA	NA
Apokolik asit	27,86	29,63	33,66	20,07
	36,28	30,41	48,60	48,74
Kenodeoksikolik asit	4,76	11,68	186,85	42,61
	NA	7,01	5,84	7,04
Deoksikolik asit	NA	NA	4,02	NA
	NA	NA	NA	NA
Hiyodeoksikolik asit	66,54	NA	NA	NA
	NA	NA	NA	NA
Ursodeoksikolik asit	10,39	NA	7,01	NA
	4,46	1,95	NA	NA
Dehidrokolik asit	NA	NA	NA	NA
	NA	NA	NA	NA
7-Ketodeoksikolik asit	NA	NA	NA	NA
	NA	NA	NA	NA
Kolik asit	NA	NA	NA	NA
	NA	NA	NA	NA
Hiyokolik asit	NA	0,43	NA	NA
	NA	3,15	NA	NA
Glikokenodeoksikolik asit	6881,86	10794,26	283,54	132,63
	35,02	127,55	NA	NA
Glikodeoksikolik asit	16306,00	30864,06	326,68	308,95
	129,14	270,91	NA	NA

Tablo 5.5. (Devamı). Kan ve idrar örnek analiz sonuçları pik alanları (ng/mL, Alanlar Sırasıyla yukarıdan aşağı kan ve idrar örneklerine aittir)

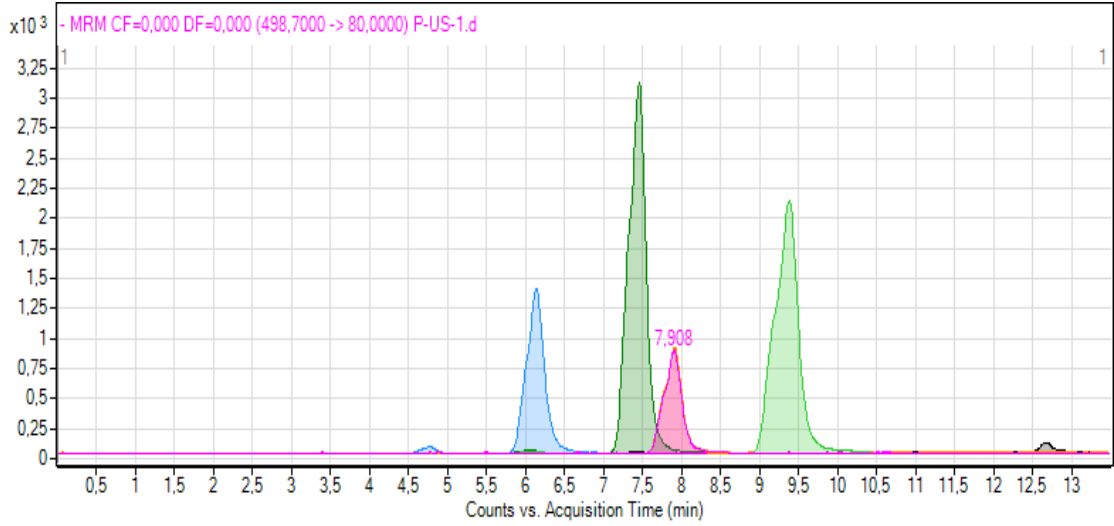
	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	4. Örnek
Glikohiyodeoksikolik asit	134,70	429,52	17,11	38,00
	399,25	153,29	NA	104,96
Glikoursodeoksikolik asit	32,37	163,25	0,59	NA
	97,83	64,16	NA	43,28
Glikohiyokolik asit	108,39	33,62	NA	NA
	109,99	84,32	NA	NA
Taurolitokolik asit	NA	NA	NA	NA
	NA	NA	NA	NA
Taurokenodeoksikolik asit	13483,45	9510,48	161,80	70,59
	75,55	69,77	NA	NA
Taurodeoksikolik asit	6482,19	4516,45	161,80	70,94
	40,72	33,95	NA	NA
Tauroursodeoksikolik asit	10,68	38,77	NA	NA
	18,79	NA	NA	NA
Taurokolik asit	32627,88	6366,79	51,45	56,01
	2907,21	751,40	NA	NA
Taurohiyokolik asit	622,98	75,96	NA	NA
	793,39	128,90	NA	NA

Tablo 5.6. Gaita örnek analiz sonuçları pik alanları (ng/mL)

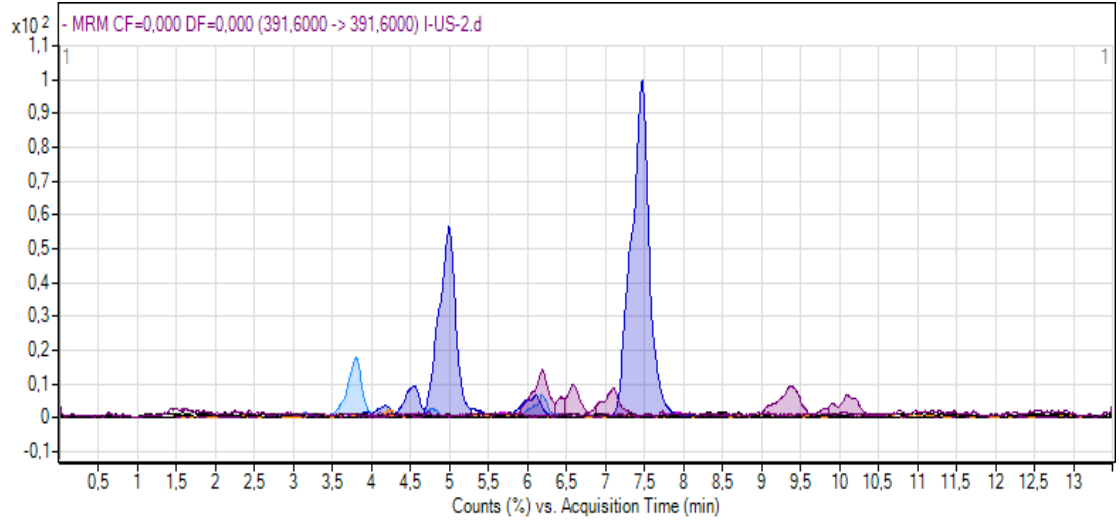
	5. Örnek	6. Örnek	7. Örnek
Dehidrolitokolik asit	2,24	53,72	52,61
Litokolik asit	62,67	379,23	421,73
7-Ketolitokolik asit	2,64	9,17	10,97
Apokolik asit	53,06	91,12	82,22
Kenodeoksikolik asit	77,82	217,34	182,22
Deoksikolik asit	88,68	247,94	208,05
Hiyodeoksikolik asit	3,03	38,17	13,64
Ursodeoksikolik asit	1,13	0,75	2,83

Tablo 5.6 (Devam). Gaita örnek analiz sonuçları pik alanları (ng/mL)

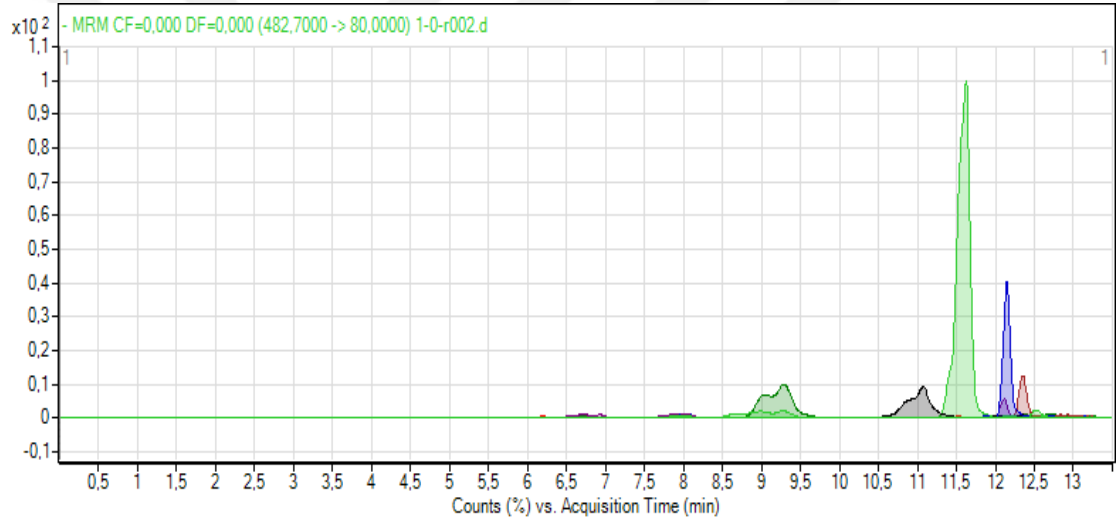
	5. Örnek	6. Örnek	7. Örnek
Dehidrokolik asit	88,68	247,94	208,05
7-Ketodeoksikolik asit	3,19	0,02	4,25
Kolik asit	19,91	0,08	21,15
Hiyokolik asit	0,04	NA	0,12
Glikokenodeoksikolik asit	0,12	NA	NA
Glikodeoksikolik asit	NA	0,09	NA
Glikohiyodeoksikolik asit	NA	0,03	NA
Glikoursodeoksikolik asit	NA	0,41	0,05
Glikohiyokolik asit	NA	NA	NA
Taurolitokolik asit	NA	NA	0,05
Taurokenodeoksikolik asit	1,40	NA	1,49
Taurodeoksikolik asit	0,72	NA	0,86
Tauroursodeoksikolik asit	NA	NA	NA
Taurokolik asit	1,67	NA	0,06
Taurohiyokolik asit	NA	NA	NA



Şekil 5.11. Dördüncü örneğin kan analizi kromatogramı



Şekil 5.12. Birinci örneğin idrar analizi kromatogramı



Şekil 5.13. Altıncı örneğin gaita analizi kromatogramı

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Safra asitleri metabolizma için hayati önem taşıyan biyolojik moleküllerdir. Sağlıklı bir bireyde safra asitlerinin metabolizmasında oynadığı bu önemli rol sebebiyle yaşanacak bir patolojik durum neonatal bir bireyden geriatrik bir bireye kadar hayatını olumsuz etkilemektedir. Özellikle neonatal bireylerde yaşanan patolojik durumun erken tespiti sağlık açısından daha da önem kazanmaktadır.

Yaşanan bir kolestatik durumda bunun hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesi ve değerlendirilerek müdahale edilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışma kapsamında da kütle spektrometresi kullanılarak 23 farklı konjuge ve konjuge olmayan safra asitlerinin tayini için SK-KS/KS yöntemi geliştirilip optimize edilmiştir. Optimizasyon parametreleri kullanılarak ICH M10 biyoanalitik validasyon kılavuzuna göre yöntemin validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Kan, idrar ve gaita biyolojik örneklerinde safra asitlerinin analizi yapılmıştır. Kan ve idrar örnekleri için standart safra asitleriyle ICH kılavuzunda belirtilen limitler çerçevesinde validasyon yapılmış ve biyolojik örneklerde bu safra asitlerinden hangi safra asidini içerdiği kantitatif olarak tespit edilebilmiştir. Kan ve idrar örneklerinin protein çöktürme yöntemi ile analize hazırlanması ve analizi sonucunda matris etkisinin ICH M10 biyoanalitik validasyon kılavuzunda belirtilen limitler dahilinde olduğu görülmektedir. Glikohiyodeoksikolik asit, Taurokolik asit ve Taurohiyokolik asit kan örneklerinde belirtilen limitin dışında bir değer elde edilmiştir. Gaita ile yapılan örneklerde veriler ICH kılavuzunda belirtilen limitler dışında kalıp sağlıklı bir değer elde edilememiştir.

ICH M10 biyoanalitik validasyon kılavuzuna göre geliştirilen bu yöntem literatüre kazandırılan yeni bir metot olma özelliğinin yanı sıra literatür taramalarında UPLC kolonu ile yapılan çalışmalar olmasının karşın 23 safra asidi ile analiz süresi açısından ve 2,1 x 100 mm, 1,8 µm C18 kolonu ile en kısa analiz olma niteliğine sahiptir. Eldeki sonuçlara göre kan ve idrar örneklerinden toplam süre olarak 13 dakika zaman içerisinde optimizasyonu ve validasyonu yapılmış safra asitlerinin kantitatif olarak tespit edilmesi mümkün hale gelmiştir.

KAYNAKÇA

- Alnouti, Y., Csanaky, I. L. ve Klaassen, C. D. (2008). Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 873(2), 209-217.
- Berdié, L., Casals, I., Fernández, I., Jáuregui, O., Marimon, R. M., Perona, J. ve Teixidor, P. (2012). Basics of Mass Spectrometry. In J. R. Seoane ve X. Llovet (Eds.), *Handbook of instrumental techniques for materials, chemical and biosciences research*. Universitat de Barcelona.
- Bootsma, A. H., Overmars, H., van Rooij, A., van Lint, A. E., Wanders, R. J., van Gennip, A. H. ve Vreken, P. (1999). Rapid analysis of conjugated bile acids in plasma using electrospray tandem mass spectrometry: application for selective screening of peroxisomal disorders. *J Inherit Metab Dis*, 22(3), 307-310.
- Brondz, I. (2002). Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 465, 1-37.
- Cai, X., Liu, Y., Zhou, X., Navaneethan, U., Shen, B. ve Guo, B. (2012). An LC-ESI-MS method for the quantitative analysis of bile acids composition in fecal materials. *Biomed Chromatogr*, 26(1), 101-108.
- Chiang, J. Y. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research*, 50(10), 1955-1966.
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanb*, 3(2), 156-160.
- Dass, C. (2006). Basic of mass spectrometry. In C. Dass (Ed.), *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. Wiley.
- David, V., Moldoveanu, S. C. ve Galaon, T. (2021). Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis. *Biomed Chromatogr*, 35(1), e5008.
- Dawson, P. A., Karpen, S. J. (2015). Intestinal transport and metabolism of bile acids. In (Vol. 56, pp. 1085-1099): American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.
- Erlinger, S. (2022). A history of research into the physiology of bile, from Hippocrates to molecular medicine. *Clin Liver Dis (Hoboken)*, 20(Suppl 1), 33-44.

- Fenn, J. B. (2003). Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 42(33), 3871-3894.
- Haag, A. M. (2016). Mass Analyzers and Mass Spectrometers. In H. Mirzaei ve M. Carrasco (Eds.), *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 919). Springer.
- Hagio, M., Matsumoto, M., Fukushima, M., Hara, H. ve Ishizuka, S. (2009). Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents of rats using LC/ESI-MS. *J Lipid Res*, 50(1), 173-180.
- Hamilton, J. P., Xie, G., Raufman, J. P., Hogan, S., Griffin, T. L., Packard, C. A., Chatfield, D. A., Hagey, L. R., Steinbach, J. H. ve Hofmann, A. F. (2007). Human cecal bile acids: concentration and spectrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293(1), G256-263.
- Harrison, A. (2018). *Chemical Ionization Mass Spectrometry* (A. Harrison, Ed. 2nd ed.). CRC Press.
- Hofmann, A. F., Hagey, L. R. (2008). Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(16), 2461-2483.
- Hofmann, A. F., Hagey, L. R. (2014). Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades. *Journal of Lipid Research*, 55(8), 1553-1595.
- Hofmann, A. F., Roda, A. (1984). Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *Journal of Lipid Research*, 25(13), 1477-1489.
- ICH. (2022). *M10: Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*.
- Ikegawa, S., Okuyama, H., Oohashi, J., Murao, N. ve Goto, J. (1999). Separation and Detection of Bile Acid 24Glucuronides in Human Urine by Liquid Chromatography Combined with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Science*, 15, 625-631.

- Jannetto, P. J., Fitzgerald, R. L. (2016). Effective use of mass spectrometry in the clinical laboratory. In (Vol. 62, pp. 92-98): American Association for Clinical Chemistry Inc.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. ve Hillenkamp, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Zon Processes*, 78, 53-68.
- Kritchevsky, D., Nair, P. P. (1971). Chemistry of the Bile Acids. In P. P. Nair ve D. Kritchevsky (Eds.), *The Bile Acids Chemistry, Physiology, and Metabolism: Volume 1: Chemistry* (pp. 1-10). Springer US.
- Li, T., Chiang, J. Y. L. (2020). Bile Acid Metabolism in Health and Disease. In *The Liver* (pp. 269-285). Wiley.
- McLafferty, F. W. (2011). A century of progress in molecular mass spectrometry. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 4, 1-22.
- Medhe, S. (2018). Ionization Techniques in Mass Spectrometry: A Review. *Mass Spectrometry & Purification Techniques*, 04(01).
- Monte, M. J., Marin, J. J., Antelo, A. ve Vazquez-Tato, J. (2009). Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*, 15(7), 804-816.
- Muguruma, Y., Nagatomo, R., Kamatsuki, S., Miyabe, K., Asano, G., Akatsu, H. ve Inoue, K. (2022). Experimental design of a stable isotope labeling derivatized UHPLC-MS/MS method for the detection/quantification of primary/secondary bile acids in biofluids. *J Pharm Biomed Anal*, 209, 114485.
- Mukhopadhyay, S., Maitra, U. (2004). Chemistry and biology of bile acids. *Current Science*, 87(12), 1666-1683.
- Münzenberg, G. (2013). Development of mass spectrometers from Thomson and Aston to present. *International Journal of Mass Spectrometry*, 349-350, 9-18.
- Nguyen, J. T., Shaw, R. P. H. ve Anakk, S. (2022). Bile Acids-A Peek Into Their History and Signaling. *Endocrinology*, 163(11).
- Perwaiz, S., Tuchweber, B., Mignault, D., Gilat, T. ve Yousef, I. M. (2001). Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 42(1), 114-119.
- Plumb, R. S., Rainville, P. D., Potts, W. B., 3rd, Johnson, K. A., Gika, E. ve Wilson, I. D. (2009). Application of ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry to profiling rat and dog bile. *J Proteome Res*, 8(5), 2495-2500.

- Rockwood, A. L., Kushnir, M. M. ve Clarke, N. J. (2018). Mass spectrometry. In (pp. 33-65). Elsevier.
- Rončević, A., Koruga, N., Soldo Koruga, A., Debeljak, Ž., Rončević, R., Turk, T., Kretić, D., Rotim, T., Krivdić Dupan, Z., Troha, D., Perić, M. ve Šimundić, T. (2023). MALDI Imaging Mass Spectrometry of High-Grade Gliomas: A Review of Recent Progress and Future Perspective. In (Vol. 45, pp. 838-851): MDPI.
- Rubakhin, S. S., Sweedler, J. V. (2010). A mass spectrometry primer for mass spectrometry imaging. *Methods Mol Biol*, 656, 21-49.
- Schepler, C., Sklorz, M., Passig, J., Famiglioni, G., Cappiello, A. ve Zimmermann, R. (2013). Flow injection of liquid samples to a mass spectrometer with ionization under vacuum conditions: a combined ion source for single-photon and electron impact ionization. *Anal Bioanal Chem*, 405(22), 6953-6957.
- Siuzdak, G. (2006). *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology* (G. Siuzdak, Ed. 2nd ed.). MCC Press.
- Somogyi, Á. (2008). Mass spectrometry instrumentation and techniques. In K. Vekey, A. Telekes, ve A. Vertes (Eds.), *Medical Applications of Mass Spectrometry* (1st ed.). Elsevier Science.
- Suzuki, Y., Kaneko, R., Nomura, M., Naito, H., Kitamori, K., Nakajima, T., Ogawa, T., Hattori, H., Seno, H. ve Ishii, A. (2013). Simple and rapid quantitation of 21 bile acids in rat serum and liver by UPLC-MS-MS: effect of high fat diet on glycine conjugates of rat bile acids. *Nagoya J Med Sci*, 75(1-2), 57-71.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y. ve Yoshida, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m-z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8), 151-153.
- Toyo'Oka, T. (2017). Derivatization-based High-throughput Bioanalysis by LC-MS. *Analytical Science*, 33, 555-564.
- Vikse, K. L., Scott McIndoe, J. (2018). Ionization methods for the mass spectrometry of organometallic compounds. *J Mass Spectrom*, 53(10), 1026-1034.
- Weng, Z. B., Chen, Y. R., Lv, J. T., Wang, M. X., Chen, Z. Y., Zhou, W., Shen, X. C., Zhan, L. B. ve Wang, F. (2022). A Review of Bile Acid Metabolism and Signaling in Cognitive Dysfunction-Related Diseases. In (Vol. 2022): Hindawi Limited.

- Westergaard, H., Dietschy, J. M. (1976). The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell. *Journal of Clinical Investigation*, 58(1), 97-108.
- Wixom, R. L., Gehrke, C. W. (2010). *Chromatography: A Science of Discovery* (R. L. Wixom ve C. W. Gehrke, Eds.). Wiley.
- Xie, A. J., Mai, C. T., Zhu, Y. Z., Liu, X. C. ve Xie, Y. (2021). Bile acids as regulatory molecules and potential targets in metabolic diseases. In (Vol. 287): Elsevier Inc.
- Xue, H., Huang, L., Tu, J., Ding, L. ve Huang, W. (2021). Bile acids and metabolic surgery. *Liver Research*, 5, 164-170.
- Yamashita, M., Fenn, J. B. (1984). Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry A*, 88(20), 4451-4459
- Zhang, B., Kuipers, F., de Boer, J. F. ve Kuivenhoven, J. A. (2021). Modulation of Bile Acid Metabolism to Improve Plasma Lipid and Lipoprotein Profiles. *Journal of Clinical Medicine*, 11(1).
- http-1:** <https://hotcore.info/babki/quadrupole-mass-spec-diagram.htm>
(Eriřim tarihi: 21.08.2022)
- http-2:** <https://www.chm.bris.ac.uk/ms/tof.xhtml>
(Eriřim tarihi: 21.08.2022)
- http-3:** <https://www.antteknik.com/tr/urunler/?p=lcms-2020-sivi-kromatografi-kutle-spektrometre-lcms>
(Eriřim tarihi: 21.08.2022)
- http-4:** <http://www.optonom.com.tr/kutlespektrometresi.php>
(Eriřim tarihi: 21.08.2022)
- http-5:** <https://twitter.com/ucdmrt/status/1143821787836403714>
(Eriřim tarihi: 21.08.2022)
- http-6:** <https://www.chem.pitt.edu/facilities/mass-spectrometry/mass-spectrometry-introduction>
(Eriřim tarihi: 21.08.2022)
- http-7:** <https://lab-training.com/popular-ionization-techniques-in-mass-spectroscopy/>
(Eriřim tarihi: 21.08.2022)
- http-8:** <https://lab-training.com/popular-ionization-techniques-in-mass-spectroscopy/>
(Eriřim tarihi: 14.08.2022)

http-9: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>
(Eriřim tarihi: 14.08.2022)

