



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HPLC FLORESAN DEDEKTÖR KULLANILARAK
POLİAMİNLERİN SERUMDA SAPTANMASI İÇİN METOT
GELİŞTİRME VE VALİDASYONLARININ YAPILMASI**

ORHAN ÇAKAN

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN


Doç. Dr. TÜRKAN YİĞİTBAŞI

İSTANBUL-2018

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya
Tez Sahibi : Orhan ÇAKAN
Tez Başlığı : HPLC Floresans Dedektör Yöntemiyle Poliaminlerin
Serumda Saptanması İçin Metod Geliştirme ve Analitik
Metod Validasyonunun Yapılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi
Sınav Tarihi : 25.06.2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Doç.Dr. Türkan YİĞİTBAŞI	İstanbul Medipol Üniversitesi	

<u>Sınav Jüri Üveleri</u>		
Prof.Dr. Ebru ALTURFAN	Marmara Üniversitesi	
Dr.Öğr.Üyesi S.Sibel ERDEM	İstanbul Medipol Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 26./06./2018. tarih ve 2018.../25.... - 18... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Orhan ÇAKAN



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ihtiyaç duyduğum her anda bilgi ve tecrübesi ile destek olan saygıdeğer Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nesrin Emekli 'ye,

Yüksek Lisans Tezimle ilgili çalışmamın planlanmasından, tezin basımına kadar her aşamada bana rehberlik eden, sorularıma ve sorunlarıma çözüm sağlayan, her zaman kolaylaştırıcı olan ve daima örnek alacağım saygıdeğer Hocam Doç. Dr. Türkan Yiğitbaşı'na,

Deneyde kullandığım serumları toplama konusunda desteğini esirgemeyen Medipol Üniversitesi Mega Hastanesi Laboratuvarı biyokimya uzmanı Dr. Öğr. Üyesi Güzde Ülfer'e, tüm laboratuvar ekibine,

Laboratuvar süreçlerindeki destek ve yardımları için sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Cüneyd Parlayan'a,

Bugünlere gelmemi sağlayan, emeklerini ödememin imkânsız olduğu canım annem ve babama,

Sadece Yüksek Lisans çalışmamda değil hayatımın her anında en büyük destekçim olan canım eşime,

Evimizin huzuru, sevinç kaynağım oğlum ve kızıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER.....	8
4.1. Poliaminler Genel Bilgi	8
4.2. Poliaminlerin Yapısı ve Oluşum Mekanizmaları.....	9
4.3. Poliamin Sentezi, Homeostaz ve Katabolizması	10
4.4. Gıdalarda Biyojen Aminler.....	12
4.4.1. Fermente Gıdalarda Poliaminler.....	12
4.4.2. Fermente Edilmemiş Gıdalarda Poliaminler	12
4.5. Poliaminlerin Sindirim ve Emilimi	13
4.6. Poliaminlerin İnsanlarda Biyolojik Roller ve Fonksiyonları	13
4.7. Tümör Büyümesine Katılım.....	13
4.7.1. Bağırsak Yolunda Etkileri	14
4.7.2. Antioksidan Aktivite.....	15
4.7.3. Poliaminlerin İyon Kanallarıyla Etkileşimi	15
4.7.4. Poliaminlerin Diğer Etkileri	16
4.8. Poliaminlerin Çeşitleri.....	17
4.8.1. Putresin	17
4.8.2. Spermidin.....	19
4.8.3. Spermin.....	20
4.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	22

4.9.1.	Solvent Rezervuar Sistemi	23
4.9.2.	Pompa.....	23
4.9.3.	Oto Örnekleyici ve Enjektör Sistemi	24
4.9.4.	HPLC Kolonu.....	24
4.9.5.	Kolon Fırını	25
4.9.6.	Dedektör	25
4.9.7.	Veri Toplama ve İşleme Bilgisayarı.....	25
4.10.	Spektroskopik Yöntemler.....	25
4.10.1.	Işığın Absorplanması	27
4.10.1.1.	Atomik Absorpsiyon Spektrumları	28
4.10.1.2.	Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi	29
4.10.2.	Lambert-Beer(Bouguer) veya Beer's Yasası.....	30
4.11.	Kromatografi	31
4.11.1.	Kromatografinin Sınıflandırılması.....	33
4.11.1.1.	Adsorpsiyon Kromatografisi.....	33
4.11.1.2.	Dağılma Kromatografisi	33
4.11.1.3.	Boyut Eleme Kromatografisi	34
4.11.1.4.	İyon Değişim Kromatografisi	34
4.12.	HPLC Dedektörleri	34
4.12.1.	Ultraviyole-Görünür (UV-Vis) Bölge Spektrofotometresi.....	34
4.12.2.	Floresan Spektrofotometresi.....	37
4.13.	Analitik Metot Validasyonu	39
4.14.	İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP) Kavramı.....	40
4.15.	Analitik Metot Validasyonu İle İlgili Kılavuzlar	41
4.15.1.	EMA Biyoanalitik Yöntem Validasyonu Kılavuzları	41
4.15.2.	FDA Biyoanalitik Yöntem Validasyonu İle İlgili Yayınlanan Kılavuzlar..	42
4.15.3.	ICH Kılavuzu Analitik Prosedürlerin Validasyon Parametreleri	43
4.16.	Analitik Metot Validasyon Parametreleri	44
4.16.1.	Seçicilik (Selectivity)	45
4.16.2.	Kalibrasyon / Standart Eğri (Doğrusallık Aralığı)	45
4.16.3.	Analitik Bir Yöntemin Doğruluğu (Accuracy) / Kesinliği (Precision)	46

4.16.4.	Bir Analitin Bir Analizde Geri Kazanımı (Recovery).....	46
4.16.5.	Miktar Tayini Alt Sınırı (LLOQ).....	47
4.16.6.	Stabilite.....	47
4.16.6.1.	Donma ve Çözme Stabilitesi	48
4.16.6.2.	Kısa Süreli Sıcaklık Stabilitesi	48
4.16.6.3.	Uzun Süreli Stabilite.....	48
4.16.6.4.	Stok Çözelti Stabilitesi	49
4.16.6.5.	Hazırlama Sonrası Stabilitesi (Oto Örnekleyici Stabilitesi)	49
4.16.7.	Sağlamlık	49
5.	MATERYAL ve METOT.....	50
5.1.	Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik Özellikleri.....	50
5.2.	Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması	50
5.3.	Kan Örneklerinde İncelenen Parametreler ve Yöntemleri.....	50
5.4.	Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar	51
5.4.1.	Enstrümental Kısım.....	51
5.4.2.	Kolonlar.....	52
5.4.3.	Kimyasallar	52
5.5.	Sistem Kurulumu	53
5.6.	Yöntemin Kromatografik Şartları.....	54
5.7.	Çözeltilerin Hazırlanması	55
5.8.	HPLC Yönteminin Geçerlilik Testleri	57
5.8.1.	Seçicilik (Selectivity) Çalışması	57
5.8.2.	Kalibrasyon / Standart Eğri (Doğrusallık Aralığı) Çalışması	60
5.8.3.	Doğruluk(Accuracy)/Kesinlik(Precision) Çalışması.....	61
5.8.4.	Geri Kazanım (Recovery) Çalışması.....	62
5.8.5.	Miktar Tayini Alt Sınırı (LLOQ) Çalışması	64
5.8.6.	Stabilite.....	64
6.	BULGULAR.....	65
6.1.	HPLC Yöntemi Geliştirme	65
6.2.	HPLC Yöntemi Geçerlilik Testleri	67
6.2.1.	Seçicilik (Selectivity) Çalışması	67

6.2.2.	Kalibrasyon/Standart Eğri (Doğrusallık Aralığı) Çalışması	71
6.2.3.	Doğruluk(Accuracy)/Kesinlik(Precision) Çalışması.....	78
6.2.4.	Geri Kazanım (Recovery) Çalışması.....	86
6.2.5.	Miktar Tayini Alt Sınırı (LLOQ) Çalışması	89
6.2.6.	Stabilite Çalışması.....	91
7.	TARTIŞMA VE SONUÇ	92
8.	KAYNAKLAR	100
9.	ETİK KURUL ONAYI.....	108
10.	ÖZGEÇMİŞ	112



KISALTMALAR

HPLC:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Put:	Putresin
Spm:	Spermidin
Spd:	Spermin
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
GC:	Gaz Kromatografisi
UV:	Ultraviyole
FLR:	Floresan
LC:	Sıvı Kromatografisi
MS:	Kütle Spektrometresi
Q-TOF:	Quadrupole-Time Of Flight
OPA:	O-Fitalaldehit
NAC:	N-Asetil-L-sistein
FDA:	Food And Drug Administration
EMA:	European Medicines Agency
LLOQ:	Lower Limit Of Quantification
RNA:	Ribo Nükleik Asit
SAMDC:	S-Adenozil-L-Metiyonin
SSAT:	Spermidin / Spermine N-Asetiltransferaz
ODC:	Ornitin Dekarboksilaz

DMFO:	2-Difluorometilornitin
ADOMETDC:	S-Adenosilmetionin Dekarboksilaz
SAM486A:	4-Amidinoindan-1-One-2'-Amidinhidrazon
SMO:	Spermin Oksidaz
APAO:	N ¹ -Asetilpoliamin Oksidaz
MDL72527:	N, N ¹ -Bis (2,3-Butadienil) -1,4-Butandiamin
MTA:	5'-(Metiltio) Adenosin
NMDA:	N-Methyl-D-Aspartat
K ⁺	Potasyum
Ca ⁺	Kalsiyum
SAM:	S-Adenosil-Metionin
MAT1A:	Metionin Adenosiltransferazlar
MAT2A:	Metionin Adenosiltransferazlar
MAT2B:	Metionin Adenosiltransferazlar
MT:	Metil Transferazlar
dcSAM:	Dekarboksillenmiş SAM
AMD1:	Adenzilmetiyonin Dekarboksilaz ¹
DAM:	Dekarboksile S-Adenzilmetiyonin
ODC1:	Ornitin Dekarboksilaz ¹
ADOMET:	S-Adenosil-L-Metiyonin
IR:	Infrared
NMR:	Nükleer Manyetik Rezonans
λ:	Dalga Boyu

V:	Frekans
P:	Işıma Gücü
B:	Çözeltinin Kalınlığı
C:	Konsantrasyon
T:	Geçirgenlik
E:	Molar Absorpsiyon Katsayısı
A:	Absorbans
AU:	Absorbans Birimi
KD:	Dağılım (Partisyon) Katsayısı
IEC:	İyon Değişim Kromatografisi
PDA:	Photo Diod Array
GLP:	İyi Laboratuvar Uygulamaları
OECD:	Organisation For Economic Co-Operation And Development
ABD:	Amerika Birleşik Devletleri
ICH:	International Conference On Harmonisation
EMA:	European Medicines Agency
IND:	Araştırılan Yeni İlaç Uygulamaları
NDA:	Yeni İlaç Uygulamaları
VEA:	Kısaltılmış Yeni İlaç Uygulamaları
BA:	Biyoyararlanım
BLA:	Biyolojik Lisans Başvuruları
PK:	Farmakokinetik
BE:	Biyoeşdeğerlik

AAPS:	Hasar Gören Numune Reanalizi
EC:	Avrupa Komisyonu
CV:	Değişim Katsayısı
S/N:	Sinyal/Gürültü
IFCC:	Uluslararası Klinik Kimya Ve Tıbbi Laboratuvar Federasyonu
NCCLS:	Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi
REMER:	Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi
EU:	Emisyon Birimi
QC:	Kalite Kontrol
BH:	Bağıl Hata
BSS:	Bağıl Standart Sapma
SS:	Standart Sapma
PTFE:	Politetrafloretillen
r:	Korelasyon
r ² :	Korelasyon Katsayısı
RC	Regenerated Cellulose
PTFE	Polytetrafluoroethylene
PDVF	Polyvinylidene Fluoride

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.15.3.1. ICH, FDA, EMA kılavuzları validasyon parametreleri.....	44
Tablo 5.4.1.1. HPLC metodu için kullanılan ekipmanlar	51
Tablo 5.4.2.1. HPLC metodu için kullanılan kolonlar.....	52
Tablo 5.4.3.1. HPLC metodu için kullanılan kimyasallar	52
Tablo 5.6.1. HPLC kromatografik yöntem şartları	54
Tablo 5.6.2. HPLC sistemi gradient programı	55
Tablo 5.8.2.1. Kalibrasyon standartlarının konsantrasyonları	61
Tablo 6.2.2.1. Putresin doğrusallık çalışması sonuçları.....	71
Tablo 6.2.2.2. Spermidin doğrusallık çalışması sonuçları	72
Tablo 6.2.2.3. Spermin doğrusallık çalışması sonuçları	72
Tablo 6.2.3.1. Gün içi doğruluk ve kesinlik değerleri	78
Tablo 6.2.3.2. Günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	79
Tablo 6.2.4.1. Putresin geri kazanım çalışma sonuçları	86
Tablo 6.2.4.2. Spermidin geri kazanım çalışma sonuçları	87
Tablo 6.2.4.3. Spermin geri kazanım çalışma sonuçları	87
Tablo 6.2.5.1. Miktar tayini alt sınırı (LLOQ) sonuçları	89
Tablo 6.2.6.1. Kısa süreli sıcaklık stabilite çalışması sonuçları	91

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.1. Doğal olarak oluşan poliaminlerin kimyasal yapıları	9
Şekil 4.3.1. Poliamin metabolik yolundaki hedefler	11
Şekil 4.8.1.1. Putresinin kimyasal yapısı	17
Şekil 4.8.1.2. Putresin metabolik yolu	18
Şekil 4.8.2.1. Spermidin kimyasal yapısı	19
Şekil 4.8.2.2. Spermidin biyosentezi	20
Şekil 4.8.3.1. Spermin kimyasal yapısı	21
Şekil 4.8.3.2. Spermin biyosentezi	21
Şekil 4.9.1. HPLC sisteminin genel bir gösterimi	22
Şekil 4.10.1. Elektromanyetik spektrumun şematik gösterimi	27
Şekil 4.10.1.2.1. Bir molekül için enerji seviyeleri diyagramı	29
Şekil 4.10.2.1. Absorplayıcı bir solüsyondan geçen ışığın absorpsiyonu	30
Şekil 4.12.1.1. Geleneksel bir spektrofotometre cihazının şematik gösterimi	35
Şekil 4.12.1.2. PDA spektrometresi şematik gösterimi	36
Şekil 4.12.2.1. Fotolüminesans sistem için kısmi enerji diyagramı	38
Şekil 4.12.2.2. Bir floresan spektrofotometrenin şematik çizimi	39
Şekil 6.2.1.1. Kör(blank) çözeltisi seçicilik kromatogramı	67
Şekil 6.2.1.2. Putresin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı	68
Şekil 6.2.1.3. Spermidin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı	68
Şekil 6.2.1.4. Spermin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı	69
Şekil 6.2.1.5. Standart çözeltisi seçicilik kromatogramı	69
Şekil 6.2.1.6. Numune çözeltisi seçicilik kromatogramı	70
Şekil 6.2.1.7. Poliamin spike edilmiş numune seçicilik kromatogramı	70
Şekil 6.2.2.1. Putresin kalibrasyon eğrisi	73
Şekil 6.2.2.2. Spermidin kalibrasyon eğrisi	73
Şekil 6.2.2.3. Spermin kalibrasyon eğrisi	74
Şekil. 6.2.2.4. %10'luk doğrusallık kromatogramı	74
Şekil. 6.2.2.5. %50'lik doğrusallık kromatogramı	75

Şekil. 6.2.2.6. %80'lik doğrusallık kromatogramı.....	75
Şekil. 6.2.2.7. %100'lük doğrusallık kromatogramı.....	76
Şekil. 6.2.2.8. %150'lik doğrusallık kromatogramı.....	76
Şekil. 6.2.2.9. %200'lük doğrusallık kromatogramı.....	77
Şekil. 6.2.2.10. %250'lik doğrusallık kromatogramı.....	77
Şekil 6.2.3.1. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik standart kromatogramı.....	79
Şekil 6.2.3.2. %50'lik gün içi tekrarlanabilirlik kromatogramı.....	80
Şekil 6.2.3.3. %100'lük gün içi tekrarlanabilirlik kromatogramı.....	80
Şekil 6.2.3.4. %150'lik gün içi tekrarlanabilirlik kromatogramı.....	81
Şekil 6.2.3.5. %50'lik günler arası tekrarlanabilirlik 1. gün kromatogramı.....	81
Şekil 6.2.3.6. %100'lük günler arası tekrarlanabilirlik 1. gün kromatogramı.....	82
Şekil 6.2.3.7. %150'lik günler arası tekrarlanabilirlik 1. gün kromatogramı.....	82
Şekil 6.2.3.8. %50'lik günler arası tekrarlanabilirlik 2. gün kromatogramı.....	83
Şekil 6.2.3.9. %100'lük günler arası tekrarlanabilirlik 2. Gün kromatogramı.....	83
Şekil 6.2.3.10. %150'lik günler arası tekrarlanabilirlik 2. gün kromatogramı.....	84
Şekil 6.2.3.11. %50'lik günler arası tekrarlanabilirlik 3. gün kromatogramı.....	84
Şekil 6.2.3.12. %100'lük günler arası tekrarlanabilirlik 3. gün kromatogramı.....	85
Şekil 6.2.3.13. %150'lik günler arası tekrarlanabilirlik 3. gün kromatogramı.....	85
Şekil 6.2.4.1. %50'lik geri kazanım çözelti kromatogramı.....	88
Şekil 6.2.4.2. %100'lük geri kazanım çözelti kromatogramı.....	88
Şekil 6.2.4.3. %150'lik geri kazanım çözelti kromatogramı.....	89
Şekil 6.2.5.1. Putresin LLOQ çözelti kromatogramı.....	90
Şekil 6.2.5.2. Spermidin LLOQ çözelti kromatogramı.....	90
Şekil 6.2.5.3. Spermin LLOQ çözelti kromatogramı.....	91

1. ÖZET

HPLC FLORESAN DEDEKTÖR KULLANILARAK POLİAMİNLERİN SERUMDA SAPTANMASI İÇİN METOT GELİŞTİRME VE VALİDASYONLARININ YAPILMASI

Poliaminlerin canlı organizmalarda büyüme faktörü olarak ve metabolik olayları düzenlemede önemli görevleri vardır. Doğal poliaminler; putresin, spermidin ve spermin tüm canlı hücrelerde bulunur. Poliaminlerin ölçümü, kanserde prognoz takibi dâhil pek çok metabolik durumun takibinde önemlidir ancak poliamin ölçümünde metot standardizasyonu ve validasyon eksikliği yeni araştırmalar için önemli bir engeldir. Bu çalışmada poliaminler, Food and Drug Administration (FDA)'in Endüstri İçin Biyoanalitik Yöntem Validasyonu ve European Medicines Agency (EMA)'nın Biyoanalitik Yöntem Validasyonu kılavuzlarına göre valide edildi. 100 µl serum örnekleri 1.5 M HClO₄ ile ön muameleye tutuldu ve 2 M K₂CO₃ ile protein yapıları çöktürüldü. Poliaminlerin o-Fitalaldehit ve N-Asetil-L-sistein ile in-line türevlendirme yöntemiyle ters faz C18 HPLC kolonunda 30 dk.'lık gradient program ile ayırım sağlanarak 340 nm'lik eksitasyon ve 450 nm'lik emisyon dalga boyunda floresan dedektörde tespit edildi. Putresin, spermidin ve spermin için alt doğrusallık limitleri sırasıyla 0.1-250 ng/ml, 0.5-250 ng/ml ve 1-250 ng/ml; en düşük miktar tayini alt sınırları 0.2 ng/ml, 0.5 ng/ml ve 1.0 ng/ml ; geri kazanım değeri %89.6, %89.6 ve %88.4 olarak bulundu. Putresin, spermidin ve spermin için sırasıyla gün içi doğruluk değerleri %6.3-13.6, %3.4-8.6 ve %1.5-6.0; kesinlik değerleri %0.9-1.7, %0.2-0.3 ve %0.1-0.7 bulundu. Putresin, spermidin ve spermin için sırasıyla günler arası doğruluk değerleri %5.7-12.4, %6.1-9.1 ve %4.5-12.6; kesinlik değerleri %6.2-9.7,%1.6-6.1 ve %5.4-13.8 bulundu. Bu çalışmada, mevcut yöntemlerde numune hazırlama basamağındaki santrifüj süresi 15 dk.dan 3 dk.ya düşürüldü ve böylece geri kazanım % 60'lardan %90 lara doğru arttırıldı. İlk defa Waters Nova-Pak C18 3.9 mm, 150 mm ve 4 µm özelliklerinde kromatografi kolonu kullanıldı. Mevcut metotta kullanılan metanol yerine asetronitril kullanıldı. Geliştirilen yeni gradient programı ile pik saflığı ve yeterli pik ayrımı sağlandı.

Sonuç olarak bu çalışmada poliaminler için HPLC yöntemi ile hassas, duyarlı, güvenilir, tekrarlanabilir bir metot geliştirilmiş ve validasyonu yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Poliaminler, HPLC, türevlendirme, o-Fitalaldehit, N-Asetil-L-sistein



2. ABSTRACT

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR DETECTION OF POLYAMINES IN SERUM BY USING HPLC FLUORESCENCE DETECTOR

Polyamines have important roles in living organisms as growth factors and in regulating metabolic events. Natural polyamines such as putrescine, spermidine and spermine are found in all living cells. Measurement of polyamines is important in following up many metabolic events, including follow-up for cancer prognosis. However, method standardization and lack of validation in polyamine measurement are important obstacles for new investigations. In this study, polyamines were validated as per the Bioanalytical Method Validation for Industry of the Food and Drug Administration (FDA) and the Bioanalytical Method Validation guides of the European Medicines Agency (EMA). 100 μ l serum samples were pre-treated with 1.5 M HClO₄ and protein structures were precipitated using 2M K₂CO₃. The polyamines were distinguished by in-line derivatization with o-Phthalaldehyde and N-Acetyl-L-cysteine on reverse phase C18 HPLC column with a 30 minute gradient program. In this way, the absorbance in the wavelength of 340 nm and the emission of 450 nm were detected in the fluorescence detector. For putrescine, spermidine and spermine, lower linearity limits were found as 0.1-250 ng/ml, 0.5-250 ng/ml and 1-250 ng/ml, respectively; lower limit of quantification were found as 0.2 ng/ml, 0.5 ng/ml and 1.0 ng/ml, respectively, and recovery values were 89.6%, 89.6% and 88.4%, respectively. For putrescine, spermidine and spermine, intra-day accuracy values were found as 6.3-13.6%, 3.4-8.6% and 1.5-6.0% respectively and precision values were found as 0.9-1.7%, 0.2-0.3% and 0.1-0.7%. For putrescine, spermidine and spermine, inter-day accuracy values were found as 5.7-12.4%, 6.1-9.1% and 4.5-12.6% respectively, and precision values were found as 6.2-9.7%, 1.6-6.1% and 5.4-13.8% respectively. In this study, centrifugation time in the sample preparation stage of present methods was reduced from 15 minutes to 3 minutes, which in turn increased recovery from 60% to about 90%. A chromatography column having the properties of Waters Nova-Pak C18 3.9 mm, 150 mm and 4 μ m was used for the first time. Acetonitrile was used instead of methanol which is normally used in the

present method. Peak purity and a sufficient extent of peak separation were provided thanks to the newly developed gradient. As a result, an accurate, sensitive, reliable and reproducible method was developed and validated in this study.

Key Words: Polyamines, HPLC, derivatization, O-Phthalaldehyde, N-Acetyl-L cysteine



3. GİRİŞ VE AMAÇ

Poliaminler, DNA sentezi ve stabilitesi, transkripsiyonun düzenlenmesi, iyon kanalı regülasyonu ve protein fosforilasyonu gibi hücre büyümesi ve farklılaşması ile ilgili fonksiyonlarda görev alırlar. Kanser metabolizması, barsağın olgunlaşması, antioksidan özellikleri ve yaşlanmadaki rolleri araştırılmaktadır. Doğal poliaminler; putresin (Put), spermidin (Spd) ve spermin (Spm) tüm canlı hücrelerde bulunur. Memeli hücrelerinde bulunan poliaminlerin biyosentezi, L-ornitin den sentezlenen putresin ile başlar. Sırasıyla putresin'den spermidin ve spermidinden spermin sentezlenir (1). Poliaminler (putresin, spermidin ve spermin), fizyolojik koşullar altında tamamen protonlanmış, ökaryotik ve prokaryotik hücrelerin temel bileşenleri olan basit alifatik primer aminlerdir. Hücre büyümesi ve farklılaşması ve reseptör fonksiyonunu içeren birçok hücre fonksiyonunun gerçekleştirilmesinde rol oynarlar. Ayrıca DNA replikasyonu, gen ekspresyonu, protein sentezi, lipidlerin stabilizasyonu, beyin gelişimi, sinir büyümesi ve rejenerasyonunu etkilemektedirler (2).

Poliaminlerin aşırı üretimi veya aşırı alımı hücreler için toksiktir ve oksidatif mekanizma ile hücre ölümünü kolaylaştırır veya baş ağrılarına, bulantı, hipo veya hipertansiyona ve kalp çarpıntısına neden olabilir (3). Bu bileşikler, olası tümör belirteçleri olarak da önerilmiştir (4,5,6,7). Klinik tanıda anlaşılan önemleri nedeniyle poliamin tayininin ucuz, kolay, tekrarlanabilir ölçümü gerekli hale gelmiştir.

Poliaminleri araştırmak için analitik yöntemler esas olarak; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) veya gaz kromatografisi (GC) cihazlarına bütünleşmiş geleneksel Ultraviyole (UV), floresan veya Kütle Spektrometresi (MS) kullanılarak yapılan pre-kolon veya post-kolon türevlendirmesi kromatografik ayırımına dayanır. Bu tür çalışmalarda pre-kolon veya post-kolon türevlendirme yöntemleri ağırlıklı olarak uygulanmıştır (8, 9). Ayrıca poliaminler; alifatik, aromatik özellikle, düşük molekül ağırlıklı organik bazlardır ve bu yapılarından dolayı kütle dedektörü sistemlerinde tespit edilebilmeleri için molekül kütleleri arttırılmalıdır (10).

Poliamin molekülleri absorpsiyon yapıcı fonksiyonel grupları bulundurmaması nedeniyle UV ve floresan absorpsiyon göstermezler (11,12,13). Poliaminlerin analizi için çeşitli yöntemler uzun yıllardır çalışılmıştır. Aminlerin tespiti için İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), enzimatik assay yöntemi, HPLC UV dedektör kullanılarak poliaminlerin benzoil klorür ve dansil klorür türelendirmesi yöntemleri uygulanmıştır (14,15,16,17).

Ducros ve arkadaşları dansil klorür ile türelendirme yöntemini LC-MS sistemi ile uygulayarak kırmızı kan hücrelerinin poliamin tayini için yöntem önermiştir (18). Hunter ve ark. hem UV dedektör hem de floresan dedektörün kullanıldığı floreskamin türelendirme yöntemi ile poliamin tayini için bir yöntem önermiştir (19). Falco ve ark. poliaminlerin o-Fitalaldehit-N-asetil-L-sistein reaktifleri kullanılarak HPLC sisteminde floresan türelendirme yöntemi ile tespiti için yöntem önermiştir (20). Dai ve ark. o-Fitalaldehit-N-asetil-L-sistein reaktifleri kullanılarak HPLC sisteminde floresan türelendirme ile poliaminlerin tespiti için yöntem önermiştir (21). Lopez ve ark. Sıvı kromatografisi (LC)-MS sisteminde iyon değişim kromatografisi ile bitki örneklerinde poliamin tespiti için yöntem önermiştir (22). Liu ve ark. Karaciğer kanseri hastalarının plazma ve idrar örneklerinde poliamin düzeylerinin tespiti için yöntem önermiştir (23).

Türelendirme yöntemlerinde numune hazırlama aşamasında yaşanan kayıplar ve uygulamalardaki bazı sınırlamalar, tekrarlanabilirlik ve doğru sonuç elde etme konusunda ciddi zorluklara yol açmaktadır (24).

LC-MS sistemleri UV ve Floresan sistemlerine göre en seçici, hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar sunan sistemlerdir. Teknolojik gelişmelere paralel MS sistemlerinin gelişmesi ile HPLC/ Quadrupole-Time of Flight (Q-TOF)-MS sistemleri ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Liu ve ark. HPLC/Q-TOF-MS sistemini kullanarak benzoil klorür türelendirme işlemi ile insan plazmasında poliaminlerin miktarlarını tespit edebilmek için yöntem önermiştir (25).

Biyolojik sıvıların validasyonu için EMA ve FDA güncel olarak kılavuzlar yayımlamaktadırlar ve biyolojik sıvıların analitik metot validasyonlarında bu kılavuzlar kullanılmaktadır (23). Biyolojik sıvılar yöntem geçerliliği; accuracy

(doğruluk), precision (hassasiyet), linearity (doğrusallık), selectivity (seçicilik), lower limit of quantification (LLOQ) (alt ölçüm limiti), recovery (geri kazanım), intra-day and inter-day repeatability (gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik), parametleri uygulanarak sağlanmaktadır (26,27).

Bu çalışmada mevcut metodolojiler ile olan sıkıntıları azaltmak için; numune hazırlık, gradient program, kromatografi kolonu, numune konsantrasyonları çalışmaları denenecektir ve poliaminlerin serumda saptanması için analitik validasyonu yapılmış klinik uygulamaya uygun bir analiz metodu geliştirilecektir.

Projenin amacı, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) floresan dedektör kullanılarak poliaminlerin serumda saptanması için metot geliştirme ve validasyonlarının yapılmasıdır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Poliaminler Genel Bilgi

Biyojen aminler (putresin spermidin ve spermin vs.) hayvan, bitki ve mikroorganizmaların normal metabolizmasında rol alan alifatik, aromatik özellikte, düşük molekül ağırlıklı organik bazlardır (28). "Alifatik Poliamin" terimi veya daha basitçe poliamin, ilk dekarboksilasyon aşamasından sonra ornitinden türetilen üç bileşiği belirtmek için kullanılır (29).

Doğal poliaminler; putresin, spermin ve spermidin tüm canlı hücrelerde bulunur. Canlı organizmalarda büyüme faktörü, antioksidan, DNA, RNA stabilizasyonu ve metabolik olayları düzenleme gibi çeşitli görevleri vardır. Bu nedenle, poliaminler, hücrenin büyümesinde ve çoğalmasında, proteinlerin ve nükleik asitlerin sentezinde önemli bir rol oynamaktadır (30). Doğal olarak oluşan poliaminler spermin (1,12-diamino-4,9-diazadodekan), spermidin (1,8-diamino-4-azaoktan) ve bunların diamin öncüsü putresin (1,4-diaminobutan) memeli hücre büyümesi için mutlak gereklilik gösterir. Doğal poliaminlerin ve bunların analoglarının fizyolojik pH'daki pozitif yüklerinin en önemli özelliği farklı hücresel bileşenler tarafından moleküler tanınmalarını ve daha sonra, farklı iyon kanallarının çoğalması, farklılaşması ve işleyişi gibi önemli hücresel işlevlerin düzenlenmesini sağlamaktır (31).

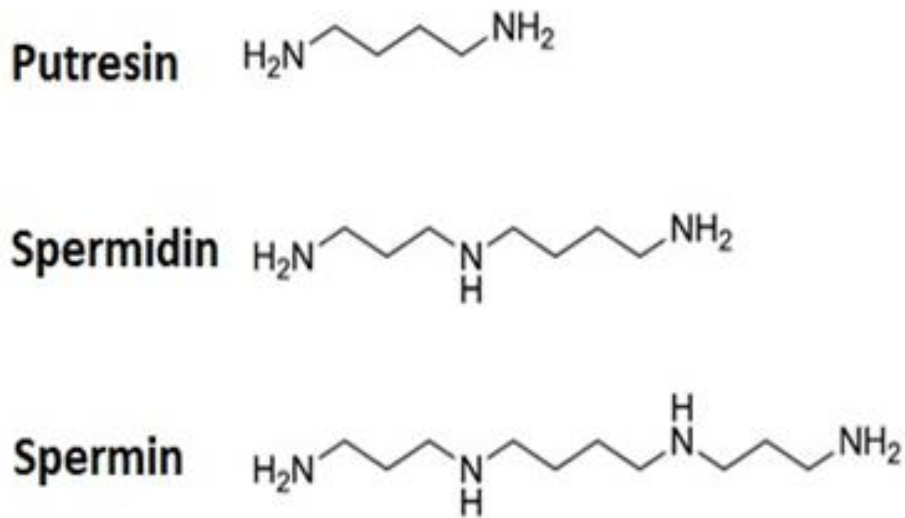
Biyolojik açıdan aktif aminler, canlı organizmaların hücrelerinde normal metabolik süreçlerle oluşan ve parçalanmış bileşiklerdir. Poliaminler hücrede, serbest veya bitki fenolikleri, membran fosfolipidleri gibi bir başka moleküle kovalent olarak bağlı konjuge poliaminler şeklinde bulunurlar (32). Poliaminler; putresin, spermidin ve spermin, hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunur (21). Fizyolojik pH değerinde, poliaminler pozitif yüklenerek DNA, RNA ve proteinler gibi birçok anyonik yapı ile etkileşime girebilirler. Poliaminlerin protein ve nükleik asit sentezinde rol aldığı ve normal hücre bölünmesi ve büyümesi için gerekli olduğu düşünülürse, hücre içi ikinci mesajcı olarak görülebilirler. Bu nedenle, beklenen

şekilde, poliamin metabolizması bozuklukları, insanlarda birçok hastalığın patogeneğinde rol oynar (33).

Biyojen aminler ayrıca vücut sıcaklığının dengelenmesiyle kan basıncının artması ya da azalmasını etkileyebilmektedirler. Poliaminler vücuttaki tüm organların gelişimi, hücrelerin yenilenmesi ve metabolizmaları için gerekli olup bağışıklık sisteminin güçlenmesi için önemlidir. Putresin, kadaverin ve spermidin gibi bazı biyojen aminler serbest radikal tutucu olarak hareket edebilirler. Tiramin içeriğinin artmasıyla antioksidan aktivitesinin de belirgin bir düzeyde arttığı belirtilmektedir (34).

4.2. Poliaminlerin Yapısı ve Oluşum Mekanizmaları

Poliaminler, hidrofobik bir karbon zinciri vasıtasıyla birbirine bağlı birçok amino grubu içeren bileşik sınıfıdır. Genel olarak, poliaminler doğrusal veya dallanmış olabilir, ancak biyokimyasal olarak poliaminler terimi, doğal olarak oluşan poliaminleri, spermidin ve spermin ve onların diamin öncüsü putresini tanımlamak için kullanılır ve fizyolojik pH'da doğrusal pozitif yüklü moleküllerdir (Şekil 4.2.1.). Biyojen aminler, aminoasitlerin dekarboksilasyonu, aldehit ve ketonların aminasyon ve transaminasyonu gibi yollarla oluşabilen temel azotlu bileşiklerdir (31).



Şekil 4.2.1. Doğal olarak oluşan poliaminlerin kimyasal yapıları

4.3. Poliamin Sentezi, Homeostaz ve Katabolizması

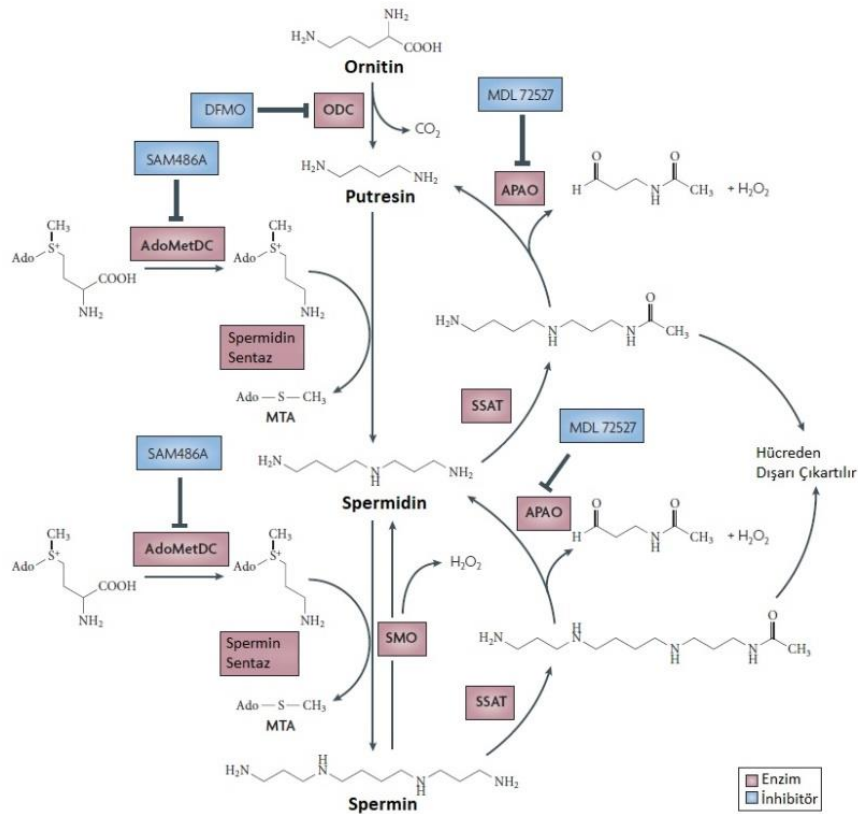
Poliaminler, her yerde bulunan küçük molekül kütleli organik bazlardır. Bir amino asitten alfa karboksilik grubun ayrılması ile biyojen amin oluşumu başlamaktadır. Biyojen aminlerin çoğunun adlandırılmasında köken aldığı amino asidin adından yararlanılmaktadır. Monoamin grubunda yer alan histamin, tiramin, triptamin ve 2-feniletülin, sırasıyla histidin, tirozin, triptofan ve fenilalaninden meydana gelmektedir (34).

Memeli hücrelerinde sentezlenen poliaminler putresin, spermidin ve spermidir. Agmatin (dekarboksillenmiş arginin) memeliler tarafından üretilmemekle birlikte, bağırsak florası da dâhil olmak üzere bitkiler ve birçok bakteri tarafından sentezlenir (35).

Poliamin biyosentezi, tüm canlı organizmalarda bulunan eski bir metabolik yoldur ve poliaminlerin homeostazı hücrelerin hayatta kalması için gereklidir. Poliamin dereglasyonu kanser veya nörodejeneratif bozukluklar gibi hastalıklarla ilgilidir. Sağlıklı hücrelerde poliamin seviyesi, biyosentez ve katabolik enzimler tarafından karmaşık olarak kontrol edilir. Biyosentez; arginin, ornitin ve metionin amino asitlerini kullanır (36).

Memeli hücrelerinde bulunan poliaminlerin biyosentezi, L-ornitin'den türetilen putresin ile başlarken, L-ornitin üre döngüsü sırasında L-arginin vasıtasıyla üretilir. Bu yola paralel, agmatin, bir ara madde görevi görerek poliaminlerin homeostazında önemli bir rol oynamaktadır (29). Ardından, spermidin, putresin'den üretilir ve bu da sperminin oluşumu için substrat sağlar. Spermidin ve sperminin oluşumu, S-adenozil-L-metionin (SAMDC) ve 1,3-diaminopropan'ın kullanıldığı aminopropil transferazları gerektirir. N-asetiltresin, N-asetilspermin ve N-asetilspermidin içeren asetil-poliaminler, poliamin interkonversion yolunda asetilCoA ve spermidin/spermine N-asetiltransferaz (SSAT) ile katalize edilen poliamin metabolik yolağının ürünleri olduğu düşünülmektedir. Ornitin dekarboksilaz (ODC), putresin üretir ve poliamin biyosentezinde hızı sınırlayan ilk adımdır. Kısa yarılanma ömrüne sahiptir, çok aşamalı olarak düzenlenir ve bileşik 2-difluorometilornitin (DMFO) tarafından inhibe edilir. Poliamin sentezinde bir başka hız sınırlayıcı enzim S-adenosilmetionin dekarboksilaz (AdoMetDC) olabilir. Bunun

aktivitesi, kompetitif inhibitör 4-amidinoindan-1-one-2'-amidinhidrazon (SAM486A) tarafından bloke edilebilen hem spermidin hem de sperminin sentezi için aminopropil vericiyi temin etmektedir. Spermin oksidaz (SMO), hücrelerin hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimi yoluyla belirli uyarılara karşı sitotoksik tepkisinde rol oynayan indüklenbilir bir oksidazdır. N^1 -asetilpoliamin oksidaz (APAO), N^1 -asetillenmiş poliaminlerin varlığı nedeniyle hızla sınırlandırılan, yapısal olarak eksprese edilen bir peroksizomal oksidazdır. Bu enzimlerin her ikisi, bir aktif bölge yöneltmiş inhibitör olan N, N^1 -bis (2,3-butadienil) -1,4-butandiamin (MDL72527) tarafından engellenebilir. Spermidin/ spermin N^1 -asetiltransferaz (SSAT), poliamin homeostazının muhafazası için çok önemli olan bir indüklenbilir enzimdir ve aynı zamanda birkaç poliamin analogunun sitotoksik aktivitesinde rol oynar (Şekil 4.3.1.) (37).



Şekil 4.3.1. Poliamin metabolik yolundaki hedefler

DMFO: 2-difluorometilornitin; ODC: Ornithin dekarboksilaz; MDL72527: N, N^1 -bis (2,3-butadienil) -1,4-butandiamin, SAM486A: 4-amidinoindan-1-one-2'-amidinhidrazon; APAO: N^1 -asetilpoliamin oksidaz; AdoMetDC: S-adenosilmetionin dekarboksilaz; MTA: 5'-deoksi-5'-(metiltio) adenosin; SSAT: Spermidin/ spermin N^1 -asetiltransferaz; SMO : Spermin oksidaz;

4.4. Gıdalarda Biyojen Aminler

Proteinleri veya serbest amino asitleri ihtiva eden, mikrobiyal ve biyokimyasal aktiviteyi mümkün kılan koşullara tabi olan neredeyse tüm gıdalarda biyojenik aminler bulunabilir. Oluşan farklı aminlerin toplam miktarı, gıdanın ve mevcut mikroorganizmaların doğasına bağlıdır. Biyojen aminler; balık ürünleri, et ürünleri, süt ürünleri, şarap, bira, sebze, meyve, fındık ve çikolata da dâhil olmak üzere çok çeşitli gıda ürünlerinde bulunur (38).

4.4.1. Fermente Gıdalarda Poliaminler

Ülkemizde yoğurt, tarhana, sucuk, kefir, boza gibi fermente ürünler çok sık tüketilmektedir ve tüketilmeleri tavsiye edilmektedir. Fakat bu gıdalarda fermantasyon sonucunda; insan sağlığını olumsuz etkileyecek biyojen amin bileşikleri de oluşabilmektedir (38).

4.4.2. Fermente Edilmemiş Gıdalarda Poliaminler

Fermente edilmemiş gıdalardaki biyojen aminlerin varlığı, istenmeyen mikrobik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilir. Bu nedenle fermantasyon sırasında oluşan bu zararlı bileşiklerin miktarlarının bilinmesi hem insan sağlığı hem de gıdanın kalitesi bakımından önemlidir (32,34).

Gıdalardaki aminler enzimatik aktivite sonucu veya bakterilerin dekarboksilaz aktivitesi ile oluştuğundan, bu tür aktivitelerin inhibisyonu ve bakteriyel gelişimin önlenmesi, gıdaların amin içeriğini kontrol etmek açısından önemlidir. Bununla birlikte, mikrobiyal varlığın tamamı dekarboksilaz aktivitesi ile oluşmadığından gıda maddelerinde bulunan biyojenik aminlerin varlığı tamamen bozulma organizmalarının büyümesi ile ilişkili değildir (32). Gıdaların üretim şartları da amin oluşumunu etkilemektedir. Örneğin; üretim sırasında kullanılan katkı maddeleri, ürünün pH'sı, depolama sıcaklığı, pişirme şekilleri, starter kültürün çeşidi gibi uygulanan işlemler biyojen amin oluşumunu etkiler. Bu nedenle gıdalardaki amin miktarları mikrobik bozulmanın bir göstergesi olarak kullanılabilir (32,38).

4.5. Poliaminlerin Sindirim ve Emilimi

Besin yoluyla alınan poliaminlerin önemli bir kısmı sistemik dolaşıma girmeden önce bağırsakta degrade olurlar (39). Poliaminlerin ince bağırsak lümeninden dolaşıma geçişi çoğunlukla duodenumda ve proksimal jejunumda meydana geldiği ve luminal poliaminlerin gerçekten vücuttaki büyüme süreçleri için kullanıldığı konusunda genel bir görüş birliği vardır. Kana geçen poliaminler vücudun tamamında hücre büyümesi için kullanılırlar. İnce bağırsakta ve kolon lümeninde en yaygın olarak bulunan poliamin, putresindir. Putresin hızlı bir şekilde emilir ve metabolik aktif spermidin ve spermine dönüşür (7).

4.6. Poliaminlerin İnsanlarda Biyolojik Roller ve Fonksiyonları

Poliaminler, DNA sentezi ve stabilitesi, transkripsiyonun düzenlenmesi, iyon kanalı regülasyonu ve protein fosforilasyonu gibi hücre büyümesi ve farklılaşması ile ilgili çeşitli fonksiyonlarda görev alırlar (40).

Putresin, spermidin ve spermin, fizyolojik koşullar altında pozitif yüke sahip güçlü ve esnek polikasyonlardır. Doğal poliaminlerin ve bunların analoglarının fizyolojik pH'daki pozitif yüke sahip olmaları en önemli özelliklerinden biridir ve farklı hücreler tarafından moleküler olarak tanınmasını ve daha sonra farklı iyon kanallarının çoğalması, farklılaşması ve işleyişi gibi önemli hücreler fonksiyonların düzenlenmesini sağlar (31).

Poliaminler insan sağlığı için hem olumlu hem de olumsuz birçok fizyolojik sürece katılırlar. Bu çeşitli roller hakkındaki bilgiler yapılan çalışmalarla büyük ölçüde artmaktadır (36).

4.7. Tümör Büyümesine Katılım

Poliaminler, kanser gelişimindeki sayısız işlemi etkiler. Kanser risk faktörleri ve poliamin metabolizması arasındaki ilişkinin mekanik temeli son on yılda, özellikle kolon kanseri çalışmaları yoluyla daha bilinir hale geldi. Artan poliamin seviyeleri;

artan hücre çoğalması, azalmış apoptoz ve tümör invazyonunu ve metastazı etkileyen genlerin artmış ifadesi ile ilişkilidir. Tersine, poliamin seviyelerinin bastırılması; hücre büyümesinin azalması, artmış apoptoz ve tümör invazyonunu ve metastazı etkileyen genlerin azaltılmış ifadesi ile ilişkilidir (5).

Poliaminler kanseri tetiklemez ancak tümör büyümesini hızlandırır. Kanser dokularındaki poliamin biyosentezinin ilerlemiş seviyeleri, sentezlerinden sorumlu olan enzimlerin aktivitelerinin artmasından kaynaklanmaktadır. De novo senteze ek olarak hücreler, kanser dokuları, gıda ve bağırsak mikrobiyotası gibi hücre dışı kaynaklardan poliaminleri alabilirler. Artan poliamin miktarı kanser hücrelerinin çoğalmasını hızlandırır ve yüksek poliamin seviyesine sahip bir ortamdaki bağışıklık hücreleri antitümör bağışıklık fonksiyonlarını kaybeder. Kanser hücrelerinin yeni dokuları istila ve metastaz yapma kabiliyeti böylece artmış olur (36).

Poliaminler, normal dokuların hasar görmesi veya tümör gelişimi sonucu ortaya çıkan kan damarı gelişimi için (anjyogenez) gereklidir. Poliamin sentezinin engellenmesi gastrik ülserasyon modellerinde ve tümör modellerinde anjyogenez engeller (41,42,43).

Ekstrasellüler poliaminler, kanser hücrelerinde upregüle düzenlenen enerji bağımlı bir süreç olan poliamin taşıma sistemi yoluyla kanser hücrelerine alınır. Bu nedenle, diyetle egzogen poliaminlerin yoksun bırakılması 1990'lı yıllarda bir tedavi yaklaşımı olarak başlamıştır. Diyetle alınan bazı bileşenlerin, özellikle flavonoidler, polifenoller ve probiyotiklerin kolorektal kanserde poliaminlerin aşırı hücre bölünmesine neden olan rolünü azalttığı bildirilmiştir (44).

4.7.1. Bağırsak Yolunda Etkileri

Spermin daha fazla olmakla beraber, diyetteki poliaminler poliamin havuzuna önemli katkıda bulunurlar. Bunlar, ince bağırsak ve kolondaki mukozal büyüme, olgunlaşma ve yenilenme için gerekli büyüme faktörleridir. Emziren sıçan bağırsağının poliaminlerle olgunlaşması yakın zamanda Dandrifosse ve ark.(2009) tarafından ortaya konmuştur (36).

Bağırsak gelişiminde süt poliaminlerinin önemi tartışmalıdır. Bağırsak olgunlaşması üzerine yapılan çalışmaların çoğu sperminin oral yoldan uygulanması ile gerçekleştirilmiş ve spermidin ile de benzer etkiler gözlenmekle birlikte bağırsak olgunlaşmasının indüksiyonundan spesifik spermin etkilerinin sorumlu olduğu kabul edilmiştir. İnce bağırsağın proksimal kısmında distale göre poliamin konsantrasyonu fazladır ve emilim proksimalden yapılır. Diyetle alınan poliaminlerin neredeyse tamamı emilir. Bağırsak mukoza dokusunu etkilediği düşünülen poliaminlerin kaynağı beslenme kökenli olmaktan çok bakteriyeldir (45).

4.7.2. Antioksidan Aktivite

Spermin ve spermidin membran bileşenleri ve aynı zamanda proteinler ve nükleik asitler için antioksidan etki göstermektedir. Bazı araştırmacılar biyolojik sistemlerde serbest radikal temizleme ve/veya geçiş metal şelasyonu gibi poliaminler için farklı antioksidan mekanizmalar tarif etmiştir. Bununla birlikte, poliaminlerin antioksidan etkilerinin spesifik kimyasal mekanizması hala tam olarak tanımlanamamıştır (46).

Poliaminlerin antioksidan aktivitesi, hücre zarlarının ve DNA hasarının azaltılmasına katkıda bulunur. Fizyolojik konsantrasyonda poliaminler hidroksil radikallerin güçlü tutucularıdır. Spermidin ve spermin ayrıca hem singlet oksijeni hem de hidrojen peroksiti baskılar (36). DNA reaktif oksijen türleri tarafından zarar görmüş ise putresin koruyucu bir etki göstermektedir (47).

4.7.3. Poliaminlerin İyon Kanallarıyla Etkileşimi

Endojen poliaminler, özellikle de spermin'in, bir dizi iyon kanalı tipinin bloklanmasına ve modülasyonuna neden olduğu bulunmuştur (1).

Hücre içi spermin, intrinsik geçiş ve içe doğru yönlendirici potasyum (K^+) kanallarının iyon kanal gözeneklerine doğrudan bağlanarak düzeltilmesinden sorumludur. Bu potasyum kanalları, uyarılabilir ve uyarılamayan hücrelerdeki

dinlenme membran potansiyelini kontrol eder ve nöronlardaki ve kas hücrelerindeki uyarılma eşliğini kontrol eder. Hücre içi spermin, merkezi sinir sisteminde kalsiyum (Ca^{+}) geçirgen glutamat reseptörlerinin bazı alt tiplerinde düzenlenir ve yine spermin bu reseptörlerin iyon kanalına nüfuz edebilir (1).

Ekstraselüler spermin, glutamat reseptörünün N-methyl-D-aspartat (NMDA) alt tipinde, NMDA reseptör akımlarının boyutunu arttıran uyarılma ve voltaja bağlı blok gibi çoklu etkilere sahiptir. Poliaminlerin diğer tür katyon kanallarıyla etkileşimleri de bildirilmiştir (1).

4.7.4. Poliaminlerin Diğer Etkileri

Poliaminler, genetik olarak programlanmış hücre ölümüne özgü olaylara katılırlar ve apoptik yollar arasında çok sayıda bağlantıları bildirilmiştir ancak çözülmemiş birçok soru halen bulunmaktadır (48). Poliaminler erkek ve dişi üreme süreçleri ve embriyo/fetüs gelişimi için gereklidir (49,50).

Poliaminlerin bu çok yönlü ve farklı süreçleri düzenleyen mekanizmaları henüz iyi araştırılmamıştır (49).

Yaşlanmada poliaminlerin rolüyle ilgili Minois ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışma, özellikle spermidin'in sağlıklı organizmalarda yararlı olabileceğini, ancak hastalık oluşumundan sonra zararlı olabileceğini ortaya koymaktadır (51).

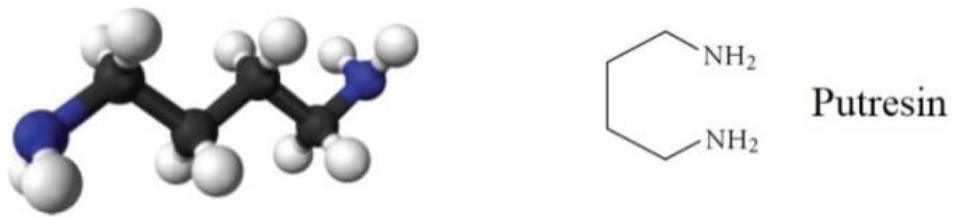
Poliaminler hormonların, nükleik asitlerin ve proteinlerin sentezinde azot kaynağıdır. Aynı zamanda vücut sıcaklığının dengelenmesi ve kan basıncının artması ya da azalmasını etkileyebilirler. Poliaminler vücuttaki tüm organların gelişimi, hücrelerin yenilenmesi ve metabolizmaları için gerekli olup bağışıklık sisteminin güçlenmesi için önemlidir (52). Bazı biyojen aminler gıdalarda tadın gelişimine katkıda bulunur (53). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar mikroorganizmaların aminlerin fizyolojik rolü üzerinde etkili olduğuna dair yeni ve ilgi çekici hipotezler öne sürmektedir (47).

4.8. Poliaminlerin Çeşitleri

Putresin (diamin), spermidin (triamin) ve spermin (tetramin) doğada yaygın olarak bulunan başlıca polikatyonik doğal aminlerdir (39). Putresin ve spermidin hemen hemen tüm organizmalarda yer alırken spermin başlıca ökaryotik hücrelerde bulunur. Poliaminler, metionin ve ornitin'den üretilen küçük polikasyonlardır ve seviyeleri de-novo sentez ve diyetle kontrol edilir. Memelilerde ana poliaminler putresin, spermidin ve spermindir (54).

4.8.1. Putresin

Putresin vücutta ornitin dekarboksilasyonu ile oluşmaktadır ve ilk olarak 1880'li yıllarda bakterilerden elde edilmiştir (55). Poliaminler geleneksel olarak biyojenik aminler grubunda sınıflandırılmışken, ökaryotik hücrelerdeki farklı oluşumları ve spesifik rolleri nedeniyle 1990'lı yıllardan itibaren kendine özgü bir grup olarak ayrılmıştır. Yapısal olarak bir diamin olan putresin, her iki grupta sınıflandırılır (Şekil 4.8.1.1.). Genellikle, bu yaygın amino asit ornitin dekarboksilasyonu ile "asıl" biyojen amin olarak oluşur (36). Putresin çeşitli biyolojik proseslerin kontrolünde en az aktif olan poliamindir (56).

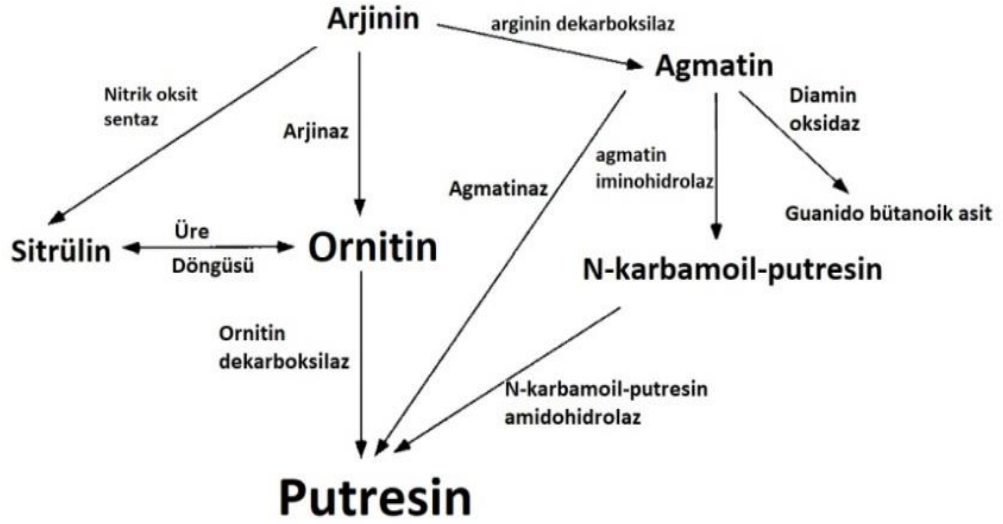


Şekil 4.8.1.1. Putresinin kimyasal yapısı

Putresin, poliaminler olan spermidin ve sperminin öncül bileşiğidir (34). Birçok mikroorganizma ve bitkide putresin agmatinden sentezlenir. Ancak memeli hücresi ve ökaryotlarda arjinin dekarboksilaz yoktur bu nedenle putresin ornitinden sentez edilir. Bu reaksiyon için plazmada ornitin bulunur. Hücre içinde ise arjininden

arjinaz enzimi ile ornitin elde edilir. Bu nedenle arjinaz poliamin sentezinde başlangıç basamağı olarak kabul edilir (57).

Putresin vücutta arjininden ornitin ya da agmatin yoluyla sentezlenir. Arjininden, arjinaz enzimi aracılığıyla oluşan ornitin dekarboksile olarak putresine dönüşür ya da arjininden agmatin, ve sonra putresin sentezlenir (55). Memeli hücrelerinde, ornitinden ornitin dekarboksilaz enzimi etkisi ile putresin oluşturur (Şekil 4.8.1.2.) (35). Putresin daha sonra tersine çevrilebilir bir metabolik süreçle spermidin ve spermin oluşturur (56).



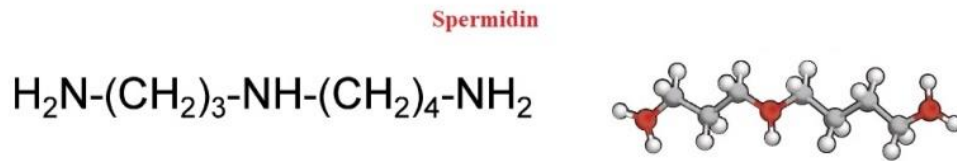
Şekil 4.8.1.2. Putresin metabolik yolu

Putresin, L-ornitin'den biyosentezde hız sınırlayıcı enzim olan ornitin dekarboksilaz ile katalize edilen bir reaksiyonla sentezlenir. Putresin ve dekarboksillenmiş S-adenosylmethionine, sperminin bir öncüsü olan spermidin sentezi için substrattır (1). Enzime ait gen, hormonlarla veya bir onko protein olan myc ile uyarılır. Çekirdekte ve sitoplazmada yer alan bu enzim birkaç dk.'lık bir dönüşüm hızına sahiptir. Ornitin dekarboksilaz, poliamin seviyelerinin korunmasında kritik öneme sahip olduğundan hücre büyümesi ve ilaç geliştirme üzerine yapılan çalışmalarda hedef enzim olarak değerlendirilmektedir (58).

Poliamin sentezinde metiyonin, hücrel metilasyon için majormetil verici olan S-adenosil-metionin (SAM) üretmek için ilk olarak metionin adenosiltransferazlar (MAT1A, MAT2A ve MAT2B) tarafından metabolize edilir. SAM'ın izleyebileceği iki etkin yol vardır. Bunlar, metil grubunu diğer moleküllere aktaran metil transferazların (MT) hareketi vasıtasıyla trans-metilasyon ve poliamin sentezi için substrat olan dekarboksillenmiş SAM'ın (dcSAM) üretilmesine neden olan adenoilmetiyonin dekarboksilaz¹ (AMD1) yoludur. SAM dekarboksilaz etkisiyle “dekarboksile S-adenozilmetiyonin’e (DAM) dönüşümü izler. DAM, spermidin sentaz aracılığıyla putresini spermidine dönüştürür. Öte yandan, ornitin, arginazlar tarafından üretilir ve ornitin dekarboksilaz¹ (ODC1) ile metabolize edilerek putresin oluşur (54).

4.8.2. Spermidin

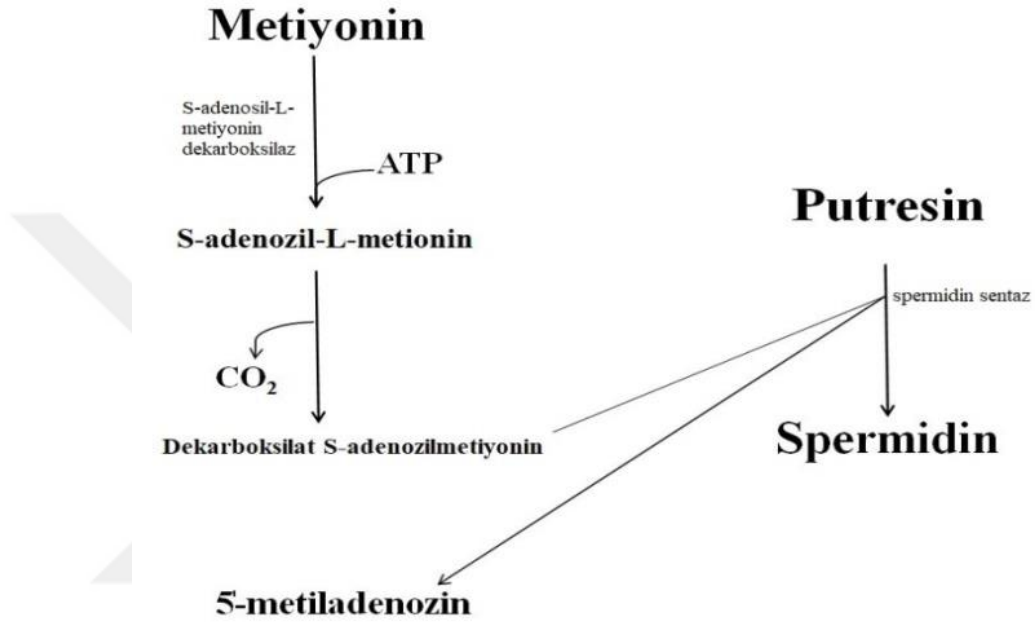
Spermidin azot atomları ile bağlı iki karbon zincirinden meydana gelmiş basit alifatik aminlerdendir (Şekil 4.8.2.1.) (59). Spermidin (triamin) ilk olarak 20. yüzyılın başlarında tespit edilmiştir (5). Spermidin, sperminin biyosentezinin öncüsüdür. Spermidin esasen L-ornitin dekarboksilasyonu ve aminopropil gruplarının spermidin sentaz tarafından S-adenosilmetionin'den putresin'e sıralı transferi yoluyla üretilen doğal poliaminlerdir (59).



Şekil 4.8.2.1. Spermidin kimyasal yapısı

Metiyonin, spermidin ve spermin oluşumu için aminopropil birimi donörüdür. Putresin, spermidin ve spermin biyosentezinin bir ara ürünüdür. Putresin oluşumuna paralel olarak L-metionin, S-adenosil-L-metiyonin’e (AdoMet) dönüştürülür. Daha sonra dekarboksilatlı AdoMet üretmek için bir anahtar enzim olan S-adenosil-L-

metionin dekarboksilaz tarafından dekarboksile edilir. Bu bileşik daha sonra spermidini üretmek için putresine (spermidin sentaz ile) aminopropil grubunun vericisi olarak kullanılır (Şekil 4.8.2.2.) (36). Bir aminopropil grubunun putresin'e eklenmesi, spermidin sentezine yol açar (60).

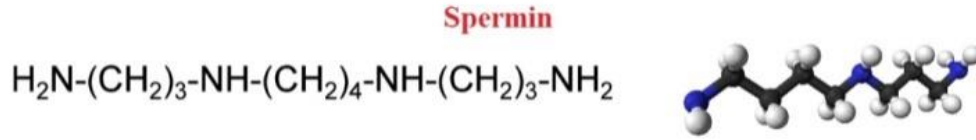


Şekil 4.8.2.2. Spermidin biyosentezi

4.8.3. Spermin

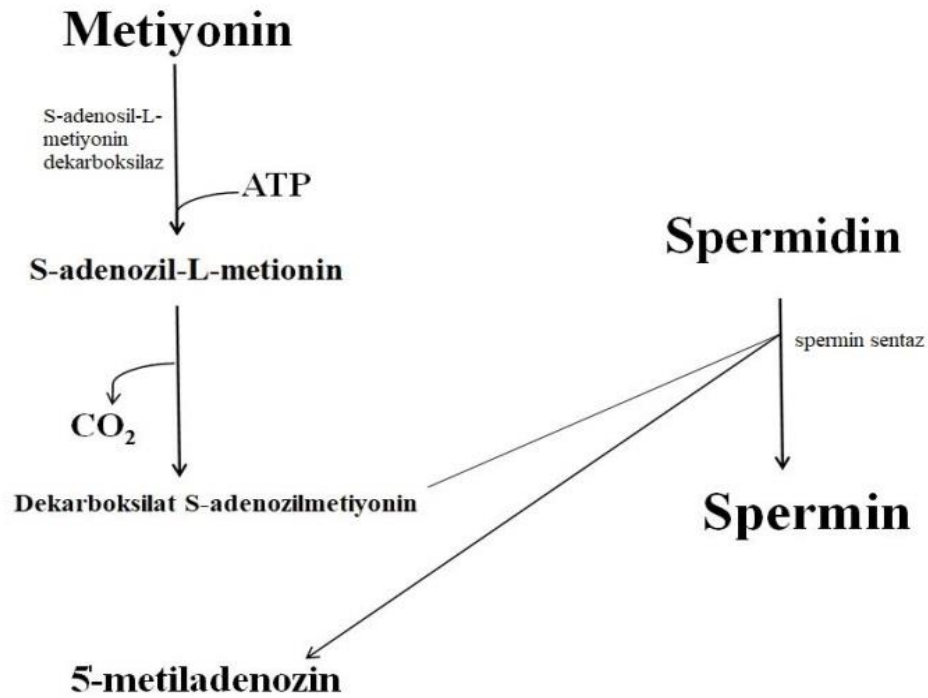
Spermin azot atomları ile bağlı üç karbon zincirinden meydana gelmiş basit alifatik aminlerdendir (Şekil 4.8.3.1.) (59). 1677'de Van Leeuwenhoek tarafından insan spermasının ilk mikroskopik incelenmesi sonucu birkaç gün bekletilmiş numunelerde kristallerin varlığı tespit edilmiştir. 1878'de Schreiner, organik bir bazın fosfat türevlerini belirledi. Başlangıçta izole edildiği kaynaktan dolayı bu baz daha sonra "spermin" olarak adlandırılmıştır. Bununla birlikte, maddenin kesin kimyasal bileşimi ve yapısı tam olarak açıklığa kavuşmamış ve doğru yapı 1924'te Dudley ve ark.'nın sığır beyninden spermini izole etmesiyle belirlenmiştir. 1885 yılında Krieger

tarafından beyin dokusundan "neuridin" adı verilen basit bir bileşik, izole edildi. Bu bileşğin daha sonra spermine özdeş olduğu bulundu (59) .



Şekil 4.8.3.1. Spermin kimyasal yapısı

Spermin biyosentezi putresinden oluşan spermidine (Şekil 4.8.3.2.) spermin sentaz enziminin etkisi ile bir amino grubunun eklenmesiyle oluşur (36).



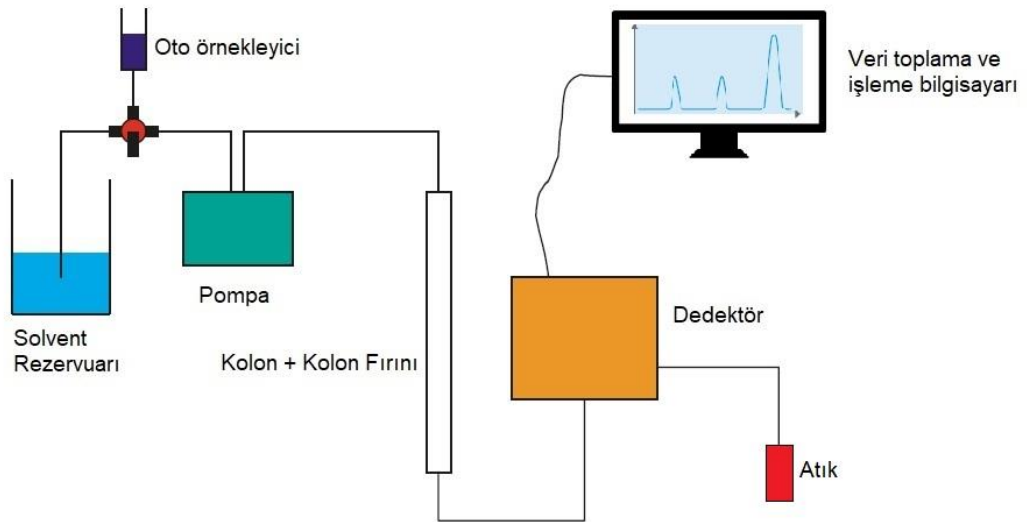
Şekil 4.8.3.2. Spermin biyosentezi

4.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Hareketli fazın pompalar vasıtasıyla basınç oluşturarak kolona verildiği ve dedektör sisteminden geçirilerek nitel ve nicel analizlerin gerçekleştirildiği sistemlere Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) adı verilir. Duyarlı oluşu, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozulabilen maddelerin ayrılmasını sağlaması, doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesi nedeniyle, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır (61,62).

HPLC, uçucu olmayan ve yüksek sıcaklığa maruz kaldığında bozulabilen maddelerin kromatografik olarak ayırarak tesbit ve tayin edilmelerini sağlayan sistemdir. Aminoasitler, karbonhidratlar, proteinler, peptitler, bitki pigmentleri, bitki ve hayvan metabolitleri, glikanlar, nükleik asitler ve ilaç molekülleri gibi küçük moleküller HPLC sistemi ile kolayca ayrılabilir ve tesbit edilebilir (63).

HPLC sistemlerinin genel bileşenleri; solvent rezervuarı, pompa, oto örnekleme, kolon fırını, dedektör, atık toplama şişesi, veri toplama ve işleme bilgisayarıdır (Şekil 4.9.1.) (64,65,61).



Şekil 4.9.1. HPLC sisteminin genel bir gösterimi

4.9.1. Solvent Rezervuar Sistemi

Modern bir HPLC cihazı, her biri 500 ml veya daha fazla çözücü içeren bir veya daha fazla cam veya paslanmaz çelik rezervuar ile donatılmıştır ve en az 1-2 m³'lük bir solvent rezervuarı miktarı ile bir kaç saat boyunca sürekli çalışmaya olanak tanır (63).

Bir rezervuar sistemi mobil faz hatları, filtreler ve degazer sisteminden oluşur. Çözünmüş gazları ve çözünmemiş partikülleri sıvılardan uzaklaştırmak için filtreler ve degazer solvent rezervuar sistemine dâhil edilmiştir. Çözünmüş gazlar hareketli faz hatlarında kabarcıklar üretmekte ve böylece kolonda bant genişlemelerine neden olmaktadır. Buna ek olarak, kabarcıklar ve çözünmemiş partiküller dedektör performansını etkiler. Degazerler bir vakum pompalama sistemi, bir damıtma sistemi, ısıtma ve karıştırma için bir cihaz veya yayılma için bir sistemden oluşabilir. Burada çözünmüş gazlar, hareketli ortamda çözünmeyen inert bir gazın ince baloncukları ile çözünerek dışarı atılır (61).

4.9.2. Pompa

Pompa solvent rezervuar alanına konulan mobil fazları sabit akışta ve yüksek basınçta kromatografi kolonuna pompalayan sistemlerdir. Bir HPLC pompası iki farklı özelliği bir arada bulundurmalıdır. Bunlar; 350 ya da 500 bar'a kadar yüksek basınç üretebilen sağlam bir cihaz olmalı ve seçilen herhangi bir akış hızında yüksek akış doğruluğu ve hassasiyette çalışabilmeli.

HPLC sisteminde kullanılan iki farklı ayırım tekniği vardır. Bunlar; fazın bileşimine göre izokratik ve dereceli elüsyondur. İzokratik elüsyon, tek pompa kullanılarak bileşimi değişmeyen bir hareketli fazla yapılan ayırımlardır. Dereceli elüsyonda ise en az 2 ayrı pompa kullanılarak polariteleri farklı birden fazla hareketli fazla yapılan ayırımlardır (61).

4.9.3. Oto Örnekleyici ve Enjektör Sistemi

HPLC ekipmanının hemen hemen tüm üreticileri, genellikle dikdörtgen veya dairesel bir tepsiye yerleştirilmiş örneklerin program yardımıyla enjeksiyonunun yapılmasına izin veren bir otomatik örnekleyiciye sahiptir. Programlanabilen oto örnekleyiciler numuneleri örnek haznesine doldurmak için hassas motor ile hareket ettirilen şırınga kullanırlar. Enjektörle çekilen hacim kontrol edilerek istenilen miktarda örnek haznesine doldurulur (66). Düzgün bir şekilde çalışan bir otomatik örnekleyici insan hatasını ortadan kaldırır ve enjeksiyon hassasiyetini ve doğruluğunu artırır (62).

Örnek enjeksiyonu ve örneğin muhafazası HPLC için kritik bir parametredir. Enjeksiyon dikkatlice yapılmazsa, en iyi kolon bile kötü bir ayırma üretir. Bir HPLC sisteminde enjektör, yüksek tekrarlanabilirlik ve yüksek basınç altında (4000 psi'ye kadar) 0.1 ml ila 100 ml hacimdeki sıvı enjeksiyonu yapabilmelidir (67,61).

4.9.4. HPLC Kolonu

Sıvı kromatografi kolonları genellikle paslanmaz çelik borudan imal edilmiştir. Kalın cidarlı cam borular bazen düşük basınç uygulamaları için (<600 psi) kullanılırken, çoğu kromatografi kolonu, iç çapları 4 ila 10 mm arasında ve uzunluğu 10-30 cm arası paslanmaz çelikten üretilmiş ve partikül boyutları 5 ila 10 µm aralığında değişen silika dolgu maddeleri ile doldurulmuştur. Son zamanlarda, iç çapı 1 mm ila 4.6 mm ve uzunluğu 3 cm ila 7.5 cm olan yüksek performanslı mikro kolonlar üretilmektedir. 3 µm veya 5 µm'lik partiküllerle paketlenmiş bu kolonlar, hız ve minimum solvent tüketimi avantajına sahiptir. 10 mm veya daha düşük mikropartiküllü sabit fazlar kullanıldığında, 5, 10, 15 veya 25 cm uzunluğunda kolonlar yaygın olarak kullanılır (67,61).

Ters-faz sıvı ve normal-faz sıvı kromatografisinde analiz edilecek örnek polaritesinin sabit faz polaritesine yakınlığına göre kolonda alıkonulur ve hareketli faz polaritesine yakın olan maddeler kolonu önce terk eder (67,61).

4.9.5. Kolon Fırını

İyon değişimi, boyut dışlama ve ters faz kolonlarını daha yüksek sıcaklıklarda çalıştırmak ve sıvı-sıvı kolonların sıcaklığını hassas bir şekilde kontrol etmek genellikle analizlerde avantaj sağlar. Bu nedenle, kolon fırınları modern sıvı kromatografisi cihazlarında istenen bir özelliktir. Genel olarak, sıvı kromatografi kolonlarında sıcaklık 20°C ila 65°C aralığında çalışılabilir ve sıcaklık değişimi $\pm 0.2^\circ\text{C}$ hassasiyetle ölçülmelidir. Sabit sıcaklığın korunması nicel analizde özellikle önemlidir, zira sıcaklıktaki değişiklikler pik alanlarının ölçümünü ciddi şekilde etkileyebilir (63).

4.9.6. Dedektör

Kolonun sonuna yerleştirilen HPLC dedektörü, analitlerin kromatografik sütundan ayrıldıktan sonra tespit edilmesini sağlar. Düzenli olarak kullanılan dedektörler UV, floresan, kütle spektrometresi ve elektrokimyasal dedektörlerdir (67).

4.9.7. Veri Toplama ve İşleme Bilgisayarı

Dedektörden gelen sinyaller, grafikler veya elektronik entegratörler üzerinde toplanır. Veri toplama bilgisayarı kromatografik bilgileri işlemek, depolamak ve raporlamak için HPLC cihazı ile bütünleşik yazılımlar içerir. Bilgisayar dedektörün her maddeye verdiği elektrik sinyalini koordine eder ve sinyali yorumlanabilir bir kromatograma çevirir (67).

4.10. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopi kavramı geçmişte görünür bölge ışığının çeşitli dalga boylarına ayrılıp spektrumlarının elde edilmesi için kullanılırken günümüzde madde ile elektromagnetik ışığın etkileşimini inceleyen bilim dalı olarak tanımlanmaktadır (66, 68). Spektrum kavramı bugün elektromanyetik ışıma ile madde arasındaki

etkileşimlerle ilgilenmekten öteye giderek madde ve diğer enerji türleri arasındaki etkileşimleri de içerecek şekilde genişletilmiştir (69).

Spektroskopi, elektromanyetik ışımının madde ile etkileşiminden ortaya çıkan spektrumların üretimi, ölçülmesi ve yorumlanması ile ilgilidir. Çok çeşitli analitik problemleri çözmek için kullanılabilen birçok farklı spektroskopik yöntem vardır. Bu yöntemler, analiz edilecek türe (moleküler veya atomik spektroskopi gibi), izlenecek ışım-madde etkileşiminin türüne (absorpsiyon, emisyon veya kırınım gibi) ve kullanılan elektromanyetik spektrumun alanına göre farklılık gösterir (70).

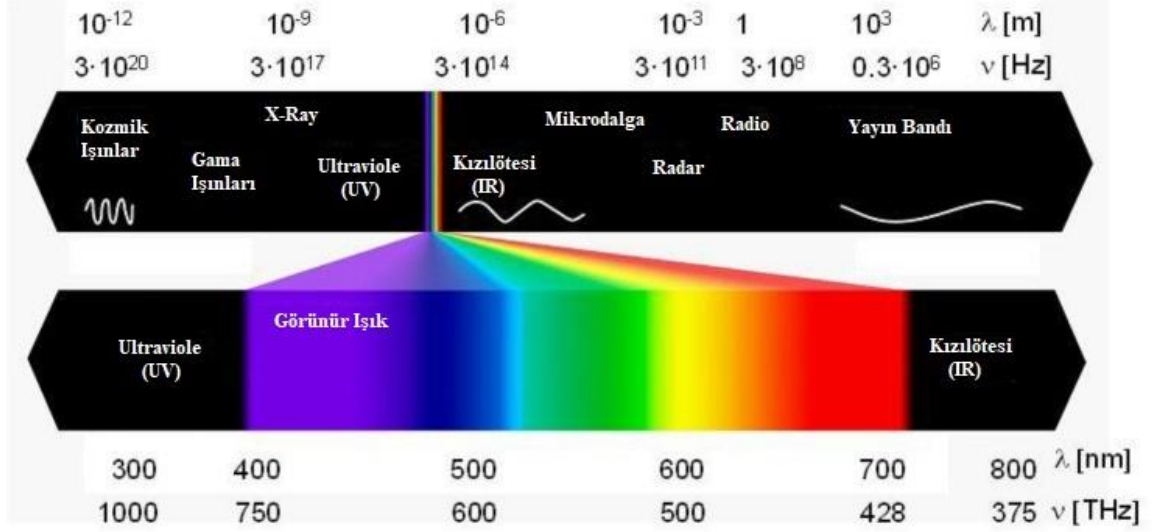
Spektroskopi ve spektrografi; dalga boyunun bir fonksiyonu olarak ışım şiddetinin ölçümü için kullanılan terimlerdir ve genellikle deneysel spektroskopik yöntemleri tanımlamak için kullanılır. Spektral ölçüm cihazları; spektrometre, spektrofotometre, spektrograf veya spektral analizörler olarak adlandırılır (71).

Işığın moleküller tarafından soğurulması moleküldeki atomların türüne, düzenlenmesine, moleküllerin şekline, büyüklüğüne vb. özelliklerine bağlı olduğundan spektroskopik yöntemler maddelerin yapılarının ve stereokimyasal özelliklerinin bulunması, tanınması ve saflık kontrolü gibi çok geniş bir alanda uygulanmaktadır.

Spektroskopik yöntemler; inorganik ve organik bileşiklerin kalitatif, kantitatif analizlerinde, asit-baz denge sabitlerinin ve molekül yapılarının aydınlatılmasında sıklıkla kullanılır. Tüm dalga boylarında çalışabilecek ve hangi dalga boylarının absorplandığını tespit edebilecek tek bir cihaz yapmak mümkün olmadığından, belirli dalga boyu aralıklarında çalışan ayrı ayrı cihazlar geliştirilmiştir. Bu cihazların geçerli oldukları alan spektroskopilerine de Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-Visible), Infrared (IR titreşim) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopileri adı verilir (71,68). Birçok laboratuvarında yaygın olarak; ultraviyole, görünür, kızılötesi ve radyo (nükleer manyetik rezonans) frekans aralıklarındaki ışım emilimine veya emisyonuna dayalı spektroskopik yöntemler kullanılır (70).

Elektromanyetik ışınım, elektromanyetik spektrumun kozmik ve gama ışımından (dalga boyu 10^{-14} ila 10^{-12} m), sesaltı ışımaya (10^{10} m) kadar geniş bir dalga boyu ve frekans yelpazesini kapsayan çok farklı sayıda form alan bir enerji

türüdür. Analitik amaçlar için önemli spektral bölgelerin dalga boyu ve dalga sayısı aralıklarını gösteren diyagram Şekil 4.10.1.'de verilmiştir (72,73).



Şekil 4.10.1. Elektromanyetik spektrumun şematik gösterimi

λ : Dalga boyu, ν : Frekans IR: Kızıl ötesi UV: Ultraviöle

Spektroskopi terimi, bir spektrum oluşturmak için ışık veya görünür ışımının bileşen dalga boylarına dönüştürüldüğü süreçleri belirtmektedir. Bununla birlikte günümüzde, iyonlar (kütle spektrometresi), çekirdeğin dönüşü (nükleer manyetik rezonans spektroskopisi), ses dalgaları (akustik spektroskopi) vb. gibi diğer ışım türleri için de kullanılmaktadır. Spektroskopik teknikler analitik kimyada çok önemli bir alana sahiptir ve uygulamalar çok sayıdadır. Analitik kimyada kullanılan bazı yaygın spektroskopik teknikler; UV-Vis, floresan, IR, NIR, Raman ve Atomik Absorpsiyon Spektroskopisidir (74,72).

4.10.1. Işığın Absorplanması

Çeşitli dalga boylarında ışık içeren bir demet, saydam ve şeffaf bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu görülür. Buna ışığın absorplanması denir. Absorpsiyonla ışık enerjisi, maddenin iyon, atom veya

moleküllerine aktarılır. Böylece ışık enerjisini absorplamış olan iyon, atom veya moleküller uyarılmış hale geçerler. Uyarılmış bir atom veya molekül 10^{-8} sn. kadar yaşayabilir. Sonra absorpladığı ışık enerjisini geri vererek tekrar eski haline veya temel haline döner. Madde tarafından absorplanan ışık enerjisinin geri verilmesi, genellikle ısı şeklinde olur ve madde az çok ısınır. Bazı maddelerde ise absorplanan ışık enerjisi daha uzun dalga boylu ışıklar halinde yayılır. Buna fotoluminesans olayı denir. Bu olayın çok kısa süreli olanına floresan, daha uzun süreli olanına fosforesan adı verilir (74,75).

Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları, başka bir maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır. Absorpsiyon spektrumları genel olarak iki şekilde incelenir (72):

- 1- Atomik Absorpsiyon Spektrumları
- 2- Moleküler Absorpsiyon Spektrumları

4.10.1.1. Atomik Absorpsiyon Spektrumları

Polikromatik UV veya Görünür Bölge ışığı civa veya sodyum gazı gibi tek atomlu bir ortamdan geçirilirse bazı ışıklar kaybolur. Sodyum buharından ışık geçirildiğinde sarı ışık kaybolur. Sarı ışığın sodyum atomları tarafından adsorplanması, sodyum atomlarında 3s enerji seviyesinde bulunan bir elektronun sarı ışığı absorplayarak 3p enerji seviyesine çıkmasıyla açıklanabilir. Atomlarda, en dış tabaka elektronları ultraviyole ve görünür bölge ışıklarla uyarıldıkları halde, iç tabaka elektronları uyarılamaz. İç tabaka elektronlarını uyarabilmek için X-ışınları kullanılır. X-ışınları görünür bölge ışınlarından daha fazla enerjilidirler.

Atomların en dış tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına atomik absorpsiyon, en iç tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına da X-ışınları spektroskopisi denir (75,72).

4.10.1.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

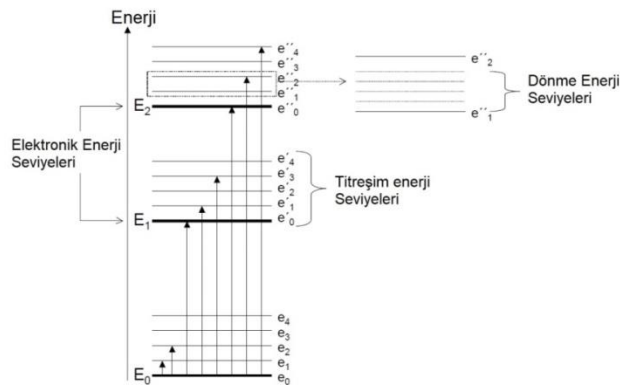
Elektromanyetik enerjinin numunenin atomlarına veya moleküllerine aktarıldığı işleme absorpsiyon denir. Elektromanyetik enerjinin absorpsiyonunu takiben, atomlar ve moleküller, ayrı seviyelerde bulunan bir veya daha fazla yüksek enerji seviyesine uyarılır. Işımanın absorpsiyonu gerçekleşmesi için uyarılan bir fotonun enerjisi temel hal ile uyarılan hallerden biri arasındaki enerji farkıyla tam olarak eşleşmelidir. Bu enerji farklılıkları her bileşik için benzersizdir ve absorplanan ışığın frekanslarının bir grafiği bu nedenle bir bileşiğin karakterizasyonu sağlar. Böylece absorpsiyon spektrumu, dalga boyunun bir fonksiyonu olarak çizildiğinde çok yararlıdır. Bir molekülün absorpsiyon bantlarıyla ilişkili E enerjisi şu şekilde verilir (72). :

$$E_T = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}}$$

Burada; $E_{\text{elektronik}}$ molekülün elektronik enerjisini, $E_{\text{titreşim}}$ titreşim enerjisini, $E_{\text{dönme}}$ ise dönme enerjisini tanımlar. Bir moleküldeki dönme seviyelerinin sayısı, titreşim seviyelerinin sayısından çok daha büyüktür ve titreşim seviyelerinin sayısı, elektronik seviyelerin sayısından daha fazladır. Bu gerçekler, farklı durumlar arasındaki enerji farklılıklarıyla da ilgilidir; burada (72).

$$E_{\text{elektronik}} > E_{\text{titreşim}} > E_{\text{dönme}}$$

Dolayısıyla belirli bir molekül için bir dizi elektronik enerji durumu, daha da fazla sayıda titreşim seviyesi ve aynı zamanda daha fazla dönüş seviyesi mevcut (Şekil 4.10.1.2.1.) (72).

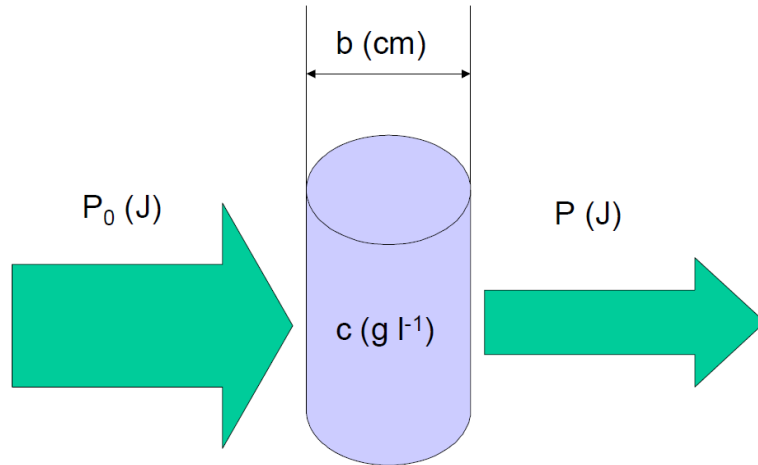


Şekil 4.10.1.2.1. Bir molekül için enerji seviyeleri diyagramı

4.10.2. Lambert-Beer(Bouguer) veya Beer's Yasası

Spektroskopistler için, Lambert-Beer(Bouguer) yasası hiç kuşkusuz spektroskopi'nin en önemli esaslarından biri olan absorbans ile ayrılmaz biçimde ilişkili olduğu için esas teşkil eden bir ilkedir (76). Lambert-Beer(Bouguer) yasası monokromatik ışığın madde tarafından absorbansını ölçer (77).

Atom veya molekül uyarıldıktan 10^{-8} sn. gibi kısa bir süre sonra absorplanan ışık, enerjisini kaybederek tekrar temel enerji seviyesine döner. Madde absorpladığı ışık enerjisini genellikle ısı şeklinde geri verir ve madde çok az ısınır. Bazı maddeler ise absorplanan ışık enerjisini daha uzun dalga boylu ışınlar halinde yayar. Buna fotoluminesans olayı denir. Bu olayın çok kısa süreli olanına floresan, daha uzun süreli olanına fosforesan adı verilir. Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları, başka bir maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır. Paralel ışık demeti bir bileşiğin solüsyonundan geçtiğinde absorpsiyon oluşur. Işığın, solüsyondan geçmeden önceki ışığa gücü P_0 ve solüsyondan geçtikten sonraki ışığa gücü (P), çözeltinin kalınlığı (b;cm) ve konsantrasyon ($c;g \cdot L^{-1}$) 'dir (Şekil 4.10.2.1.) (77,72).



Şekil 4.10.2.1. Absorplayıcı bir solüsyondan geçen ışığın absorpsiyonu

P_0 : Işık, solüsyondan geçmeden önceki ışığa gücü, P: Işık, solüsyondan geçtikten sonraki ışığa gücü, J:Jul, cm: Santimetre, g: Gram, L: Litre c: Konsantrasyon b: Çözeltinin kalınlığı

Genel kullanımda "absorpsiyon spektroskopisi" terimi kullanılsada genellikle ölçülen geçirgenlik (T)'dir. Işık demetinin ortamdan geçme oranına geçirgenlik (T) denir. Fizikokimya ve spektroskopi ders kitaplarına göre, bir materyalin veya bir çözeltinin geçirgenlik T değeri iyi bilinen bir formül ile absorpsiyona dönüştürülür. Çözeltiden iletilen ışımının fraksiyonuna geçirgenlik (T) denir.

$$T=P/P_0$$

şeklinde ifade edilir. Geçirgenlik genellikle yüzde cinsinden verilir.

$$\%T=P/ P_0 *100$$

Geçirgenlik ifadesinin eksi logaritması alınarak Absorbans (A) elde edilir (72,76).

$$-\log T = -\log P/P_0 = A$$

Burada, P_0 , ışığın solüsyondan geçmeden önceki ışımaya gücü veya ışınımıdır ve P, ışığın solüsyon ile etkileşimde bulunduktan sonra çıkan ışık şiddetidir. Bir çözeltinin absorbansı, çözelti boyunca yol uzunluğu (b) ve absorplayıcı türlerin konsantrasyonu (c) ile doğru orantılıdır. Moleküllerin seçilen dalga boyundaki ışımayı absorplaması sonucu ortaya çıkan azalma Lambert-Beer(Bouguer) veya Beer's eşitliği ile verilir. Eşitlikte; geçirgenlik doğrudan; molar absorpsiyon katsayısı (ϵ), absorbansı olmayan çözücü içerisinde çözünen absorplayıcı madde konsantrasyonu (c) ve çözeltinin kalınlığı (b)'ye bağlıdır (77,72,76).

$$A = \log P_0 / P = \epsilon.b.c$$

Absorbans birimi, Absorbans Unit (AU) ile ifade edilir. Bu yasanın bir sınırlaması, sadece yaklaşık <1.5 AU'luk absorbansa sahip solüsyonlar için doğrusal olmasıdır. Dolayısıyla, çok yüksek konsantrasyonda absorpsiyon ve konsantrasyon arasındaki doğrusallık ilişkisi bozulur ve sapmalar yaşanır (72).

4.11. Kromatografi

Kromatografinin ilk çalışmaları 1860'larda bir karbon yatağından geçirilen parafinin 'ağartılması' deneyine dayanır. Ancak kromatografinin resmi ve akredite ilk

keşfi, çeşitli adsorbanlar üzerinde yaprak pigmentlerinin seçici adsorpsiyonu üzerine ayrıntılı çalışması ile 1902'de Mikhail Tswett'e aittir. Kromatografi tekniği Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından klorofil ve ksantofil gibi bitki pigmentlerini, cam bir kolona dondurulmuş kalsiyum karbonattan (CaCO_3) dolgu maddesinden oluşmuş bir sütundan geçirerek ayırmasıyla kullanılmıştır. Bu bileşenler renkli bantlar halinde gözlemlenmesi nedeniyle Yunancada chroma=renk; graphein=yazmak anlamına gelen kelimeler birleştirilerek 'Kromatografi' terimi oluşturulmuştur (64,78,79).

Kromatografi, iki veya daha fazla karışmayan faz arasında dağılım yoluyla karışımların ayrılması olarak tanımlanabilir. Bu karışmayan safhaların bazıları gaz-sıvı, gaz-katı, sıvı-sıvı, sıvı-katı, gaz-sıvı-katı ve sıvı-sıvı-katı olabilir (64).

Kromatografi, bir karışımdaki bileşenlerin hareketli (taşıyıcı) bir faz yardımıyla, sabit (durgun) bir faz arasından değişik hızlarda göç etmeleri esasına dayanır. Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları, tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak mümkündür (80,69,72).

Kromatografide durgun faz, bir katı veya katı yüzeyine kaplanmış bir katı fazdır. Durgun fazın üzerinden akan hareketli faz ise bir gaz veya sıvı fazdır. Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi türüne Sıvı Kromatografi, hareketli fazın gaz olduğu kromatografi türüne ise Gaz Kromatografi denir. Gaz kromatografi, gaz, uçucu sıvı ve katı karışımlar için uygulanan bir tekniktir. Sıvı kromatografi ise özellikle ısıl kararsız ve uçucu olmayan örnekler için uygulanır. Bir kantitatif analiz tekniği olan kromatografide amaç, anlamlı bir süre içinde iyi bir ayırma yapmaktır. Sıvı kromatografisi düzlemsel yüzeylere ve kolonlara uygulanabilen bir kromatografi türüdür. Sıvı kromatografisi normal faz ve ters faz kromatografisi olmak üzere iki farklı teknikle uygulanabilir. Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz hareketli faza göre daha polar olurken, ters faz sıvı kromatografisinde hareketli faz polar, sabit faz ise apolardır (80,69,72).

4.11.1. Kromatografinin Sınıflandırılması

Kromatografi; sabit faz, hareketli faz ve ayırma tekniklerine göre farklı şekillerde sınıflandırılır (81).

- 1- Adsorpsiyon Kromatografisi
- 2- Dağılma Kromatografisi
- 3- Boyut Eleme Kromatografisi
- 4- İyon Değişim Kromatografisi

4.11.1.1. Adsorpsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisi prensibi klasik kolon ve ince tabaka kromatografisinden bilinmektedir. Sabit faz olarak, yüksek spesifik yüzey alanına sahip nispeten polar bir malzeme kullanılır. Sabit faz olarak çoğunlukla silika kullanılır ancak alüminyum ve magnezyum oksit de sıklıkla kullanılır (82).

Adsorpsiyon kromatografisi bir çözelti karışımında maddelerin katı faz üzerinde farklı kuvvetlerde tutunması prensibine göre birbirlerinden ayrıldıkları kromatografi olarak adlandırılır ve ilk keşfedilen kromatografi çeşididir. Çözücü ve katı sabit fazın polarlıkları bir kolon boyunca veya bir yüzey boyunca çözünen maddenin hareketinin hızını tayin eder. Adsorpsiyon kromatografisinde çoğunlukla sabit faz olarak silikajel kullanılır. Silika yüzeyindeki silanol grupları ile kopolimer molekülleri üzerinde uygun gruplar arasındaki hidrojen bağları, adsorpsiyon için ana mekanizmadır (62,81).

4.11.1.2. Dağılma Kromatografisi

Bir faz sistemi (birbirleri ile karışmayan iki sıvı karışımı) içine konulan madde bu sıvılardaki çözünürlüğüne bağlı olarak iki faz arasında dağılır ve dengeye ulaşır. Böyle bir sistemde maddenin iki faz arasındaki dağılımı sabit olup bu da dağılım (partisyon) katsayısı (K_d) ile ifade edilir.

$$K_d = C_1/C_2$$

C1= Maddenin 1. fazdaki derişimi

C2= Maddenin 2. fazdaki derişimi

Adsorpsiyon kromatografisinde, maddelerin etkileşimi katı sabit faz ile sıvı hareketli faz arasındadır. Dağılma kromatografisinde maddeler sıvı olan sabit faz ile sıvı olan hareketli faz arasında dağılır (62,81).

4.11.1.3. Boyut Eleme Kromatografisi

Polimerlerin molekül ağırlığı dağılımlarını belirlemenin en popüler ve kullanışlı yöntemi boyut eleme kromatografisi'dir. "Jel geçirme kromatografisi" veya "jel filtrasyon" ismi, terimleri de kullanılır. Bu teknikte sabit faz ile entalpik etkileşimler yerine, moleküler hidrodinamik hacim veya boyut temelinde ayırım sağlanır. Boyut eleme kromatografisi kolonundan önce yüksek molekül ağırlıklı maddeler daha sonra da düşük molekül ağırlıklı maddeler ayrılır (62,81).

4.11.1.4. İyon Değişim Kromatografisi

Çözücü yüzeyi üzerindeki yükler tamponun iyonik gücünün düşük olması koşuluyla, bir kromatografi matrisine eklenen karşı yüklerle çekilir. Bu etkileşim, iyon değişim kromatografisinde (IEC) temel olgudur. Maddelerin iyonik grupları ile iyon değiştiricilerdeki iyonik grupların karşılıklı yer değiştirme esasına dayanır (81).

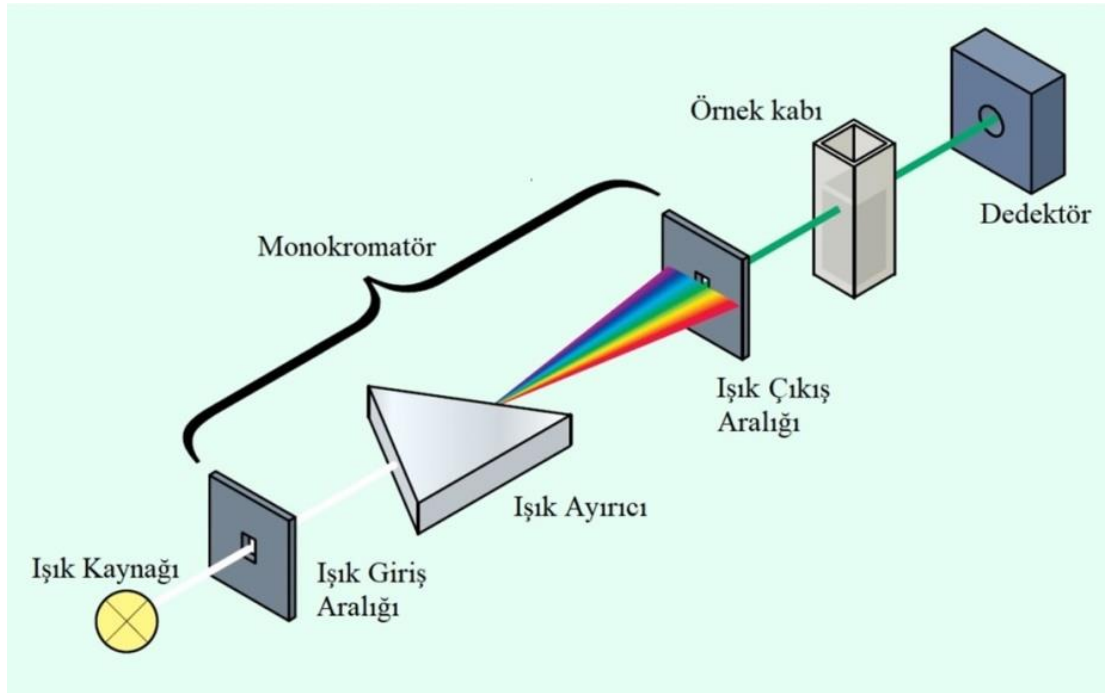
4.12. HPLC Dedektörleri

4.12.1. Ultraviyole-Görünür (UV-Vis) Bölge Spektrofotometresi

Ultraviyole görünür (UV-Vis) ışınım elektromanyetik spektrumun yalnızca küçük bir bölümünü (yaklaşık 100-750 nm) kapsar. UV-Visible absorpsiyon spektroskopisinde dalga boyu genellikle Yunanca lambda (λ) ile gösterilir ve genellikle nanometre (nm) cinsinden belirtilir. Spektrofotometre, elektromanyetik

ışığın dalga boyunun bir fonksiyonu olarak numunenin absorbans veya geçirgenliğini ölçmek için kullanılan bir cihazdır (73,69).

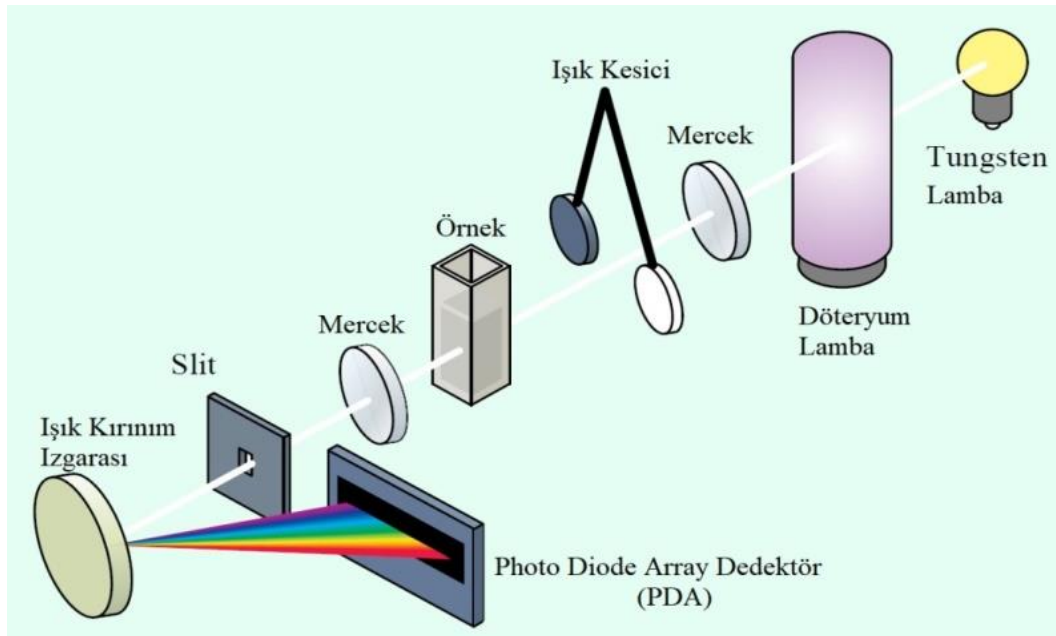
Spektrofotometre başlıca bileşenleri; ışık kaynağı, monokromatör, örnek kabı ve dedektördür (Şekil 4.12.1.1.). Ultraviyole-Görünür bölge spektrofotometreleri, 110 nm ile 1000 nm arasında değişen dalga boylarında çalışırlar. Spektrofotometrelerde kullanılan elektromanyetik ışık kaynakları döteryum ve tungsten lambalardır. 180-400 nm aralığında ışık üretmek için döteryum lamba, 400-800 nm arasında ışık üretmek için tungsten lamba kullanılır. Sıvı numunelerin absorbanslarının ölçülmesinde 200-320 nm dalga boyu aralığında kuartz, 320-700 nm aralığında cam küvetler kullanılır. Örneğin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için, ışık kaynağından gelen ışığın şiddeti dedektör ile ölçülür. UV ve görünür bölgede fotovoltaik veya fotoiletken dedektörler, fototüpler ve fotoçoğaltıcı tüpler dedektör olarak kullanılmaktadır. Spektrofotometrelerde bu ana bileşenlerden başka ışığı toplamak, yansıtmak, bölmek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüleri de kullanılır (72).



Şekil 4.12.1.1. Geleneksel bir spektrofotometre cihazının şematik gösterimi

Kaynaktan gelen polikromatik ışık, seçici olarak dar bir ışık bandı ileten bir monokromatörün giriş yarığına odaklanır. Bu ışık daha sonra numune alanından detektöre ulaşır. Bir numunenin absorpsiyon derecesi, numune olmadan (kör) detektöre ulaşan ışığın şiddetinin ölçülmesi ve numuneden geçtikten sonra detektöre ulaşan ışık yoğunluğuyla karşılaştırılması ile tespit edilir. Günümüzde birçok spektrofotometre, bir döteryum lambası ve bir tungsten lamba içerir ve fotoçoğaltıcı tüpler ya da Photo Diod Array (PDA) dedektörler kullanır (83).

PDA spektrofotometrenin şematik bir diyagramını Şekil 4.12.1.2. göstermektedir. Bir kaynaktan gelen polikromatik ışık, ilk önce numuneye ulaşır, burada absorbans oluşur ve iletilen ışık giriş yarığına odaklanır. Işık kırınım ızgarası, numune hücresi ve giriş yarığının arkasına yerleştirilir ve ışığı, diyet dizisine çarpan farklı dalga boylarına dağıtır. Bu diyet dizisinde her bir diyet spektrumun dar bir bandı ile ölçülür. Bir diyet tarafından tespit edilen ışığın bant genişliği, polikrometre giriş yarığının büyüklüğü ve diyodun boyutuyla ilgilidir. Gerçekleşen her diyet bir monokromatöre ait çıkış yarığıyla aynı işlevi görür (83).



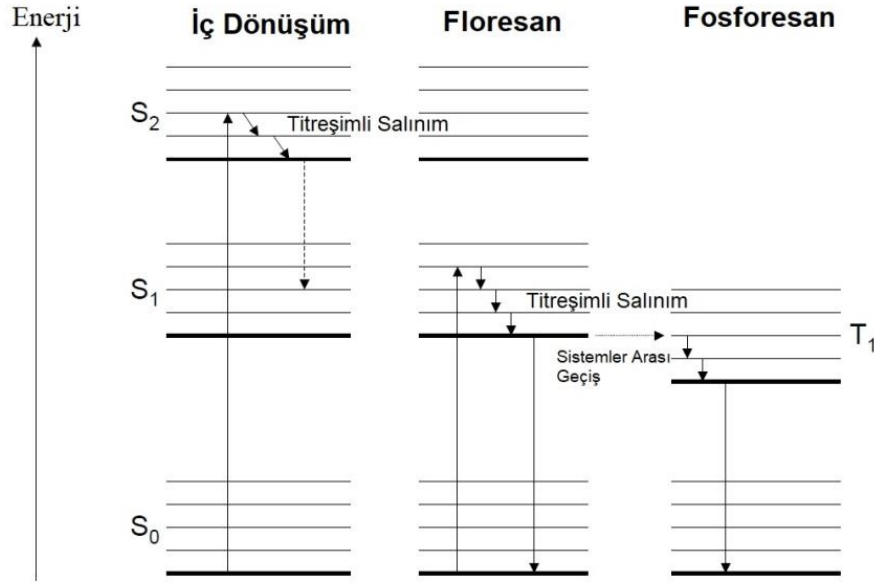
Şekil 4.12.1.2. PDA spektrometresi şematik gösterimi

Photo diod array dedektörlerin geleneksel spektrofotometreye kıyasla en büyük farkı monokromatörün bir polikromatör ile değiştirilmiş olmasıdır (72,84). Photo diod array spektrofotometrelerinin başlıca avantajları çok kısa analiz zamanı, mükemmel dalga boyu tekrarlanabilirliği ve sağlamlığıdır. Geleneksel tarama UV-Vis spektrofotometrelerinde, photo diod array spektrofotometresine kıyasla bir spektrum taramak daha uzun sürebilir, ancak daha yüksek çözünürlük ve daha düşük sinyal / gürültü oranına sahiptirler (72).

4.12.2. Floresan Spektrofotometresi

Lüminesans, optik metotlarla ilgili üç tipten oluşur: floresan spektroskopisi, fosforesan ve kemilüminesans (71). Bu üç yöntemin tümünde, analitler uyarılmış haldedir ve bu nedenle emisyon spektrumu kullanılır. Floresan ve fosforesan sırasında, uyarım fotonların absorpsiyonu yoluyla gerçekleşir. Bu nedenle bu iki yöntem sıklıkla fotolüminesans olarak adlandırılır. Kemolüminesansda, kimyasal reaksiyon sonucunda uyarılmış bir tür oluşur.

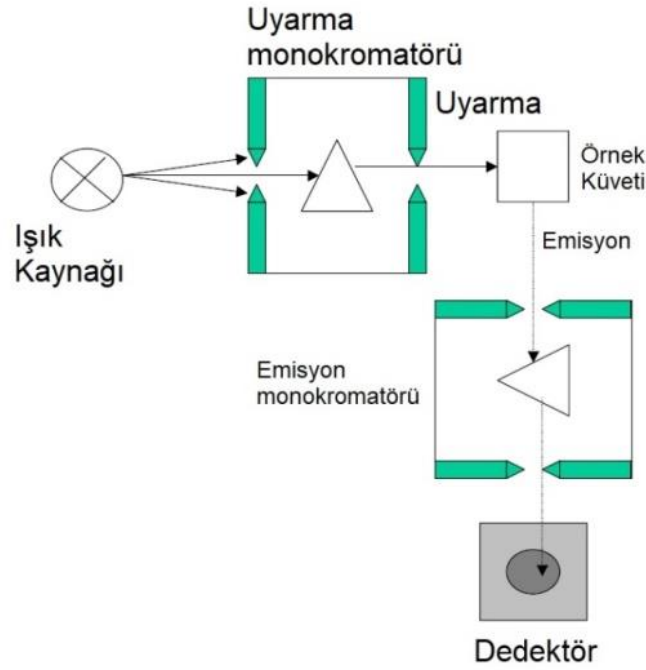
Moleküller, uygun dalga boylarındaki ışığı absorbe ederken, elektronlar daha yüksek enerji seviyelerine geçerler. Uyarılmış haldeki moleküller kararsız olduğu için bu enerjiyi çok hızlı bir şekilde geri verirler ve temel hale geri dönerler. Bu işlem sırasında bazı moleküller absorbladıkları enerjiyi fotonlar halinde serbest bırakırlar. Elektronlar uyarılmış halden temel hale dönerken meydana gelen emisyonu floresan denir. Uyarılmış halin ortalama ömrü 10^{-5} ila 10^{-8} sn. arasındadır. Işık absorbe edebilen ve bu ışığı floresan olarak tekrar yayan moleküller fluorofor olarak adlandırılır. Şekil 4.12.2.1.'de bir fotolüminesans sistem için kısmi bir enerji diyagramı gösterilmektedir. En alttaki kalın çizgiler, molekülün temel hal enerjisini temsil eder. Bu normalde bir singlet halidir ve S_0 olarak gösterilmiştir. Üstte yer alan kalın çizgiler, uyarılmış elektronik halin enerji seviyeleridir (83).



Şekil 4.12.2.1. Fotoluminesans sistem için kısmi enerji diyagramı.

Genellikle, floresan aromatik fonksiyonel gruplarda bulunur ve sabit yapılara sahip moleküllerde özellikle tercih edilir. Alifatik karbonil yapıları veya yüksek düzeyde konjuge çift bağ sistemlerinde aromatik bileşiklerden daha az görülsede floresan gösterebilir. Belirli bir bileşiğin floresan özellik gösterip göstermediğine dair kesin cevaba, bir bileşiğin yapısına bakarak ulaşmak zor olabileceği için, bileşik bir floresan spektrofotometresi üzerinde analiz edilerek en kolay şekilde araştırılabilir (72).

Floresan ölçüm aletleri, UV-Vis spektrofotometreleriyle aynı temel bileşenleri; yani bir elektromanyetik ışık kaynağı, bir dalga boyu seçici, bir örnek hücresi, bir başka dalga boyu seçici ve bir detektör içerir. Bununla birlikte bir UV-Vis spektrofotometrenin aksine, bir tane uyarılma için ve bir tane emisyon için iki dalga boyu seçici ya da dağıtma aygıtı gerekir. Dağılım, filtrelerle veya monokromatörlerle sağlanabilir. Filtre kullanan aletlere genellikle florometreler denirken, monokromatörlü aletlere spektrofluorometreler veya floresan spektrofotometreleri denir. Çünkü hem uyarılma hem de emisyon spektrumu sağlarlar. Bir floresan spektrofotometresinin temel bileşenleri Şekil 4.12.2.2.'de gösterilmiştir (72,83).



Şekil 4.12.2.2. Bir floresan spektrofotometrenin şematik çizimi

4.13. Analitik Metot Validasyonu

Bir analitik yöntemin validasyonu; geliştirilmiş metotun tüm yöntem performans parametrelerinin amaçlanan kullanımı için kabul edilebilir olduğunu kanıtlama süreci olarak tanımlanır (85) .

Analitik ölçümlerin amacı güvenilir, tutarlı ve doğru verilerin elde edilmesidir. Bu amaca ulaşmada onaylanmış valide analiz yöntemleri önemli bir rol oynar. Yöntem doğrulamasından elde edilen sonuçlar, analitik sonuçların kalitesini, güvenilirliğini ve tutarlılığını iyi analitik uygulamaların ayrılmaz bir parçası olarak değerlendirmek için kullanılabilir (86) .

Biyoanalitik metot validasyonunun asıl amacı, kan, serum, plazma, idrar veya tükürük gibi belirli bir biyolojik matriste analit konsantrasyonunun belirlenmesi için belirli bir yöntemin güvenilirliğini göstermektir (27).

Analitik metot validasyonunun asıl hedefi, metodun planlanan amaca uygunluğunun gösterilmesidir. Metot validasyonu, kullanılan yöntemin

güvenilirliğinin ve doğruluğunun kullanılan kalibre cihazlardan elde edilen verilerle desteklenmesi (kanıtlanması) anlamına gelir. Valide edilmiş analitik metotlar; kalibrasyonu rutin olarak yapılan cihazlar ve diğer gereçlerle gerçekleştirildiğinde daima aynı sonucu vermelidir. Geliştirilen metot bu tür değişimlerden etkilenmemeli, dayanıklı ve tekrarlanabilir olmalıdır (24).

4.14. İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP) Kavramı

Klinik dışı veya klinik araştırmaların veri dokümantasyonu, yeni ilaç uygulamalarının veya biyolojik lisans başvurularının desteklenmesi için çok önemlidir ve GLP, FDA yönergeleri ve Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) yönergeleri gibi farklı yönergelere dayanılarak açıklanmıştır (87).

GLP'nin resmi ve düzenleyici kavramı, yeni ilaç uygulamaları bağlamında FDA'ya gönderilen klinik olmayan güvenlik verilerinin geçerliliği hakkındaki endişeler nedeniyle 1970'lerde ABD'den gelmiştir. Bu eksiklikler, ABD Kongresinde Kennedy-Duyurularıyla kamuoyuna açıklanmıştır ve FDA'nın Haziran 1979'da Nihai Kurulun kurulmasıyla birlikte 1976'da GLP'ye ilişkin Önerilen Düzenlemeler (21 CFR 58) yayımlanmıştır (88).

1979 ve 1980 yıllarında Kimyasalların Kontrolü Özel Programı çerçevesinde kurulmuş uluslararası uzman bir grup, çeşitli ulusal ve uluslararası kaynaklardan gelen ortak idari ve bilimsel uygulamaları ve tecrübeleri kullanarak " OECD İyi Laboratuvar Uygulamalarının İlkeleri" (GLP) 'yi geliştirdi. Kimyasalların Değerlendirilmesindeki Verilerin Karşılıklı Kabul Edilmesine İlişkin Konsey Kararı'na ek olarak GLP'nin bu İlkeleri, 1981'de OECD Konseyi tarafından kabul edildi [C(81)30(Final)] (89). 1995 ve 1996'da İlkeleri revize etmek ve güncellemek için yeniden uzman bir grup kuruldu. Güncel belge, o grubun ulaştığı fikir birliğinin bir sonucudur (89).

GLP laboratuvarlar ve araştırma organizasyonları için; klinik dışı sağlık ve çevre güvenliği çalışmalarının planlandığı, gerçekleştirildiği, izlendiği, kaydedildiği, arşivlendiği ve bildirildiği organizasyonel süreç ve koşullarla ilgili bir kalite sistemidir (89). Bu da, örnek toplamadan veri işleme ve klinik dışı bir çalışma için

raporlamaya kadar tüm analitik prosedürler için iyi bir dokümantasyon ve iyi bir iş gücü anlamına gelir (87).

GLP'nin amacı, kalite test verilerinin geliştirilmesini teşvik etmektir. Karşılaştırılabilir test verilerinin kalitesi, ülkeler arasında verilerin karşılıklı olarak kabul edilmesinin temelini oluşturur (89).

4.15. Analitik Metot Validasyonu İle İlgili Kılavuzlar

Analitik metot validasyonu gerçekleştirebilmek için uygulanması gereken dokümantasyon ve kayıt yöntemleri Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)'nin Good Laboratory Practise (GLP) el kitabında, validasyon parametreleri International Conference On Harmonisation (ICH)'in Analitik Prosedürlerin Validasyonu: Metin ve Metodoloji Q2 (R1), Food and Drug Administration (FDA)'in Endüstri İçin Biyoanalitik Yöntem Validasyonu ve European Medicines Agency (EMA)'nın Biyoanalitik Yöntem Validasyonu kılavuzlarında belirtilmiştir (27,26,89,90).

4.15.1. EMA Biyoanalitik Yöntem Validasyonu Kılavuzları

EMA tarafından Kasım 2009 yılında biyoanalitik yöntem doğrulamasına yönelik bir taslak kılavuz yayımlandı (91). Mayıs 2010 tarihine kadar görüş ve öneriler toplandı. Yayımlanan kılavuz Haziran 2011 tarihinde farmakokinetik grubu tarafından kabul edilerek Şubat 2012 tarihinde yürürlüğe girdi (27).

Bu kılavuz, hayvan toksikokinetik çalışmalarında elde edilen biyolojik matrislerdeki ilaç konsantrasyonlarının ölçülmesi için uygulanan biyoanalitik yöntemlerin ve klinik araştırmaların tüm evrelerinin validasyonu için öneriler sunmaktadır (27).

EMA kılavuzunda biyolojik sıvıların analitik metot validasyonu için uygulanması gereken parametreler şu şekildedir (27).

- Seçicilik (Selectivity)

- Carry-Over (Taşıma)
- Miktar Tayini Alt Sınırı (Lower Limit Of Quantification)
- Kalibrasyon Eğrisi (Calibration Curve)
- Doğruluk (Accuracy)
- Hassaslık/Keskinlik (Precision)
- Seyreltme Bütünlüğü (Dilution Integrity)
- Matris Etkisi (Matrix Effect)
- Stabilite (Stability)

4.15.2. FDA Biyoanalitik Yöntem Validasyonu İle İlgili Yayınlanan Kılavuzlar

FDA, insan klinik farmakolojisinde kullanılan biyoanalitik yöntem doğrulama bilgilerinin geliştirilmesinde, araştırılan yeni ilaç uygulamaları (IND'ler), yeni ilaç uygulamaları (NDA'lar), kısaltılmış yeni ilaç uygulamaları (VEA'lar), biyoyararlanım (BA), biyolojik lisans başvuruları (BLA'lar) ve farmakokinetik (PK) veya biyobelirteç konsantrasyonunun değerlendirilmesini gerektiren biyoeşdeğerlik (BE) çalışmalarında finansörlere destek olmaktadır (26).

Bu rehber ilk olarak Aralık 1990 yılında yapılan Analitik Metot Validasyonu: Biyoyararlanım, Biyoeşdeğerlik ve Farmakokinetik çalışmalar ve Ocak 2000 yılında yapılan Biyoanalitik Yöntemlerin Doğrulanması: Bir on yılın ardından gözden geçirme, olmak üzere iki workshop çalışmasının ardından yapılan görüşmelere dayanılarak geliştirildi ve Mayıs 2001'de yayımlandı (26). Kılavuzun Mayıs 2001'de yayımlanmasından bu yana, güncel versiyonların gözden geçirmelerine rehberlik etmesine yardımcı olan, Nicel Biyoanalitik Yöntemlerin Doğrulanması ve Uygulanması: Kromatografik ve Ligand Bağlama Testleri için En İyi Uygulamalar (1-3 Mayıs 2006) ve Hasar Gören Numune Reanalizine İlişkin (AAPS / FDA) (Şubat 2008) workshop çalışmaları yapılmıştır (92). İlk olarak 2001 yılında yayımlanan bu rehber, biyoanalitik yöntemlerin validasyonu ile ilgili bilim ve teknolojiye ilerlemeleri yansıtacak şekilde revize edilmiştir. Kılavuz, sonuçların kesinleşmeden

önce halka açık olarak incelenmesini ve yorumlanmasını sağlamak için taslak halinde 2013 yılından bu yana yeniden yayımlanmaktadır (92).

Bu rehber, biyoanalitik yöntem geçerliliği için genel tavsiyeler sunmaktadır. Uygulanabilecek analizler kullanılan analitik yöntemin spesifik türüne bağlı olarak değiştirilebilir ancak temel parametreler şunlardır (26).

- Seçicilik (Selectivity)
- Doğruluk (Accuracy)
- Hassaslık/Kesinlik (Precision)
- Hassasiyet (Sensitivity)
- Tekrarlanabilirlik (Reproducibility)
- Miktar Tayini Alt Sınırı (Lower Limit Of Quantification)
- Stabilitate (Stability)

4.15.3. ICH Kılavuzu Analitik Prosedürlerin Validasyon Parametreleri

ICH; Avrupa Komisyonu (EC), Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de kayıt başvurularının bir parçası olarak sunulan analitik prosedürlerin doğrulanması sırasında dikkate alınması gereken özellikleri tartışmaktadır. ICH'te yer alan terim ve tanımların amacı, EC, Japonya ve ABD'nin çeşitli yönergeleri ve düzenleyicileri arasında sıklıkla var olan farklılıkları gidermektir (90).

ICH dokümanında sunulan uygulanması gereken doğrulama kriterleri aşağıda listelenmiştir (90).

- Accuracy (Doğruluk)
- Precision (Kesinlik)
- Repeatability (Tekrarlanabilirlik)
- Intermediate Precision (Ara kesinlik)
- Specificity (Özgünlük)
- Tespit Limiti (Limit of Dedection)
- Tayin Limiti (Limit Of Quantification)
- Linearity (Doğrusallık)

- Range (Ölçüm Aralığı)

ICH, FDA ve EMA biyolojik sıvıların analitik metod validasyonu için kılavuzlarda istenen parametreleri Tablo 4.15.3.1.'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir (27,26,90).

Tablo 4.15.3.1. ICH, FDA, EMA kılavuzları validasyon parametreleri

Validasyon Parametreleri	Kılavuz
Özgünlük (Specifity)/Seçicilik(Selectivity)	ICH, FDA, EMA
Taşıma (Carry-Over)	EMA
Doğruluk (Accuracy)	ICH, FDA, EMA
Seyreltme bütünlüğü (Dilution integrity)	EMA
Matris etkisi (Matrix effect)	EMA
Kesinlik (Precision)	ICH, FDA, EMA
Tekrarlanabilirlik(Repeatability)	ICH
Ara Kesinlik (Intermediate Presicion)	ICH
Yinelenebilirlik (Reproducibility)	ICH
Tespit Limiti (Limit of Dedection)	ICH
Tayin Limiti (Limit Of Quantification)	ICH, FDA, EMA
Doğrusallık (Linearity)	ICH, FDA, EMA
Ölçüm Aralığı (Range)	ICH, EMA
Sağlamlık (Robustness)	ICH, FDA
Stabilite (Stability)	FDA, EMA
Geri Kazanım(Recovery)	FDA

4.16. Analitik Metot Validasyon Parametreleri

Poliamin metot validasyonunda kullanılacak yöntem FDA ve EMA belgesinde yer alan; seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, gün içi ve günler arası

tekrarlanabilirlik, geri kazanım, miktar tayini alt sınırı(LLOQ) ve stabilite parametrelerine ilişkin yönergelere göre doğrulanmıştır.

4.16.1. Seçicilik (Selectivity)

Seçicilik, numunedeki diğer bileşenlerin varlığında bir analitik yöntemin analiti ayırt etme ve niceleştirme yeteneğidir. Seçicilik için, uygun biyolojik matristeki (plazma, idrar veya diğer matris) boş örneklerin analizi en az altı kaynaktan alınmalıdır. Her bir boş numunenin girişime karşı test edilmesi ve miktar sınırlamasının alt sınırında (LLOQ) seçicilik sağlanması gerekir. Biyolojik bir matristeki potansiyel engelleyici maddeler arasında endojen matriks bileşenleri, metabolitler, bozunma ürünleri ve gerçek araştırmada eşlik eden ilaçlar ve diğer eksojen ksenobiyotikler bulunur. Bu yöntem, birden fazla analitin miktarını belirtmek için tasarlanmışsa, her bir analit, girişime neden olmadığından emin olmak için test edilmelidir. Seçicilik parametresinin sağlanması genellikle bütün analitik yöntem validasyonlarında önemlidir ve uygulanmalıdır. HPLC çalışmalarında seçicilik parametresi için uygunluk, tayin edilmek istenen bütün bileşenlerin ayrı alıkonma zamanına sahip olması ve uygun kapasite faktörlerinin sağlanması ile geçerli olur (26).

4.16.2. Kalibrasyon / Standart Eğri (Doğrusallık Aralığı)

Bir kalibrasyon (standart) eğrisi, alet tepkisi ve analitin bilinen konsantrasyonları arasındaki ilişkidir. Numunedeki her analit için bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmalıdır. Konsantrasyon ve cevap arasındaki ilişkiyi yeterince tanımlamak için yeterli sayıda standart kullanılmalıdır. Analizin bilinen konsantrasyonları ile matrisi toplayarak, amaçlanan çalışmada numunelerle aynı biyolojik matriste bir kalibrasyon eğrisi hazırlanmalıdır. Bir kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan standartların sayısı, beklenen analitik değer aralığının ve analit/tepki ilişkisinin doğasının bir fonksiyonudur. Standartların konsantrasyonları, belirli bir çalışmada beklenen konsantrasyon aralığına göre seçilmelidir. Bir kalibrasyon eğrisi, kör numuneyi (iç standart olmadan hazırlanmış matris numunesi), sıfır numuneyi (iç standart içeren matris numuneyi) ve LLOQ'da dâhil olmak üzere

beklenen aralığı kapsayan altı ila sekiz sıfır dışındaki değerden oluşmalıdır (26). Doğrusallık grafiğinden elde edilen korelasyon katsayısı (r^2) değeri en az 0.98 olmalıdır (93).

4.16.3. Analitik Bir Yöntemin Doğruluğu (Accuracy) / Kesinliği (Precision)

Analitik bir yöntemin doğruluğu (Accuracy); yöntem tarafından analitin gerçek değerine (konsantrasyon) elde edilen ortalama test sonuçlarının yakınlığını tanımlar. Doğruluk, analitin bilinen miktarlarını içeren numunelerin tekrarlanan analizi ile tespit edilir. Doğruluk, konsantrasyon başına en az beş belirleme kullanılarak ölçülmelidir. Beklenen konsantrasyonlarda minimum üç konsantrasyon önerilir. Ortalama değer, Lower Limit of Quantification (LLOQ) haricinde gerçek değer \pm %15'i aralığında olmalıdır. Ölçülebilen en düşük değer dahil edildiğinde % 20'den fazla farklılık göstermemelidir. Ortalama değer gerçek değerden sapması doğruluk ölçütü olarak kullanılır (26).

Analitik bir yöntemin hassasiyeti/kesinliği; prosedür tek bir homojen biyolojik matris hacminin birden fazla alikotuna tekrar tekrar uygulandığında, bir analitin bireysel ölçümlerinin yakınlığını tanımlar. Hassasiyet, konsantrasyon başına minimum beş tayin kullanılarak ölçülmelidir. Beklenen konsantrasyonlarda minimum üç konsantrasyon önerilir. Her bir konsantrasyon seviyesinde belirlenen hassaslık, değişim katsayısının (CV) %15'ini, LLOQ dahil edildiğinde ise %20'sini geçmemelidir (26).

4.16.4. Bir Analitin Bir Analizde Geri Kazanımı (Recovery)

Saf standardın gerçek konsantrasyonu için elde edilen dedektör tepkisine kıyasla biyolojik matriste eklenen ve biyolojik matristen ekstrakte edilen analitin bir miktarından elde edilen dedektör tepkisidir. Geri kazanım, değişkenlik sınırları dâhilindeki bir analitik yöntemin ekstraksiyon verimliliğine ilişkindir. Analitin geri kazanımının % 100 olması istenmekle beraber bir analitin ve dâhili standardın geri kazanım derecesi tutarlı, kesin ve tekrarlanabilir olmalıdır. Geri kazanım deneyleri,

üç konsantrasyonda (düşük, orta ve yüksek) elde edilen numuneler için analitik sonuçları % 100 geri kazanımı temsil eden ayrıştırılmamış standartlarla karşılaştırarak gerçekleştirilmelidir (26).

4.16.5. Miktar Tayini Alt Sınırı (LLOQ)

Uygun doğruluk ve kesinlik sınırları içerisinde kantitatif olarak tespit edilebilen numunedeki en düşük analit miktarı LLOQ değeri olarak tanımlanır. Kromatografik ölçümlerde pratik bir kural olarak sinyal/gürültü (S/N) oranından faydalanılır. Aşağıdaki koşullar sağlanırsa, kalibrasyon eğrisindeki miktar tayini alt sınırı olarak kabul edilmelidir:

LLOQ'daki analit yanıtı, kör yanıtına kıyasla yanıtın en az 5 katı olmalıdır. Analit piki (tepki) % 20 hassasiyet ve % 80-120 doğrulukla tanımlanabilir, ayrık ve tekrarlanabilir olmalıdır (26).

Kalibrasyon Eğrisi / Standart Eğrisi/ Konsantrasyon-Tepki

Konsantrasyon-tepki ilişkisini yeterince açıklayan en basit model kullanılmalıdır. Bir kalibrasyon eğrisinin geliştirilmesinde aşağıdaki koşullar yerine getirilmelidir:

- Nominal konsantrasyondan LLOQ'un % 20 sapması
- Nominal konsantrasyondan LLOQ dışındaki standartların % 15 sapması

Sıfır olmayan altı standarttan en az dörtü LLOQ ve en yüksek konsantrasyonda kalibrasyon standardı da dâhil olmak üzere yukarıdaki ölçütleri karşılamalıdır. Sapma standartları hariç tutmak kullanılan modeli değiştirmemelidir (26).

4.16.6. Stabilite

Biyolojik bir sıvının stabilitesi, saklama koşullarının, etkenin ve matrisin kimyasal özelliklerinin bir fonksiyonudur. Stabilitenin değerlendirilmesi, numune

hazırlama ve numune analizi sırasında uygulanan her adımın yanı sıra kullanılan saklama koşullarının analit konsantrasyonunu etkilememesini sağlamak için gerçekleştirilmelidir. Analitik yöntemdeki her basamak için stabilite sağlanmalıdır. Yani; numune matrisi, antikoagülan, ambalaj malzemeleri, saklama ve analitik koşullar gibi kararlılık testlerine uygulanan koşulların, gerçek çalışma örnekleri için kullanılanlara benzer olması gerekir (26). Başlangıç değerinden değişimin %10'dan daha küçük olduğu noktaya kadar çözelti stabildir (23,25).

4.16.6.1. Donma ve Çözme Stabilitesi

Analit stabilitesi, üç dondurma ve çözme döngüsünden sonra belirlenmelidir. Düşük ve yüksek konsantrasyonların her birinde en az üç numune, 24 saat -20 °C'de saklama sıcaklığında bekletilmeli ve oda sıcaklığında müdahale edilmeden kendiliğinden çözülmelidir. Örnekler tamamen çözüldüğünde, numuneler aynı koşullar altında 12 ila 24 saat boyunca yeniden dondurulmalıdır. Dondurma-çözme döngüsü iki kez daha tekrar edilmelidir, Daha sonra üçüncü günde analiz edilmelidir. Bir analit istenen saklama sıcaklığında dengesiz ise, stabilite numunesi, üç dondurma ve çözme işlemi sırasında -70° C'de dondurulmalıdır (26).

4.16.6.2. Kısa Süreli Sıcaklık Stabilitesi

Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda ki her bir analitin üç alikotu oda sıcaklığında çözülmeli ve bu sıcaklıkta (bu numunelerin, yapılan çalışmada oda sıcaklığında bekletileceği tahmini süreden yola çıkılarak) 4 ila 24 saat tutulmalı ve analiz edilmelidir (26).

4.16.6.3. Uzun Süreli Stabilite

Uzun süreli stabilite, çalışma örnekleri ile aynı koşullar altında saklanan en az üçer düşük ve yüksek konsantrasyonda analit ile belirlenmelidir. Örnek hacmi, üç ayrı analiz için yeterli olmalıdır. Tüm stabilite örneklerinin konsantrasyonları, uzun

vadeli stabilite çalışmasının ilk gününden itibaren uygun konsantrasyonlardaki standartlar için geri-hesaplanan değerlerin ortalaması ile karşılaştırılmalıdır (26).

4.16.6.4. Stok Çözelti Stabilitesi

İlaç ve iç standart stok solüsyonlarının stabilitesi oda sıcaklığında en az 6 saat süreyle değerlendirilmelidir. Stok solüsyonları ilgili periyoda kadar soğutulur veya dondurulursa, bu süre kaydedilmelidir. Hedeflenen saklama süresinin tamamlanmasından sonra, cihazın yanıtını yeni hazırlanmış solüsyonlarla karşılaştırarak stabilite test edilmelidir (26).

4.16.6.5. Hazırlama Sonrası Stabilitesi (Oto Örnekleyici Stabilitesi)

Oto örnekleyicideki bekleme süresi de dâhil olmak üzere, enjeksiyona hazır numunelerin stabilitesi belirlenmelidir. Etken ve iç standart stabilitesi, validasyon numunelerinde tahmin edilen çalışma süresince aynı koşullar altında orijinal kalibrasyon standardındaki konsantrasyonlara göre değerlendirilmelidir (26).

4.16.7. Sağlamlık

Sağlamlık değerlendirmesi çalışma prosedürüne bağlı olarak genellikle metot geliştirme safhasında dikkate alınır. Sağlamlık, metot parametrelerindeki bilinen değişkenlere göre analizin güvenilirliğini gösterir.

Analitik koşullardaki ölçümler çeşitli değişkenlere duyarlıysa, analitik şartlar uygun bir biçimde kontrol edilerek prosedürde önlemler belirtilmelidir. Sağlamlığın değerlendirilmesinin tek amacı sistem uygunluk kriterlerinin incelenerek analitik yöntemin her çalışmada valide olduğunun gösterilmesidir. Uygulanabilecek tipik değişkenlik yöntemleri analitik çözeltilerin stabilitesi ve ekstraksiyon süreleridir. Sıvı kromatografide ise tipik değişkenlik örnekleri hareketli fazın bileşimi, hareketli fazın pH etkisi, kolon sıcaklık değişimi, dalga boyu değişimi, ısı ve akış hızıdır (26).

5. MATERİYAL ve METOT

5.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik Özellikleri

Bu çalışmada Medipol Üniversitesi Mega Hastanesi Laboratuvarı'na sağlık kontrolü için gelen sağlıklı bireyler bilgilendirilerek gönüllü onam formu ile bireyin onayı alındıktan sonra rutin tetkik olarak alınan kanlarından elde edilen serumlar kullanıldı. Dışlama kriterleri göz önüne alınarak seçilen bireylerden 40 sağlıklı kontrol serumu alındı. Elde edilen sağlıklı bireylerin serumları Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER) Proteomik laboratuvarında aşağıda belirtilen yöntemlerle incelendi.

Çalışmada dışlama kriterleri, 18 yaşından küçük, 40 yaşından büyük olmak, sigara ve alkol kullanmıyor olmak, böbrek fonksiyon bozuklukları, hipertansiyon, kalp hastalığı, osteoartroz, kanser, polikistik over hastalığı, enflamatuvar ve enfeksiyöz hastalıkları olmayan ve boy kitle indeksi sağlıklı bir bireye uygun olan bireyler olarak belirlendi.

5.2. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması

40 adet sağlıklı kontrol grubundan 12 saatlik açlık sonrasında vakumlu jelli tüpe 10 ml kan alındı ve oda sıcaklığında 30 dk. pıhtılaşmaya bırakıldı. Pıhtılaşma işleminin ardından tüpler oda sıcaklığında 1200 g'de 15 dk. santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Aynı gün çalışılmayan diğer testler için serumlar eppendorf tüplerine alınarak -80° C'de çalışma gününe kadar saklandı.

5.3. Kan Örneklerinde İncelenen Parametreler ve Yöntemleri

Kan örneklerinde biyolojik amin düzeyleri (putresin, spermidin ve spermin) HPLC metodu ile REMER laboratuvarında çalışıldı. Toplanan 40 adet serum örneğinden serum havuzu yapılarak EMA ve FDA validasyon kılavuzlarında belirtilen; seçicilik, kalibrasyon/standart eğrisi, doğruluk, kesinlik, gün içi ve günler

arası tekrarlanabilirlik, geri kazanım, miktar tayini alt sınırı (LLOQ) ve stabilite parametrelerine göre valide edilmiştir.

5.4. Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar

5.4.1. Enstrumental Kısım

Tablo 5.4.1.1. HPLC metodu için kullanılan ekipmanlar

Cihaz Adı	Ekipman Türü	Marka	Model	Cihaz Seri No.
Waters Alliance 2695 HPLC	Auto Sampler	Waters	Alliance 2695	L13SM4013A
	FLR Dedektör	Waters	Alliance 2475	E15475562G
Vortex	Vortex	BioSan	V-1 Plus	010203-1406-1595
Santrifüj	Santrifüj	Biocen	22R	140155-04
Sonikatör	Ultrasonik Banyo	Bandelin-Sonorex	RK510	32700082897010
Hotplate Stirrer	Manyetik Karıştırıcı	Benchmark	H4000-HSE	BPX000613320
Hassas terazi	Terazi	Shimadzu	ATX224	D310030094
Buzdolabı	Buzdolabı	Siemens	-	-
(-80 °C) soğutucu	Buzdolabı	Arctiko	-	-
Mikro pipet	Mikro pipet 20-200 µl	Gilson Pipetman	-	-
Mikro pipet	Mikro pipet 100-1000 µl	Gilson Pipetman	-	-
Mikro pipet	Mikro pipet 0.2-2 µl	Gilson Pipetman	-	-
Mikro pipet	Mikro pipet 1-10 µl	Gilson Pipetman	-	-

5.4.2. Kolonlar

Tablo 5.4.2.1. HPLC metodu için kullanılan kolonlar

Kolon Türü	Marka	Katalog No	Seri No	Kolon Özellikleri
Analitik Kolon	Waters	WAT086344	11833519713809	Nova-Pak C18 3.9mm*150mm*4µm

5.4.3. Kimyasallar

Tablo 5.4.3.1. HPLC metodu için kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Marka	Katalog No	Lot No
Sodyum Asetat Trihidrat	Merck	1.06267.1000	AM0778167603
Hidroklorik Asit Fuming %37	Merck	1.00317.2501	K47066817541
Metanol	Sigma-Aldrich	34885-2.5L-R	STBF3849V
Tetrahidrofur	Sigma-Aldrich	34865-2L	STBG0208V
Asetonitril	Merck	1.00029.2500	I832229621
Perklorik Asit	Sigma-Aldrich	30755-2.5L	SZBF1140V
Potasyum Karbonat	Merck	1.04928.1000	A0928728546
Benzoik Asit	Sigma-Aldrich	242381-500G	MKBV5544V
Potasyum Tetraborat Tetrahidrat	Sigma-Aldrich	P5754-500G	SLBK9286V
Sodyum Tetraborat Dekahidrat	Merck	1.06303.1000	AM0932103606
O-Fitalaldehit	Sigma-Aldrich	P0657-5G	BCBR6527V
N-asetil-L-sistein	Sigma-Aldrich	A7250-5G	WXBC0011V
Brij-35 Solüsyonu (Brij-L23)	Sigma-Aldrich	B4184-100ML	SLBN9603V
Putresin-2HCl	Sigma-Aldrich	P7505-25G	BCBR1640V
Spermidin-3HCl	Sigma-Aldrich	85578-1G	BCBJ3890V
Spermin-4HCl	Sigma-Aldrich	85605-1G	BCBP0592V

5.5. Sistem Kurulumu

Sırasıyla; bilgisayar, Waters Alliance e2695 oto örnekleyici, kolon fırını ve Waters Alliance 2475 FLR dedektör açıldı. Yaklaşık 10 dk. sistemin bağlantıları kurması ve sistem doğrulamalarının yapılması beklenerek sistem açılışı tamamlandı. Tüm hareketli faz, pompa seal yıkama, iğne yıkama hatları %100 taze alınmış deiyonize suya konuldu. Tüm hatlardan hava kabarcıkları ve bir önceki analizden kalan tuz, solvent vb. kalıntıların uzaklaştırılması, dedektörün temizlenmesi, kolon ve numune sıcaklıklarının istenilen değere getirilmesi amacıyla oto örnekleyici üzerinden sistem hazırlık (System prep) programı uygulandı. Bu işlem uygulanırken kolon hattına ara bağlantı takıldı. Sistem hazırlık programı aşamasında sistemin şartlanması amacıyla kolon sıcaklığı 25°C ve numune sıcaklığı 4°C'ye ayarlandı. Sistem hazırlık programı bittikten sonra ara bağlantı kolon hattından sökülerek kolon takıldı. Solven A hattına hareketli faz A, solvent B hattına hareketli faz B, solvent C hattına kolon yıkama ve şartlama amacıyla %100 taze deiyonize su, solvent D hattına %100 metanol, pompa seal yıkama hattına %70 su-%30 metanol karışımı, iğnenin yıkama hattına %70 metanol-%30 su karışımı konuldu. Hatların tamamen içerisinde bulunduğu solvent ile dolarak sistemin şartlanma süresini hızlandırmak amacıyla tüm hatları 2 dk. boyunca oto örnekleyici üzerinden wet prime işlemi ile 10 dk./ml akış olacak şekilde yıkandı.

HPLC sisteminin yıkama ve şartlama işlemlerinin ardından bilgisayardan Empover açıldı. Poliamin projesi oluşturuldu ve sistem konfigürasyonu FLR dedektör ile çalışacak şekilde ayarlandı. Ardından Poliamin projesine bağlanıldı. Poliamin projesi altında çalışılacak metot oluşturuldu. Kolonun ve dedektörün analiz parametrelerine göre şartlanabilmesi ve tüm sistemin analiz için kullanılacak hareketli fazlar ile dolması amacıyla program üzerinden "Equilibrate" tuşu yardımıyla şartlanması sağlandı. Kolon sıcaklığı 25°C ve numune sıcaklığı 4°C, FLR dedektör emisyon dalga boyu 450 nm, uyarma dalga boyu 340 nm, olacak şekilde kolonun ve dedektörün hareketli faz gradient programı ile şartlanması sağlandı. On-line pilot olarak adlandırılan anlık takip penceresinden dedektör ve kolon baseline takibi yapıldı. Kolon basıncının ideal basınç değerinde sabitlenmesi ve dedektör

baseline Y skalasının Emisyon Birimi (EU) değerinin -0.004 ila 0,004 aralığında olması sağlandı.

Her bir validasyon parametresi için numune setleri oluşturma amacıyla “Sample Set” kısmına geçilerek numune analiz setleri oluşturuldu. Her bir enjeksiyon için analiz suresi 30 dk. akış hızı 1 ml/dk., enjeksiyon hacmi 10 µl türevlendirme ozeltisi + 10 µl analit ozeltisi olacak şekilde oluşturuldu ve sample set altına kaydedildi. Her alışma öncesi analiz “Run” tuşu ile Empower 3 programı üzerinden başlatıldı.

5.6. Yöntemin Kromatografik şartları

HPLC çalışmasında, poliamin validasyonu için uygulanan kromatografik yöntem şartları Tablo 3.6.’da verilmiştir.

Tablo 5.6.1. HPLC kromatografik yöntem şartları

Parametreler	Yöntem şartları
Cihaz	Waters Alliance e2695 HPLC
Dedektör	Waters 2475 FLR dedektör
Yazılım	Empower 3
Analitik Kolon	Waters Nova-Pak C18 3.9mm*150mm*4µm
Kolon Sıcaklığı	25°C
Numune Sıcaklığı	4°C
Dalga Boyu	Emisyon: 450 nm; Uyarma: 340 nm
Enjeksiyon Hacmi	10 µl türevlendirme + 10 µl blank, standart, numune
Akış Hızı	1.0 ml/dk.
Enjeksiyon Suresi	30 dk.

Tablo 5.6.2. HPLC sistemi gradient programı

Zaman (dk.)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	95	5
20	73	27
21	30	70
25	30	70
26	95	5
30	95	5

5.7. Çözeltilerin Hazırlanması

Hareketli Faz A (0.1 M sodyum asetat; pH 7.2)

27.3 sodyum asetat trihidrat 1.8 lt deiyonize su eklenerek vorteks yardımıyla yaklaşık 10 dk. orta hızda karıştırılarak çözüldü. Bu çözeltinin üzerine 96 µl 6 N HCl, 180 ml metanol ve 10 ml tetrahidrofuran eklenerek vorteks yardımıyla yaklaşık 10 dk. orta hızda karıştırıldı. Ultrasonik banyoda 2 dk. sonike edildi.

Hareketli Faz B

%100 HPLC-grade asetonyitril kullanıldı.

6 N HCl

50.9 ml deiyonize suya 49.1 ml konsantre HCl (37-38%) yavaşça eklendi ve karıştırıldı.

1.5 M HClO₄ (Perklorik asit)

250 ml lik balon jojeye 150 ml deiyonize su ve üzerine 32.2 ml 70% HClO₄ eklendi. Yeterli miktarda karıştırıldı ve hacmine deiyonize su ile tamamlandı.

2 M K₂CO₃

250 ml lik balon jojeye 69.11 g K₂CO₃ tartıldı. Üzerine 150 ml deiyonize su eklenerek çözüldü ve hacmine deiyonize su ile tamamlandı.

1.2 % (w/v) Benzoik asit

8.4 g benzoik asit tartıldı ve 525 ml deiyonize su ile çözüldü. Üzerine deiyonize su ile hazırlanmış 175 ml doymuş $K_2B_4O_7$ (potasyum tetraborat tetrahidrat) çözeltisi eklendi.

40 nM Sodyum Borat Buffer (pH 9.5)

3.05 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ (sodyum tetrborat dekahidrat) tartıldı ve 200 ml deiyonize su ile çözüldü.

o-Fitalaldehit-N-asetil sistein (OPA-NAC) Türevlendirme Çözeltisi

50 mg OPA ve 50 mg NAC kimyasalları 20 ml lik amber renkli balon jøjeye tartıldı. Üzerine 1.25 ml metanol eklenerek çözüldü. Bu çözeltiliye 11.2 ml 40 mM sodyum borat buffer (pH 9.5) ve 0.4 ml Brij-35 solüsyonu eklendi. Yavaş ve nazik bir şekilde karıştırıldı. Çözelti amber renkli balon jøjede 4 °C'de saklandı. Çalışmadan hemen önce taze hazırlandı. (24 saat stabildir.)

100 ng/ml Poliamin Standart Çözeltisi Hazırlanması

18.3 mg putrescine-2HCl, 17.5 mg spermidine-3HCl ve 17.2 mg spermine-4HCl standartları hassas olarak 10.0 ml'lik plastik balon jøjeye tartıldı. 5 ml deiyonize su eklenerek 2 dk. boyunca vorteks yapıldı. Ardından 1 dk. soğuk ultrasonik banyoda tutuldu ve çözelti sıcaklığının laboratuvar koşullarına gelmesi beklenerek hacmine deiyonize su ile tamamlandı. Bu çözeltinin 10.0 µl'si 1.5 ml'lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine 990 µl deiyonize su eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Bu çözeltinin 10.0 µl'si 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine 940 µl deiyonize su ve 50 µl 1.2 % (w/v) benzoik asit çözeltisi eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Çözelti kullanılabildiği kadar 0-4 °C'de saklandı (21).

Numune Çözeltisi Hazırlanması

1. -80 °C'de saklanan 6 adet sağlıklı birey serumları laboratuvar koşullarında çözündürüldü ve her birinden 100 µl 1,5 ml'lik eppendorf tüpe alındı.
2. Üzerine 250 µl deiyonize su eklenerek 10 sn vorteks ile karıştırıldı.

3. Bu çözeltinin üzerine 100 µl soğuk 1.5 M HClO₄ eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı.
4. Üzerine soğuk 50 µl 2 M K₂CO₃ eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı.
5. Tüpün ağzı açılarak 20 sn boyunca gaz çıkışı sağlandı.
6. 14000 g'de ve 4 °C'de 3 dk. santrifüj edildi.
7. Süpernatant sıvınının 200 µl'si 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı.
8. Üzerine 750 µl deiyonize su ve 50 µl 1.2 % (w/v) benzoik asit çözeltisi eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı.
9. Bu çözelti HPLC vialine aktarılarak enjeksiyon yapıldı (21).

5.8. HPLC Yönteminin Geçerlilik Testleri

Bu çalışmada serum numunelerinde poliamin tayininde kullanılacak HPLC yönteminin geçerlilik testi; EMA ve FDA validasyon kılavuzlarında belirtilen; seçicilik (Selectivity), kalibrasyon/standart eğrisi (Linearity Range), doğruluk (Accuracy), kesinlik (Precision), gün içi tekrarlanabilirlik (intra-day reproducibility), günler arası tekrarlanabilirlik (inter-day reproducibility), geri kazanım (Recovery), miktar tayini alt sınırı (LLOQ) ve stabilite (stability) parametreleri esas alınarak gerçekleştirildi.

5.8.1. Seçicilik (Selectivity) Çalışması

Yöntemin seçicilik çalışmaları esnasında kullanılan çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlanmıştı.

Putresin Standart Çözeltisi Hazırlanması

18.3 mg putrescine-2HCl standardı hassas olarak 10.0 ml'lik plastik balon jöjeye tartıldı. 5 ml deiyonize su eklenerek 2 dk. boyunca vorteks yapıldı. Ardından 1 dk. soğuk ultrasonik banyoda tutuldu, çözelti sıcaklığının laboratuvar koşullarına gelmesi beklendi ve hacmine deiyonize su ile tamamlandı. Bu çözeltinin 10.0 µl'si 1.5 µl'lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine 990 µl deiyonize su eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Bu çözeltinin 10.0 µl'si 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı.

Üzerine 940 µl deiyonize su ve 50 µl 1.2 % (w/v) benzoik asit çözeltisi eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Çözelti kullanılana kadar 0-4 °C'de saklandı.

Spermidin Standart Çözeltisi Hazırlanması

17.5 mg spermidine-3HCl standardı hassas olarak 10.0 ml'lik plastik balon jöjeye tartıldı. 5 ml deiyonize su eklenerek 2 dk. boyunca vorteks yapıldı. Ardından 1 dk. soğuk ultrasonik banyoda tutuldu, çözelti sıcaklığının laboratuvar koşullarına gelmesi beklendi ve hacmine deiyonize su ile tamamlandı. Bu çözeltinin 10.0 µl'si 1.5 µl'lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine 990 µl deiyonize su eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Bu çözeltinin 10.0 µl'si 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine 940 µl deiyonize su ve 50 µl 1.2 % (w/v) benzoik asit çözeltisi eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Çözelti kullanılana kadar 0-4 °C'de saklandı.

Spermin Standart Çözeltisi Hazırlanması

17.2 mg spermine-4HCl standardı hassas olarak 10.0 ml'lik plastik balon jöjeye tartıldı. 5 ml deiyonize su eklenerek 2 dk. boyunca vorteks yapıldı. Ardından 1 dk. soğuk ultrasonik banyoda tutuldu, çözelti sıcaklığının laboratuvar koşullarına gelmesi beklendi ve hacmine deiyonize su ile tamamlandı. Bu çözeltinin 10.0 µl'si 1.5 µl'lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine 990 µl deiyonize su eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Bu çözeltinin 10.0 µl'si 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine 940 µl deiyonize su ve 50 µl 1.2 % (w/v) benzoik asit çözeltisi eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Çözelti kullanılana kadar 0-4 °C'de saklandı.

Poliamin Standart Çözelti Karışımı Hazırlanması

18.3 mg putrescine-2HCl, 17.5 mg spermidine- 3HCl ve 17.2 mg spermine-4HCl standartları hassas olarak 10.0 ml'lik plastik balon jöjeye tartıldı. 5 ml deiyonize su eklenerek 2 dk. boyunca vorteks yapıldı. Ardından 1 dk. soğuk ultrasonik banyoda tutuldu, çözelti sıcaklığının laboratuvar koşullarına gelmesi beklendi ve hacmine deiyonize su ile tamamlandı. Bu çözeltinin 10.0 µl'si 1.5 µl'lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine 990 µl deiyonize su eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Bu çözeltinin 10.0 µl'si 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine 940

μl deiyonize su ve $50 \mu\text{l}$ 1.2% (w/v) benzoik asit çözeltisi eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Çözelti kullanılana kadar $0-4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Numune Çözeltisi Hazırlanması

$-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanan 6 adet sağlıklı birey serumları laboratuvar koşullarında çözündürüldü ve her birinden $100 \mu\text{l}$ $1,5 \text{ ml}$ 'lik eppendorf tüpe alındı. Üzerine $250 \mu\text{l}$ deiyonize su eklenerek 10 sn vorteks ile karıştırıldı. Bu çözeltinin üzerine $100 \mu\text{l}$ soğuk 1.5 M HClO_4 eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Üzerine soğuk $50 \mu\text{l}$ $2 \text{ M K}_2\text{CO}_3$ eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Tüpün ağzı açılarak gaz çıkışı sağlandı. 14000 g 'de ve $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant sıvının $200 \mu\text{l}$ 'si 1.5 ml 'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine $750 \mu\text{l}$ deiyonize su ve $50 \mu\text{l}$ 1.2% (w/v) benzoik asit çözeltisi eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı.

Poliamin Spike Edilmiş Numune Çözeltisi Hazırlanması

Stok Standart Çözeltisi Hazırlanması; 18.3 mg putrescine-2HCl, 17.5 mg spermidine- 3HCl ve 17.2 mg spermine-4HCl standartları hassas olarak 10.0 ml 'lik plastik balon jöjeye tartıldı. 5 ml deiyonize su eklenerek 2 dk. boyunca vorteks edildi. Ardından 1 dk. soğuk ultrasonik banyoda tutuldu, çözelti sıcaklığının laboratuvar koşullarına gelmesi beklendi ve hacmine deiyonize su ile tamamlandı. Bu çözeltinin $25.0 \mu\text{l}$ 'si $1.5 \mu\text{l}$ 'lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine $975 \mu\text{l}$ deiyonize su eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı.

Spike Örnek Çözeltisi Hazırlanması; $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanan 6 adet sağlıklı birey serumları laboratuvar koşullarında çözündürüldü ve her birinden $100 \mu\text{l}$ $1,5 \text{ ml}$ 'lik eppendorf tüpe alındı. Üzerine $240 \mu\text{l}$ deiyonize su eklenerek 10 sn vorteks ile karıştırıldı. Bu çözeltinin üzerine stok standart çözeltisinden $10.0 \mu\text{l}$ ve $100 \mu\text{l}$ soğuk 1.5 M HClO_4 eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Üzerine soğuk $50 \mu\text{l}$ $2 \text{ M K}_2\text{CO}_3$ eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Tüpün ağzı açılarak gaz çıkışı sağlandı. 14000 g 'de ve $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant sıvının $200 \mu\text{l}$ 'si 1.5 ml 'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine $750 \mu\text{l}$ deiyonize su ve $50 \mu\text{l}$ 1.2% (w/v) benzoik asit çözeltisi eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı.

HPLC yönteminde, kullanılan mobil fazdaki kimyasalların, serum matrisinin, diğer safsızlıkların ve standart piklerinin girişim yapmadığını göstermek için;

- Kör(blank) çözeltisi
- Putresin standart çözeltisi
- Spermidin standart çözeltisi
- Spermin standart çözeltisi
- Standart çözelti karışımı
- 6 adet örnek çözeltisi
- 6 adet poliamin spike edilmiş örnek çözeltisi

Bu çözeltiler poliamin standartlarına göre kalibre edilmiş HPLC cihazına ayrı ayrı enjekte edildi. Çözeltilerin alıkonma zamanlarına karşı pik alanları kromatogramları elde edildi. PDA dedektör yardımı ile enjeksiyonların 190 nm ile 800 nm aralığında spektrumları alındı. Alınan spektrumlardan pik saflıkları tespit edildi.

5.8.2. Kalibrasyon / Standart Eğri (Doğrusallık Aralığı) Çalışması

Yöntemin doğrusallığı, 0.1-200.0 ng/ml derişim aralığında LLOQ dâhil 8 adet standardın her derişimdeki tekrarlanan analizleri ile belirlendi. Her iki çalışmada da çalışma aralığı seçilirken; kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın elde edildiği derişim aralıkları tercih edildi. Çalışma süresince kullanılacak kalibrasyon standartları için Tablo 5.8.2.1.'de konsantrasyonları verilen; putresin, spermidin ve spermin LLOQ, 10.0 ng/ml, 50.0 ng/ml, 80.0 ng/ml, 100.0 ng/ml, 150.0 ng/ml, 200.0 ng/ml ve 250.0 ng/ml, değerlerindeki LLOQ da dâhil olmak üzere 8 standart çözelti hazırlandı. Tüm çözeltiler etiketlenerek -20 °C'de karanlıkta saklandı. Her çalışma öncesi laboratuvar koşullarında çözündürülerek seyreltmeler yapıldı. Doğrusallık çalışmasında her biri 3'er enjeksiyon çalışılıp ortalaması alındı ve lineerite grafiği çizildi. Çalışmada belirtilen derişim aralıklarında çözeltinin derişimine karşı elde edilen pik alan oranları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi (n=3). Kalibrasyon eğrilerinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları elde edildi.

Tablo 5.8.2.1. Kalibrasyon standartlarının konsantrasyonları

Çözelti Seviyesi	Putresin Konsantrasyonu (ng/ml)	Spermidin Konsantrasyonu (ng/ml)	Spermin Konsantrasyonu (ng/ml)
LLOQ	0.2	0.5	1.0
%10.0	10.0	10.0	10.0
%50.0	50.0	50.0	50.0
%80.0	80.0	80.0	80.0
%100.0	100.0	100.0	100.0
%150.0	150.0	150.0	150.0
%200.0	200.0	200.0	200.0
%250.0	250.0	250.0	250.0

5.8.3. Doğruluk(Accuracy)/Kesinlik(Precision) Çalışması

Çalışma boyunca kullanılacak kalite kontrol (QC) numuneleri, gerekli miktarlarda hazırlanan stok çözeltilerinden alınıp, insan serumu ile belirtilen hacimlere tamamlanarak hazırlandı. Kalite kontrol numuneleri, doğrusallık çalışmasının en alt değeri ile en üst değeri aralığında olacak şekilde 3 farklı seviyede hazırlandı. Bu çözeltilerin gün içi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde her seviyeden 6'şar enjeksiyon) ve günler arası (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında farklı 3 günde her seviyeden 6'şar enjeksiyon) analizi yapılarak, enjeksiyon ortalamaları hesaplandı. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi.

Doğruluk sonuçları, Bağlı Hatayla (% BH) = [(bulunan madde miktarı-eklenen madde miktarı)/eklenen madde miktarı] x 100) ve kesinlik sonuçları, Bağlı

Standart Sapma (% BSS) = [Standart Sapma(SS)/bulunan madde miktarı ortalaması] x 100) ile verildi.

Hazırlanan 3 farklı konsantrasyondaki kalite kontrol numuneleri çalışma süresince -20 °C'de saklandı. Kalite kontrol numunesi serum poliamin konsantrasyonları 50, 100 ve 150 ng/ml olarak hazırlandı.

5.8.4. Geri Kazanım (Recovery) Çalışması

Geri kazanım deneyleri üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek) analitik cevapların, ekstrakte edilmemiş standartlar (% 100 geri kazanımı temsil eden) ile karşılaştırılarak standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Geri kazanım için üç farklı konsantrasyonda her konsantrasyondan 3 paralel numune hazırlandı ve her numune 3'er defa analiz edildi. Geri kazanım numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen alanlardan doğrusallık aralığı kromatogramından elde edilen standart alanlarına karşı konsantrasyon eğrisi denkleminde teorik konsantrasyonlar (Hesaplanan Konsantrasyon) hesaplandı. Standart ekleme yöntemi ile numuneler üzerine eklenen standartların teorik konsantrasyonları (Eklenen Konsantrasyon) hesaplandı.

% Geri Kazanım = (Hesaplanan Konsantrasyon/Eklenen Konsantrasyon)x100 formülü kullanılarak hesaplandı. Geri kazanım çözeltileri serum konsantrasyonları. Geri kazanım çözeltileri serum poliamin konsantrasyonları 50, 100 ve 150 ng/ml olarak hazırlandı.

Stok Standart Çözeltisi Hazırlanması

18.3 mg putrescine-2HCl, 17.5 mg spermidine- 3HCl ve 17.2 mg spermine-4HCl standartları hassas olarak 10.0 ml'lik plastik balon jöjeye tartıldı. 5 ml deiyonize su eklenerek 2 dk. boyunca vorteks yapıldı. Ardından 1 dk. soğuk ultrasonik banyoda tutuldu, çözelti sıcaklığının laboratuvar koşullarına gelmesi beklendi ve hacmine deiyonize su ile tamamlandı. Bu çözeltinin 25.0 µl'si 1.5 µl'lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine 975 µl deiyonize su eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı.

%50'lik Geri Kazanım Çözeltisinin Hazırlanması

-80 °C'de saklanan 3 adet serum havuzu örneği laboratuvar koşullarında çözündürüldü ve her birinden 100 µl 1,5 ml'lik eppendorf tüpe alındı. Üzerine 245 µl deiyonize su eklenerek 10 sn vorteks ile karıştırıldı. Bu çözeltinin üzerine stok standart çözeltisinden 5.0 µl ve 100 µl soğuk 1.5 M HClO₄ eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Üzerine soğuk 50 µl 2 M K₂CO₃ eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Tüpün ağzı açılarak gaz çıkışı sağlandı. 14000 g'de ve 4 °C'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant sıvınının 200 µl'si 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine 750 µl deiyonize su ve 50 µl 1.2 % (w/v) benzoik asit çözeltisi eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı.

%100'lik Geri Kazanım Çözeltisinin Hazırlanması

- 80 °C'de saklanan 3 adet serum havuzu örneği laboratuvar koşullarında çözündürüldü ve her birinden 100 µl 1,5 ml'lik eppendorf tüpe alındı. Üzerine 240 µl deiyonize su eklenerek 10 sn vorteks ile karıştırıldı. Bu çözeltinin üzerine stok standart çözeltisinden 10.0 µl ve 100 µl soğuk 1.5 M HClO₄ eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Üzerine soğuk 50 µl 2 M K₂CO₃ eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Tüpün ağzı açılarak gaz çıkışı sağlandı. 14000 g'de ve 4 °C'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant sıvınının 200 µl'si 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine 750 µl deiyonize su ve 50 µl 1.2 % (w/v) benzoik asit çözeltisi eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı.

%150'lik Geri Kazanım Çözeltisinin Hazırlanması

- 80 °C'de saklanan 3 adet serum havuzu örneği laboratuvar koşullarında çözündürüldü ve her birinden 100 µl 1,5 ml'lik eppendorf tüpe alındı. Üzerine 235 µl deiyonize su eklenerek 10 sn vorteks ile karıştırıldı. Bu çözeltinin üzerine stok standart çözeltisinden 15.0 µl ve 100 µl soğuk 1.5 M HClO₄ eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Üzerine soğuk 50 µl 2 M K₂CO₃ eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı. Tüpün ağzı açılarak gaz çıkışı sağlandı. 14000 g'de ve 4 °C'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant sıvınının 200 µl'si 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine 750 µl deiyonize su ve 50 µl 1.2 % (w/v) benzoik asit çözeltisi eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırıldı.

5.8.5. Miktar Tayini Alt Sınırı (LLOQ) Çalışması

Kromatografik ölçümlerde pratik bir kural olarak sinyal/gürültü (S/N) oranından faydalanıldı. LLOQ'daki analit yanıtı, kör yanıtına kıyasla yanıtın en az 5 katı olarak belirlendi. Analit piki (tepki) % 20 hassasiyet ve % 80-120 doğrulukla tanımlanabilir, ayırık ve tekrarlanabilir olduğu gösterildi.

Putresin, spermidin ve spermin için LLOQ değerleri doğrusallık çalışmasından elde edildi. Doğrusallık eğrisinin geliştirilmesinde aşağıdaki koşullar yerine getirildi;

- Nominal konsantrasyondan LLOQ'un % 20 sapması
- Nominal konsantrasyondan LLOQ dışındaki standartların % 15 sapması

Sıfır olmayan altı standarttan en az dördü LLOQ ve en yüksek konsantrasyonda kalibrasyon standardı da dâhil olmak üzere yukarıdaki ölçütleri karşıladı.

5.8.6. Stabilité

Stabilité çalışması üç farklı seviyede poliamin spike edilmiş serum örneklerinden çalışıldı. Stabilité tespiti için aşağıdaki yöntemler uygulandı.

Kısa Süreli Sıcaklık Stabilitesi

Düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda ki her bir analitin üç alikotu oda sıcaklığında çözüldü. Buzdolabı (+4 °C) saklama koşullarında saklanarak 0, 2, 4, 8, 12 ve 24 saatlerde analiz edildi.

6. BULGULAR

6.1. HPLC Yöntemi Geliştirme

Kromatografi sistemlerinde yöntem geliştirme aşamasında en önemli kriter iyi bir ayırımın sağlanmasıdır. Bu ayırımın sağlanmasında; hareketli faz bileşimi, kullanılan kolonun kimyasal yapısı, çapı, uzunluğu ve dolgu maddesinin partikül büyüklüğü, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi ve enjeksiyon konsantrasyonu gibi faktörler etkilidir. Metot geliştirme bu kriterler dikkate alınarak gerçekleştirildi.

Hareketli faz A bileşimi; Ters faz sıvı kromatografisinde bileşiklerin alıkonma zamanları önemlidir. Polarite hareketli faz sistemlerinde ayırım gücünün bir ölçüsüdür ve hareketli faz bileşimi ayırım gücünü etkiler. Çalışmada hareketli faz olarak Dai ve ark.(2014) önerdiği metotta belirtilen hareketli faz A 0.1 M sodyum asetat; pH 7.2 tamponu için öncelikle pH değişikliği denendi. Hareketli faz A pH oranları 0,1 M HCl ile pH 7.0, 6.5 ve 2.3, 0,1 M NaOH ile pH 7.5 ve 8.2'ye ayarlandı. Hareketli faz pH oranlarında yapılan değişim ile etkin bir ayırım sağlanamadı.

Hareketli faz B bileşimi; Etkin bir ayırım sağlamak amacıyla Dai ve ark. (2014) yönteminde belirtilen hareketli faz B olarak kullanılan metanol, asetonitril olarak değiştirildi. Asetonitril ile çeşitli gradient denemeler gerçekleştirildi. Yapılan tüm denemelerde metanole göre daha etkili ayırımlar sağlandı.

Kolon sıcaklığı; Ayırımın arttırılmasında kolon sıcaklığı önemli bir parametredir. Bu nedenle kolonun çalışabileceği en uygun sıcaklığı belirlemek amacıyla kolon sıcaklığı 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C sıcaklıkları en uygun görülen gradient program ile denendi. Deneme sonucu en iyi ayırımın 25 °C'de sağlandığı belirlendi.

Kromatografi kolonu; Kolonun dolgu maddesi, çapı, boyu ve dolgu maddesinin partikül büyüklüğü etkin bir ayırım için önemlidir. Kolon denemesi için öncelikle aynı uzunluk, çap ve partikül büyüklüklerine sahip fakat farklı dolgu maddeleri içeren kolonlar denendi. En iyi ayırım ve pik şekli C18 dolgu maddesine sahip kolonda elde edildi.

Dalga boyu denemesi; yapılan literatür taramaları sonucunda Dai ve ark. (2014)'nın önerdiği dalga boyunun gerçekleştirilen türevlendirme yöntemine en uygun olan dalga boyu olduğu için metod geliştirme aşamasında dalga boyu denemesi gerçekleştirilmedi. Seçicilik çalışmasında alınan spektrumlarla çalışılan dalga boyunun ideal dalga boyu olduğu tespit edildi.

Şırınga filtre denemesi; çözeltilerden gelebilecek çözünmemiş partiküllerin kolona ve cihaz hatlarına zarar vermesini önlemek amacıyla şırınga filtreleri kullanmak önemlidir. Kullanılacak filtrenin yapısı etken madde içeriğini absorplamayacak ancak diğer çözünmemiş partikülleri tutabilecek geçirgenliğe sahip olmalıdır. Bu nedenle 0.45 µm por çapına sahip Regenerated Cellulose (RC), Polytetrafluoroethylene (PTFE) ve Polyvinylidene Fluoride (PDVF) filtreler denendi. En iyi geri kazanım 0.45 µm PTFE filtre ile elde edildi.

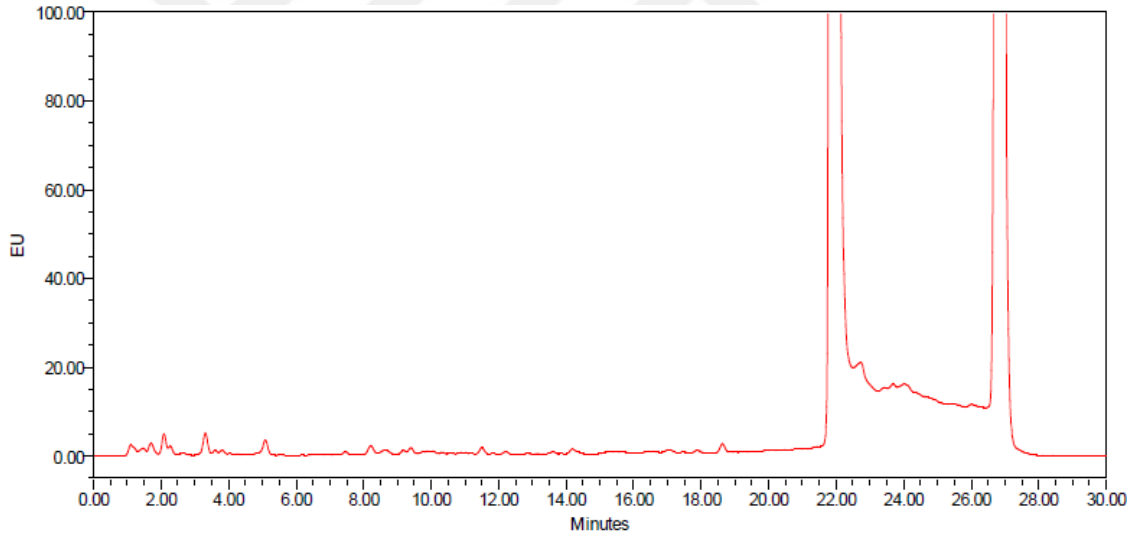
Enjeksiyon Hacmi; Enjeksiyon hacmi kolon yükleme kapasitesini aşmamalı ve dedektörü satüre edecek konsantrasyonda olmamalıdır. Bu amaçla enjeksiyon hacmi denemeleri standart çözeltiden 5 µl, 10 µl, 50 µl ve 100 µl olarak gerçekleştirildi. En uygun enjeksiyon hacminin 10 µl'de sağlandığı tespit edildi.

Gradient program; Serum örneklerinde poliamin standartları alıkonma zamanlarında gelen girişimleri ortadan kaldırmak amacıyla gradient program denemeleri yapıldı. Referans olarak alınan Dai ve ark. (2014) yöntemindeki gradient program ile poliamin pikleri alıkonma zamanlarında girişim olduğu gözlemlendi. Bu girişimleri ortadan kaldırmak amacıyla gradient programının polaritelerinde değişiklikler yapıldı. Hareketli faz A oranının 0. dk.'da %95, %70, %60 ve %50 ile başlayarak 25 dk. sonunda %30'a kadar düştüğü gradient program denemeleri gerçekleştirildi. En iyi ayırım 0. dk.'da %95 ile başlayarak 25 dk. sonunda %30'a düştüğü gradient programda alındı. Bu gradient programda serum numunelerinden gelen girişimlerin ilk 14 dk.'da kolonu terk ettiği gözlemlendi.

6.2. HPLC Yöntemi Geçerlilik Testleri

6.2.1. Seçicilik (Selectivity) Çalışması

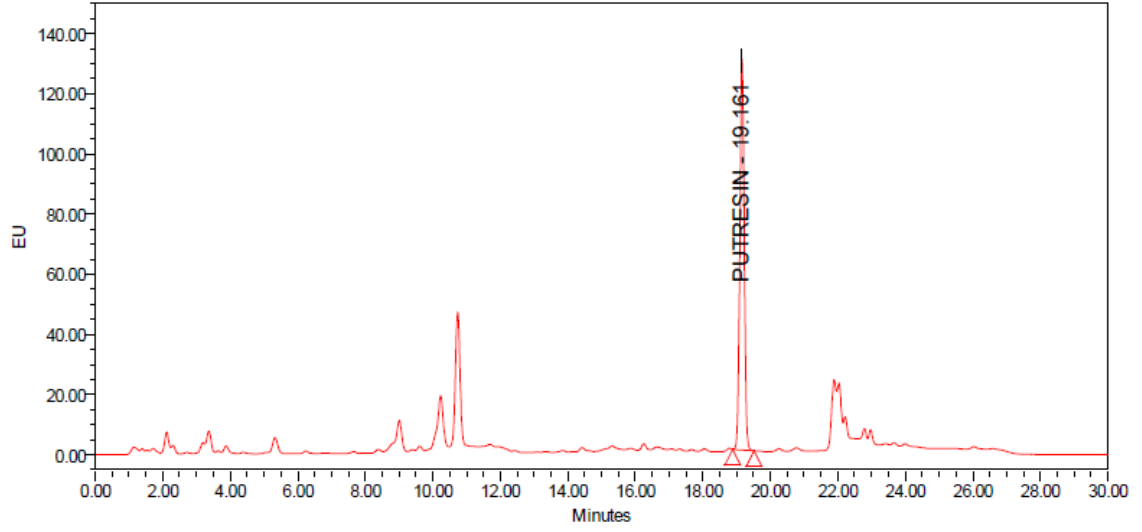
Poliamin pikleri alıkonma zamanında başka pik gözlemlenmedi ve pik saflıkları uygun olarak tespit edildi. Metot geliştirme çalışmaları sonucunda belirlenen kromatografik şartlarda alınan kromatogramlarda poliamin pikleri alıkonma zamanlarında bir girişime rastlanmadı. Putresin alıkonma zamanı 19.2 dk. , spermidin alıkonma zamanı 18.0 dk. ve spermin alıkonma zamanı 17.1 dk. olarak tespit edildi. Pik saflığı kriteri olarak kromatogramlardan elde edilen pik saflığı açısı (purity angle), pik saflığı eşliğinden (purity threshold) büyük olmalıdır. Tüm enjeksiyonlarda bu şartlar sağlandı. Elde edilen seçicilik kromatogramları aşağıda verilmiştir.



PDA Result Table

	Name	RT	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Height (μV)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	SPERMIN	17.063				
2	SPERMIDIN	18.048				
3	PUTRESIN	19.152				

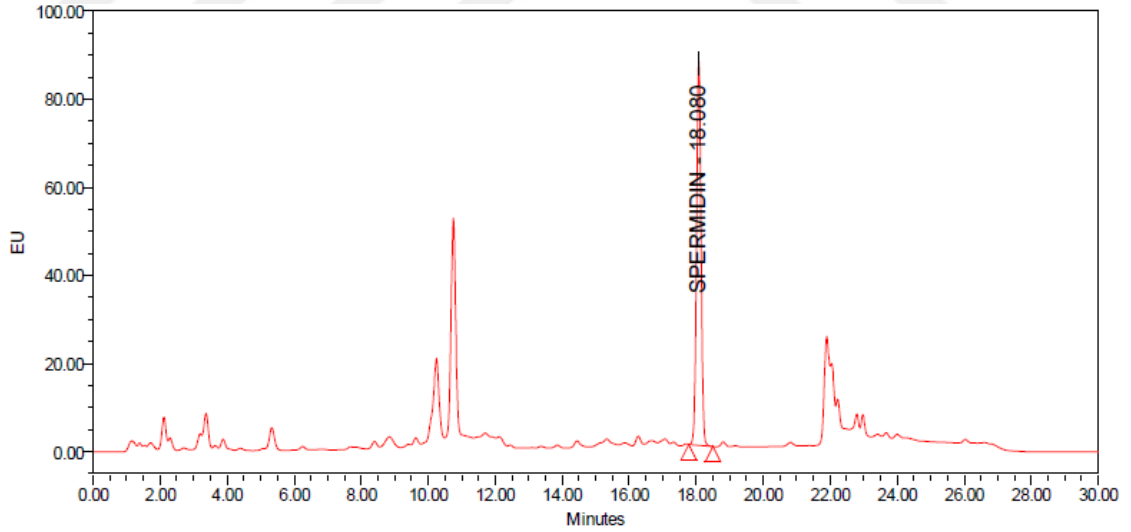
Şekil 6.2.1.1. Kör(blank) çözeltisi seçicilik kromatogramı



PDA Result Table

	Name	RT	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Height (μV)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	SPERMIN	17.063				
2	SPERMIDIN	18.048				
3	PUTRESIN	19.161	11847026	1303547	0.258	0.310

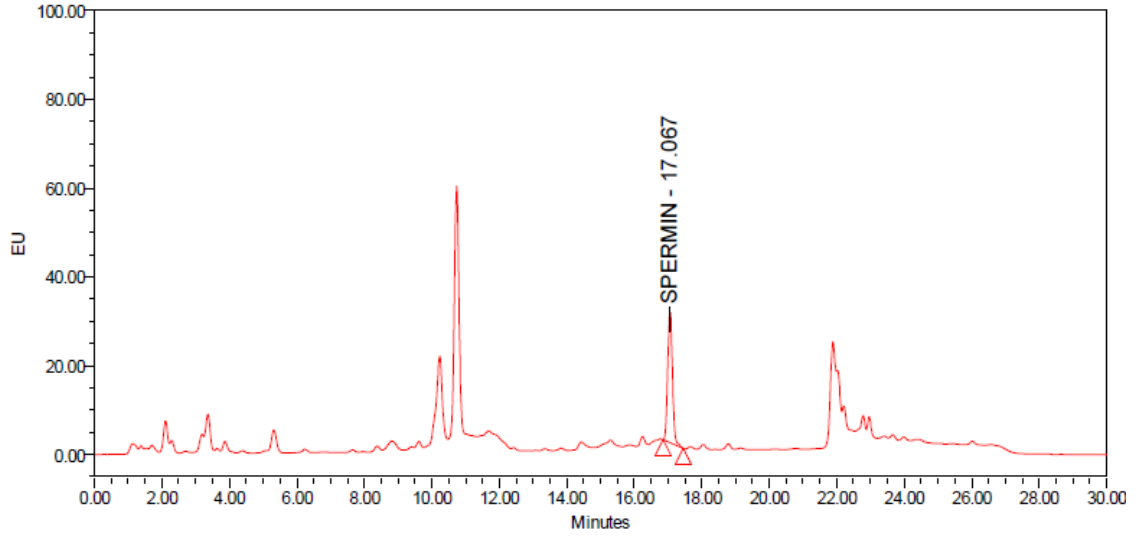
Şekil 6.2.1.2. Putresin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı



PDA Result Table

	Name	RT	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Height (μV)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	SPERMIN	17.063				
2	SPERMIDIN	18.080	8098199	871486	0.292	0.493
3	PUTRESIN	19.152				

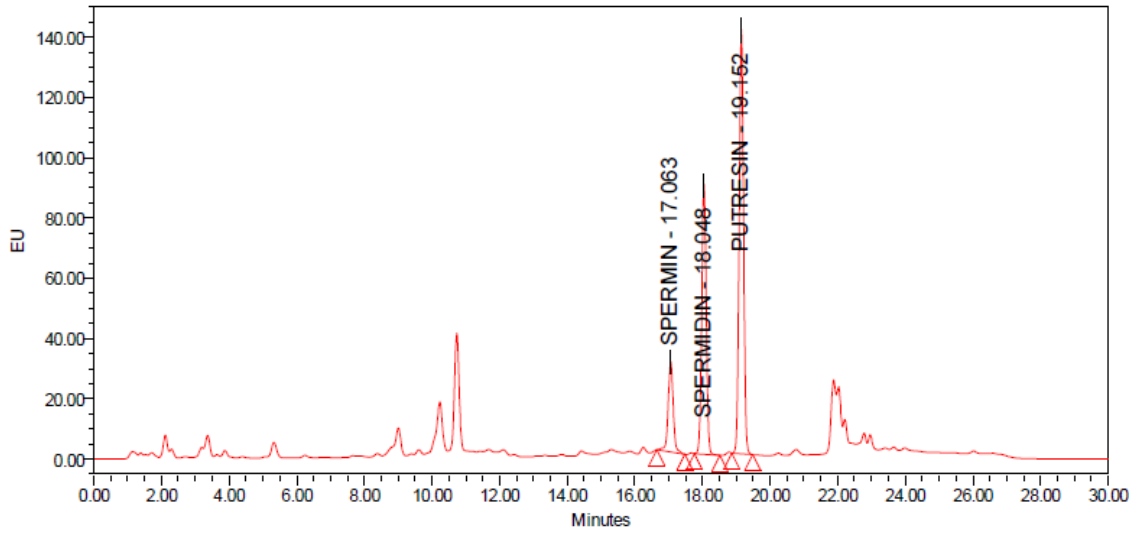
Şekil 6.2.1.3. Spermidin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı



PDA Result Table

	Name	RT	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Height (μV)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	SPERMIN	17.067	2879720	293492	1.085	2.031
2	SPERMIDIN	18.048				
3	PUTRESIN	19.152				

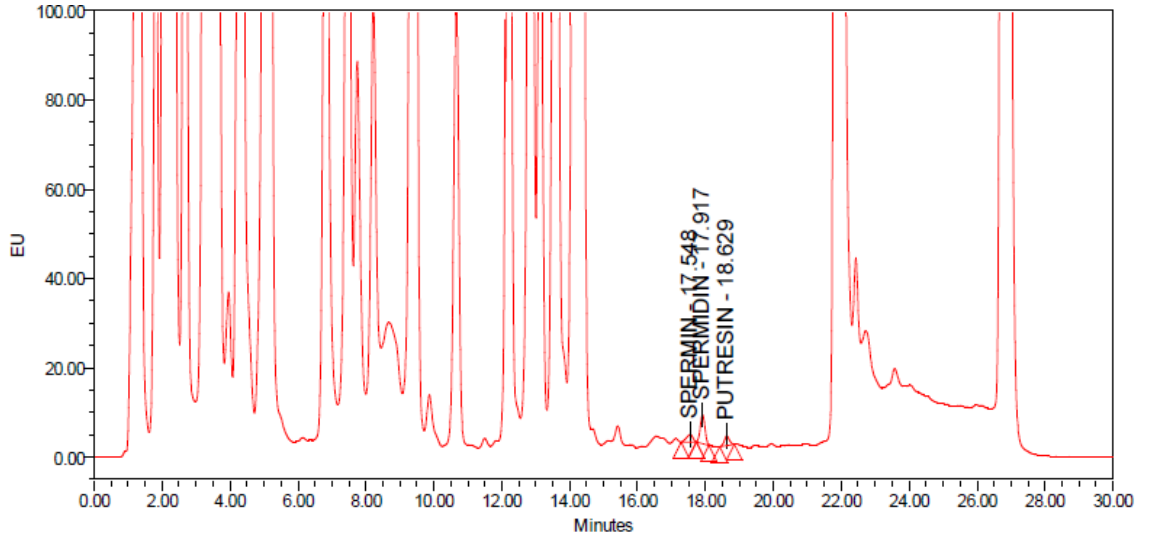
Şekil 6.2.1.4. Spermin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı



PDA Result Table

	Name	RT	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Height (μV)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	SPERMIN	17.063	3147229	301279	1.144	1.241
2	SPERMIDIN	18.048	8258213	894795	0.361	0.406
3	PUTRESIN	19.152	12739868	1409796	0.570	1.103

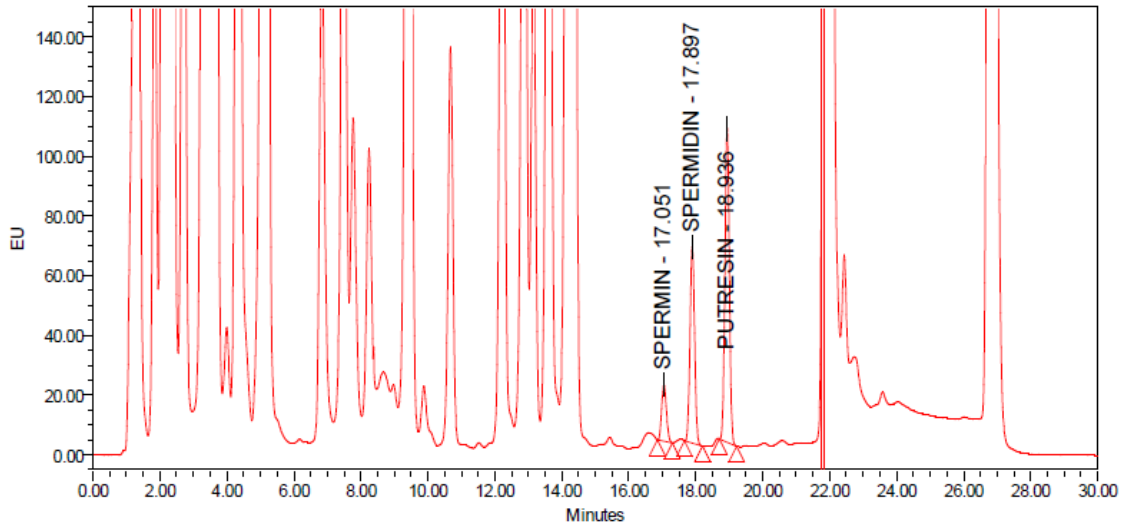
Şekil 6.2.1.5. Standart çözeltisi seçicilik kromatogramı



PDA Result Table

	Name	RT	Area (μV*sec)	Height (μV)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	SPERMIN	17.548	216675	16574	32.312	90.000
2	SPERMIDIN	17.917	620156	64123	28.376	90.000
3	PUTRESIN	18.629	222462	21778	7.311	90.000

Şekil 6.2.1.6. Numune çözeltisi seçicilik kromatogramı



PDA Result Table

	Name	RT	Area (μV*sec)	Height (μV)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	SPERMIN	17.051	1876896	189709	1.477	3.798
2	SPERMIDIN	17.897	6340680	658837	0.928	1.144
3	PUTRESIN	18.936	9707780	1052385	0.364	0.718

Şekil 6.2.1.7. Poliamin spike edilmiş numune seçicilik kromatogramı

6.2.2. Kalibrasyon/Standart Eğri (Doğrusallık Aralığı) Çalışması

Putresin için 0.2-200.0 ng/ml, spermidin için 0.5-200.0 ng/ml ve spermin için 1.0-200.0 ng/ml derişim aralıklarında LLOQ dâhil 8 adet standardın her biri için kromatogramlar alındı ve pik alanları tespit edildi. HPLC yöntemi ile elde edilen; putresin çözeltisi doğrusallık sonuçları ve kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri Tablo 6.2.2.1.'de, spermidin çözeltisi doğrusallık sonuçları ve kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri Tablo 6.2.2.2'de ve spermin çözeltisi doğrusallık sonuçları ve kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri Tablo 6.2.2.3'te verilmiştir.

Tablo 6.2.2.1. Putresin doğrusallık çalışması sonuçları

Çözelti Seviyeleri	Konsantrasyon (ng/ml)	Ortalama Alan	Hesaplanan Alan	SS	% BSS
LLOQ (% 0.2)	0.198	32619	-380375	1278	3.92
% 10.0	9.920	2044546	54155	35913	1.76
% 50.0	49.601	10684115	1827717	245305	2.30
% 80.0	79.362	16673659	3157900	237461	1.42
% 100.0	99.203	20172051	4044703	274460	1.36
% 150.0	148.804	31278323	6261644	626048	2.00
% 200.0	198.406	41548955	8478630	298111	0.72
% 250.0	248.007	52957116	10695571	696016	1.31
Doğrusallık Aralığı (ng/ml) :				0.2-250.0	
Eğim :				211992.7343	
Kesim :				- 163096.5089	
Korelasyon (r) :				0.9998	
Korelasyon Katsayısı (r ²) :				0.9996	
Regrasyon Doğru Denklemi :				y=211992.7343x - 163096.5089	

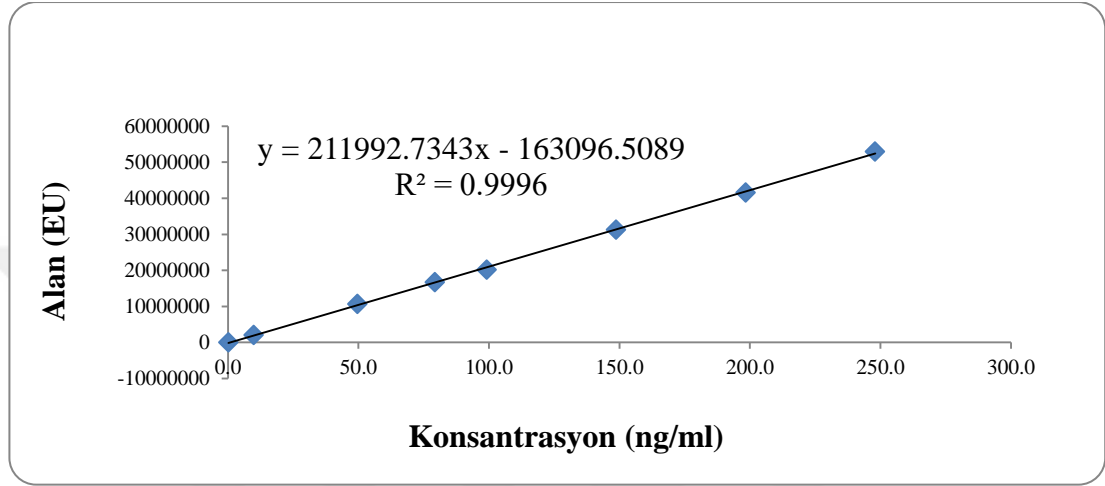
Tablo 6.2.2.2. Spermidin doğrusallık çalışması sonuçları

Çözelti Seviyeleri	Konsantrasyon (ng/ml)	Ortalama Alan	Hesaplanan Alan	SS	% BSS
LLOQ (% 0.5)	0.511	83837	-366385	2078	2.48
% 10.0	10.218	1132241	67474	34433	3.04
% 50.0	51.089	6309611	1894224	133364	2.11
% 80.0	81.742	10195013	3264275	175889	1.73
% 100.0	102.177	12431606	4177627	186648	1.50
% 150.0	153.266	20008557	6461075	243082	1.21
% 200.0	204.354	27245703	8744479	196053	0.72
% 250.0	255.443	35010180	11027927	507576	1.45
Doğrusallık Aralığı (ng/ml) :				0.5 - 250.0	
Eğim :				136673.7451	
Kesim :				- 619833.0382	
Korelasyon (r) :				0.9990	
Korelasyon Katsayısı (r ²) :				0.9981	
Regrasyon Doğru Denklemi :				y = 136673.7451x - 619833.0382	

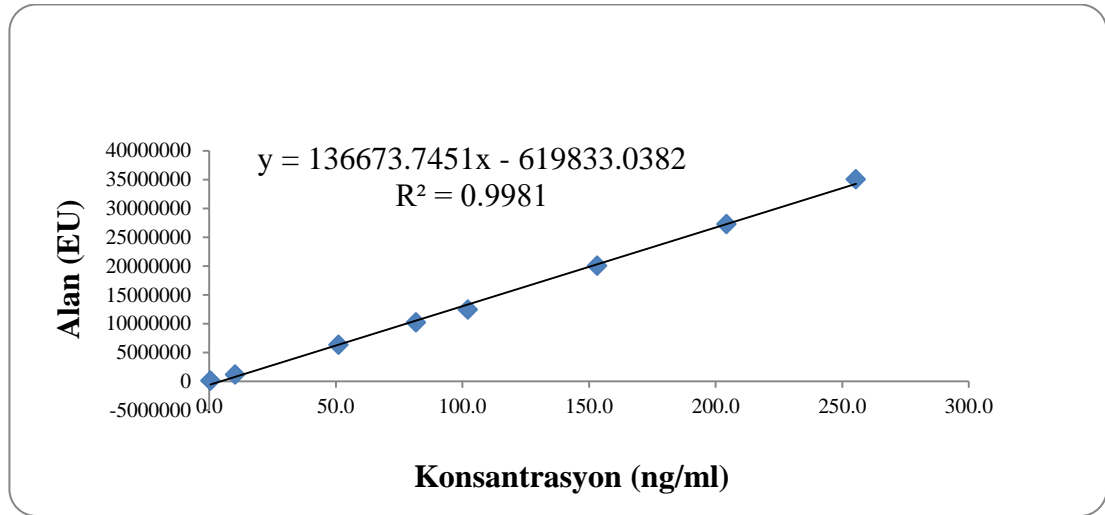
Tablo 6.2.2.3. Spermin doğrusallık çalışması sonuçları

Çözelti Seviyeleri	Konsantrasyon (ng/ml)	Ortalama Alan	Hesaplanan Alan	SS	% BSS
LLOQ (% 1.0)	1.000	35043	-344529	960	2.74
% 10.0	10.003	334338	57865	4885	1.46
% 50.0	50.014	1647499	1846176	103908	6.31
% 80.0	80.023	2896858	3187443	121929	4.21
% 100.0	100.028	3817597	4081577	71627	1.88
% 150.0	150.042	6026817	6316977	134433	2.23
% 200.0	200.056	8489991	8552378	165356	1.95
% 250.0	250.070	11237522	10787778	62115	0.55
Doğrusallık Aralığı (ng/ml) :				1.0 - 250.0	
Eğim :				44695.4958	
Kesim :				- 389224.3886	
Korelasyon (r) :				0.9968	
Korelasyon Katsayısı (r ²) :				0.9937	
Regrasyon Doğru Denklemi :				y = 44695.4958x - 389224.3886	

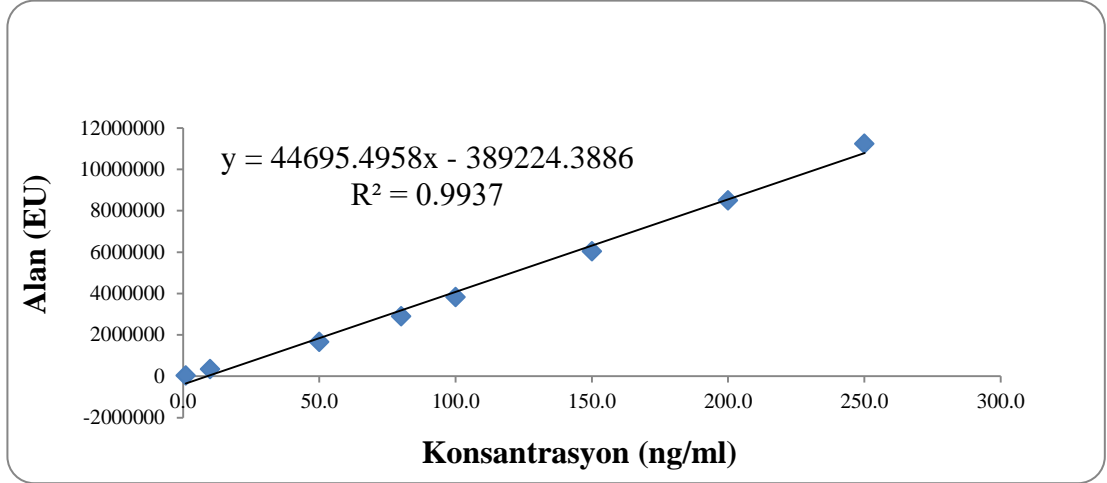
Putresin, spermidin ve spermin çözeltileri derişimlerine karşı elde edilen pik alanları grafiğı geçirilerek kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Şekil 6.2.2.1.'de putresin kalibrasyon eğrisi, Şekil 6.2.2.2.'de spermidin kalibrasyon eğrisi ve Şekil 6.2.2.3.'te spermin kalibrasyon eğrisi verilmiştir.



Şekil 6.2.2.1. Putresin kalibrasyon eğrisi

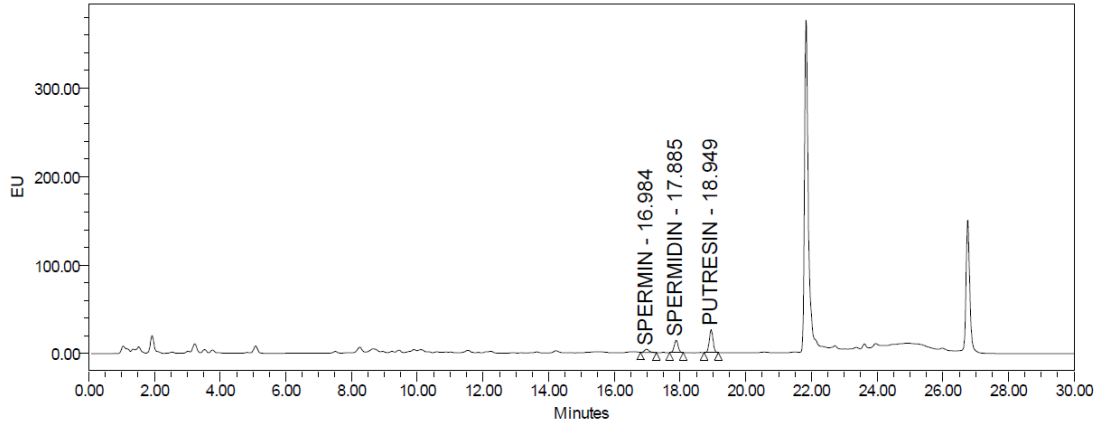


Şekil 6.2.2.2. Spermidin kalibrasyon eğrisi



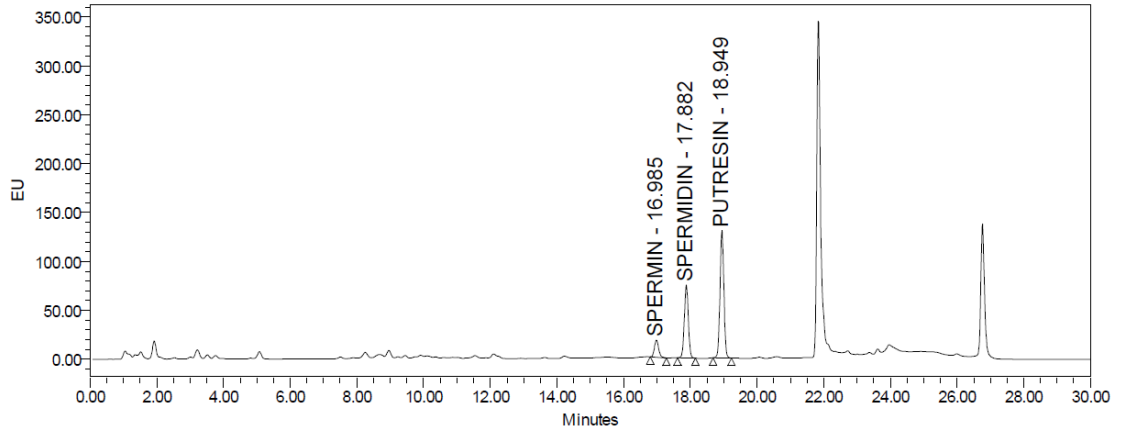
Şekil 6.2.2.3. Spermin kalibrasyon eğrisi

En küçük kareler yöntemi ile bulunan korelasyon katsayısı (r^2) ≥ 0.9950 ve korelasyon (r) ≥ 0.9900 olmalıdır. Putresin için r^2 değeri 0.9996 ve r değeri 0.9998, spermidin için r^2 değeri 0.9981 ve r değeri 0.9990, spermin için r^2 değeri 0.9937 ve r değeri 0.9968 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre yöntem; putresin, spermidin ve spermin için doğrusaldır. Doğrusallık çözeltileri kromatogramları sırası ile aşağıda verilmiştir.



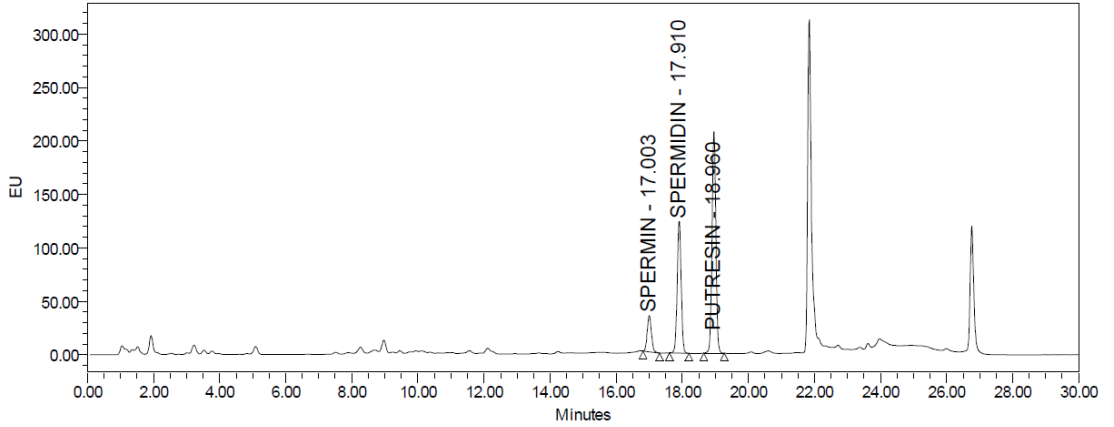
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	16.984	332725	35165
2	SPERMIDIN	17.885	1144674	140916
3	PUTRESIN	18.949	2050028	258159

Şekil. 6.2.2.4. %10'luk doğrusallık kromatogramı



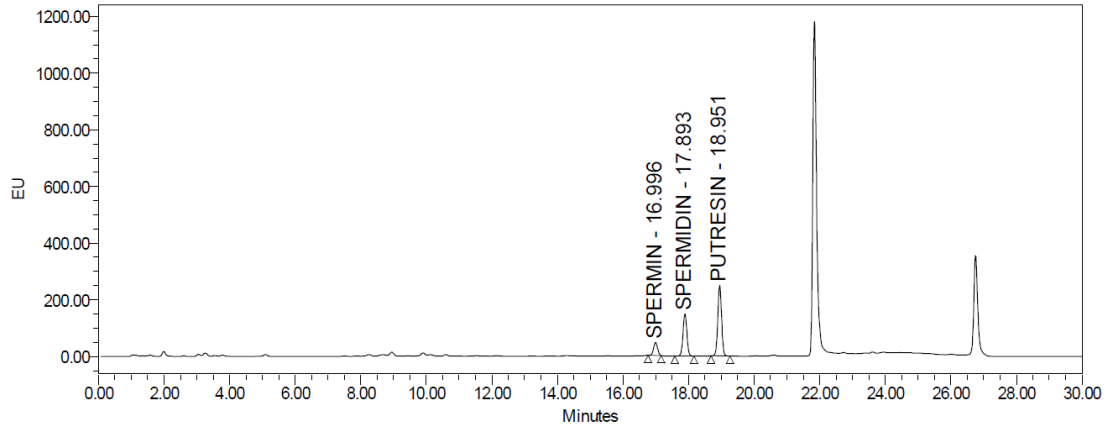
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	16.985	1534444	174918
2	SPERMIDIN	17.882	6170920	745573
3	PUTRESIN	18.949	10436242	1299967

Şekil. 6.2.2.5. %50'lik doğrusallık kromatogramı



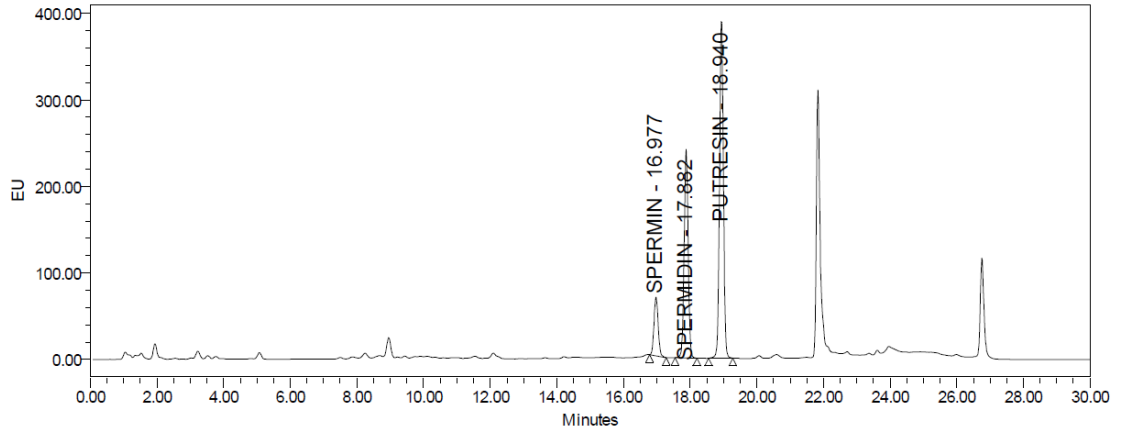
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.003	2956041	337800
2	SPERMIDIN	17.910	10234403	1237654
3	PUTRESIN	18.960	16731701	2080259

Şekil. 6.2.2.6. %80'lik doğrusallık kromatogramı



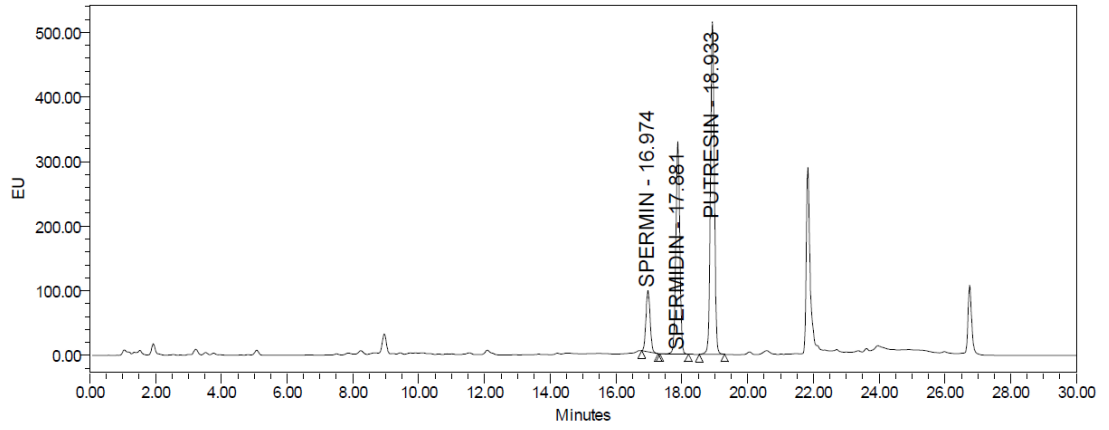
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	16.996	3898694	453179
2	SPERMIDIN	17.893	12216362	1485203
3	PUTRESIN	18.951	19867674	2476616

Şekil. 6.2.2.7. %100'lük doğrusallık kromatogramı



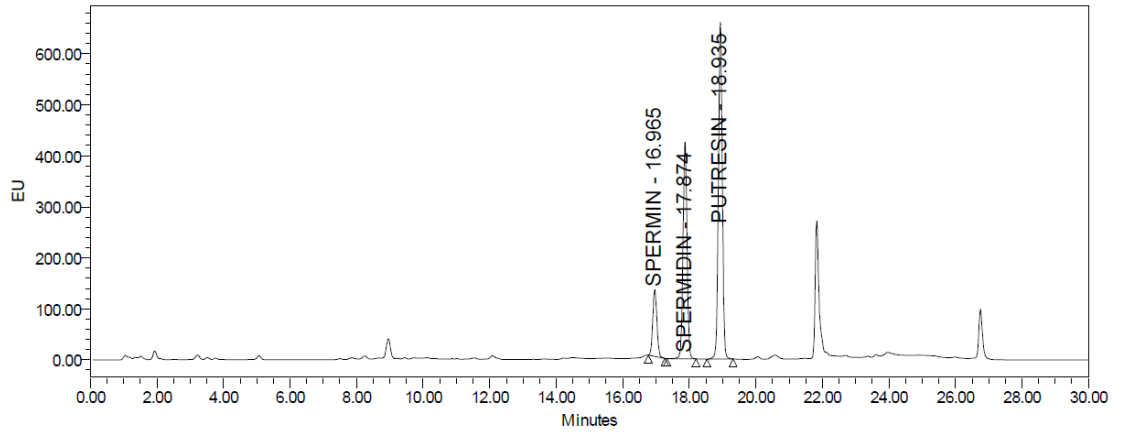
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	16.977	5902242	680318
2	SPERMIDIN	17.882	20079893	2406922
3	PUTRESIN	18.940	31440893	3912837

Şekil. 6.2.2.8. %150'lik doğrusallık kromatogramı



	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	16.974	8361054	954340
2	SPERMIDIN	17.881	27286284	3285145
3	PUTRESIN	18.933	41839057	5136540

Şekil. 6.2.2.9. %200'lük doğrusallık kromatogramı



	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	16.965	11298577	1305530
2	SPERMIDIN	17.874	35414041	4268555
3	PUTRESIN	18.935	53485649	6584096

Şekil. 6.2.2.10. %250'lik doğrusallık kromatogramı

6.2.3. Doğruluk(Accuracy)/Kesinlik(Precision) Çalışması

Doğrusallık çalışmasında belirlenen konsantrasyon aralığına denk gelecek şekilde üç farklı konsantrasyonda (50.0, 100.0 ve 150.0 ng/ml) kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler gün içi tekrarlanabilirlik analizleri için aynı yöntemi kullanarak aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6'şar kez ve günler arası tekrarlanabilirlik analizleri için aynı yöntem kullanılarak aynı laboratuvar şartlarında bir birini takip eden 3 farklı günde 6'şar kez analiz edildi. Elde edilen sonuçlardan doğruluk ve kesinlik değerleri hesaplandı. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması (SS), bağıl standart sapması (%BSS) ve bağıl hataları (%BH) belirlendi. Doğruluk değeri % bağıl hata (%BH) ve kesinlik % bağıl standart sapma (%BSS) ile verildi. Elde edilen sonuçlara göre %50, %100 ve %150 seviyeleri için doğruluk(%BH) değerleri %15'ten ve kesinlik(%BSS) değerleri %15'ten küçük bulundu. HPLC yöntemi ile elde edilen sonuçlar gün içi doğruluk ve kesinlik değerleri için Tablo 6.2.3.1.'de ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 6.2.3.2.'de verildi.

Tablo 6.2.3.1. Gün içi doğruluk ve kesinlik değerleri

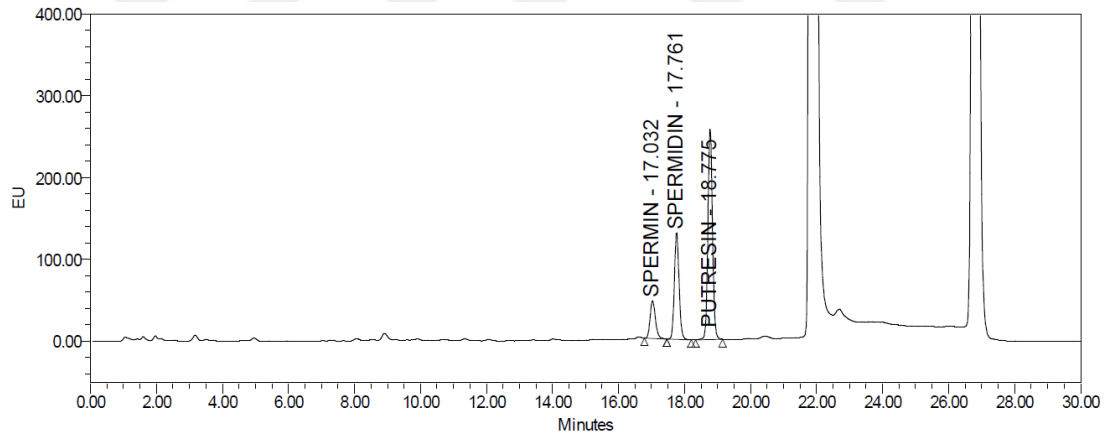
Etken Madde	Eklenen Konsantrasyon (ng/ml)	Hesaplanan Konsantrasyon \pm SS (ng/ml)	%BH (Doğruluk)	%BSS (Kesinlik)
Putresin	50.0	42.64 \pm 0.372	13.57	0.87
	100.0	86.01 \pm 1.447	12.83	1.68
	150.0	138.69 \pm 1.251	6.29	0.90
Spermidin	50.0	49.35 \pm 0.155	3.40	0.31
	100.0	93.37 \pm 0.268	8.62	0.29
	150.0	147.52 \pm 0.473	3.75	0.32
Spermin	50.0	49.86 \pm 0.060	1.45	0.12
	100.0	95.13 \pm 0.708	5.99	0.74
	150.0	148.56 \pm 0.346	2.12	0.23

X: Ortalama değer, SS: Standart Sapma, %BSS: Yüzde Bağıl Standart Sapma, %BH: Yüzde Bağıl Hata

Tablo 6.2.3.2. Günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

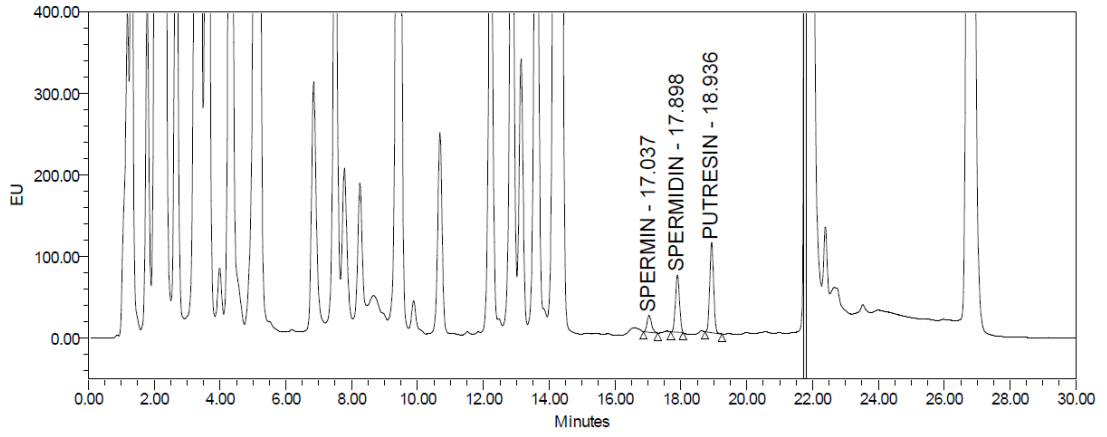
Etken Madde	Eklene Knsantrasyon (ng/ml)	Hesaplanan Knsantrasyon \pm SS (ng/ml)	%BH (Doğruluk)	%BSS (Kesinlik)
Putresin	50.0	52.72 \pm 5.113	12.41	9.70
	100.0	95.97 \pm 5.908	5.67	6.16
	150.0	144.56 \pm 12.853	6.83	8.89
Spermidin	50.0	49.81 \pm 3.044	6.09	6.11
	100.0	87.24 \pm 1.393	9.06	1.60
	150.0	128.37 \pm 3.359	8.45	2.62
Spermin	50.0	52.57 \pm 4.519	8.04	8.60
	100.0	92.08 \pm 4.827	4.47	13.78
	150.0	124.30 \pm 6.722	12.60	5.41

X: Ortalama değer, SS: Standart Sapma, %BSS: Yüzde Bağlı Standart Sapma, %BH: Yüzde Bağlı Hata



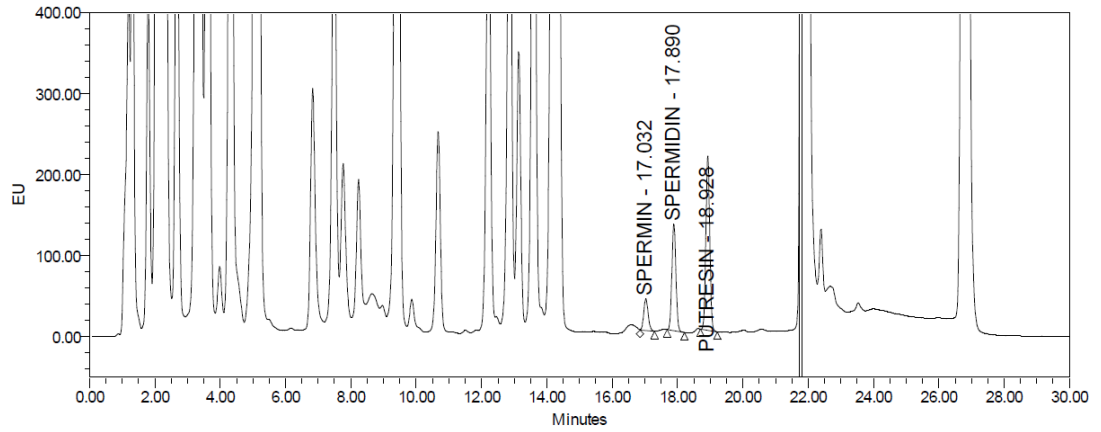
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.032	5193183	464050
2	SPERMIDIN	17.761	12981968	1305936
3	PUTRESIN	18.775	24819042	2585954

Şekil 6.2.3.1. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik standart kromatogramı



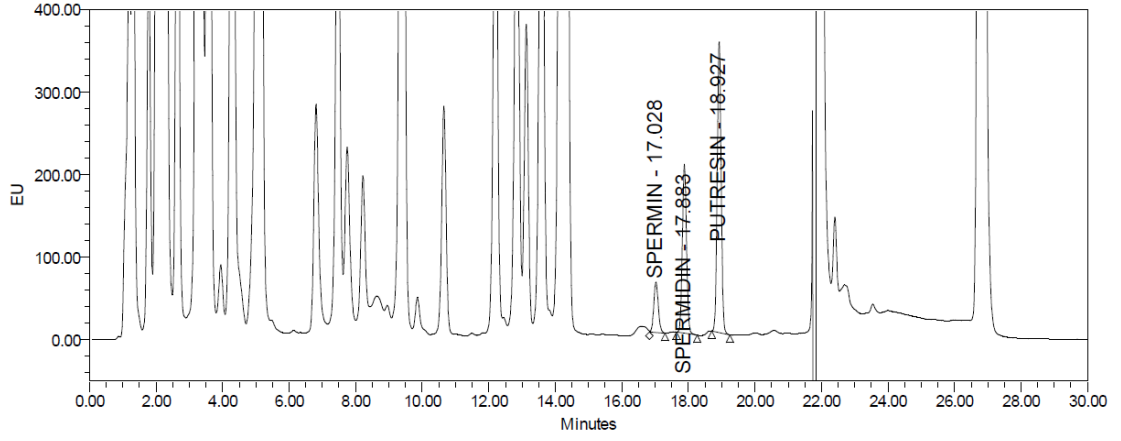
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.037	1902834	204708
2	SPERMIDIN	17.898	5931343	697845
3	PUTRESIN	18.936	8978478	1101365

Şekil 6.2.3.2. %50'lik gün içi tekrarlanabilirlik kromatogramı



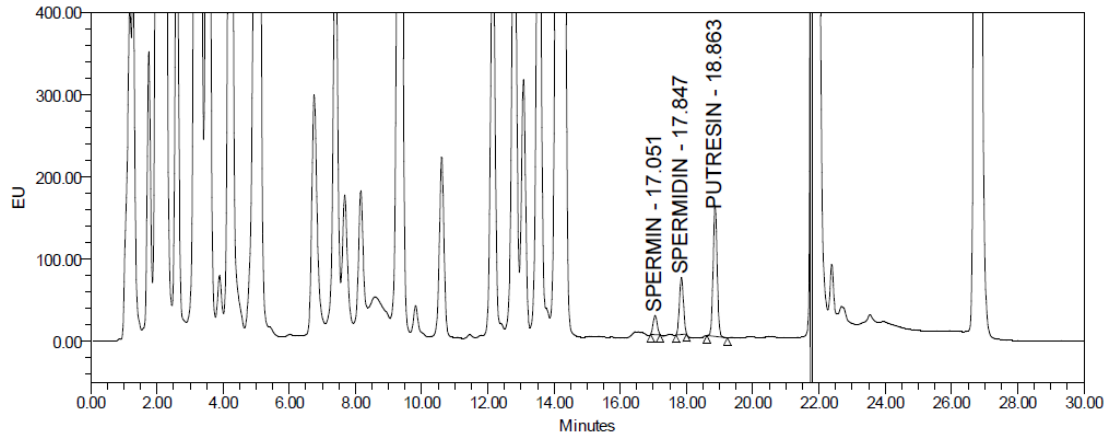
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.032	3628561	391818
2	SPERMIDIN	17.890	11275212	1324889
3	PUTRESIN	18.928	17885314	2156844

Şekil 6.2.3.3. %100'lük gün içi tekrarlanabilirlik kromatogramı



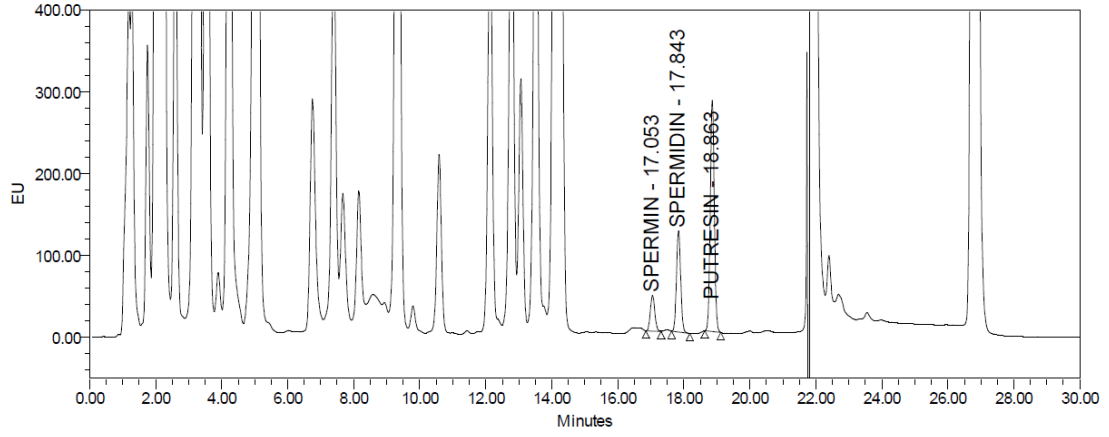
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.028	5684345	611799
2	SPERMIDIN	17.883	17751714	2046345
3	PUTRESIN	18.927	28991105	3539175

Şekil 6.2.3.4. %150'lik gün içi tekrarlanabilirlik kromatogramı



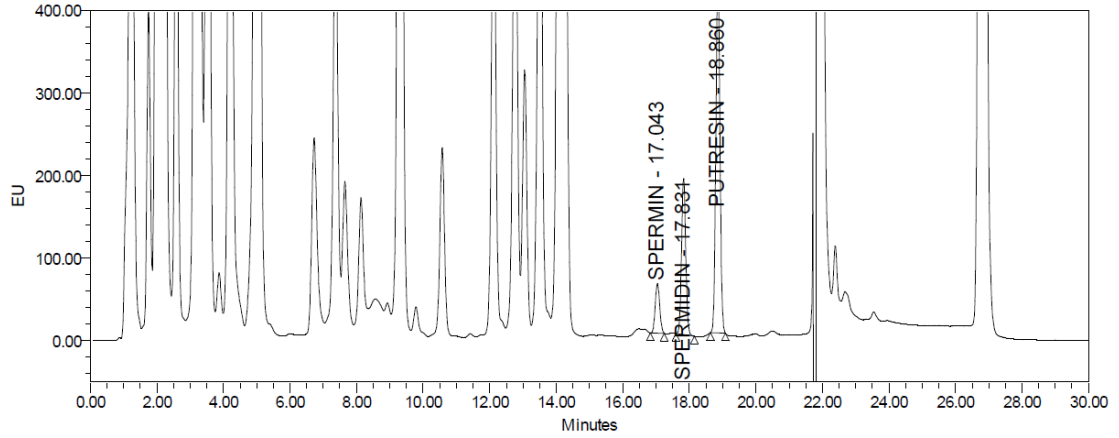
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.051	1927498	230539
2	SPERMIDIN	17.847	5820241	693583
3	PUTRESIN	18.863	13490665	1590446

Şekil 6.2.3.5. %50'lik günler arası tekrarlanabilirlik 1. gün kromatogramı



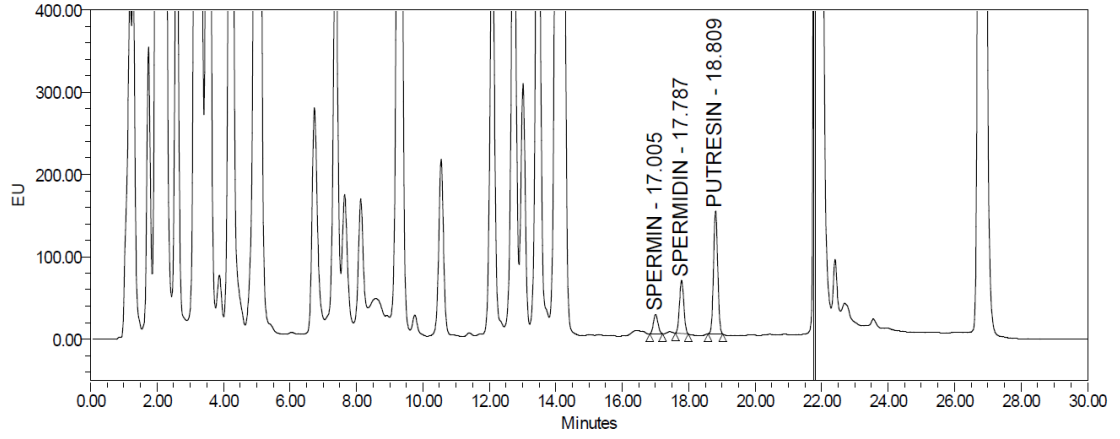
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.053	4070039	436431
2	SPERMIDIN	17.843	10951275	1240024
3	PUTRESIN	18.863	24167235	2827207

Şekil 6.2.3.6. %100'lük günler arası tekrarlanabilirlik 1. gün kromatogramı



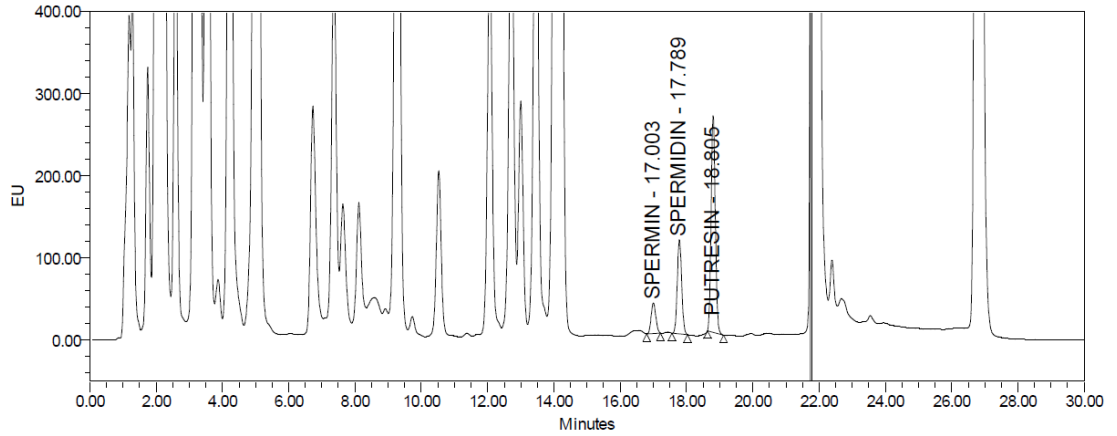
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.043	5583559	601694
2	SPERMIDIN	17.831	16614918	1891629
3	PUTRESIN	18.860	37278421	4349173

Şekil 6.2.3.7. %150'lik günler arası tekrarlanabilirlik 1. gün kromatogramı



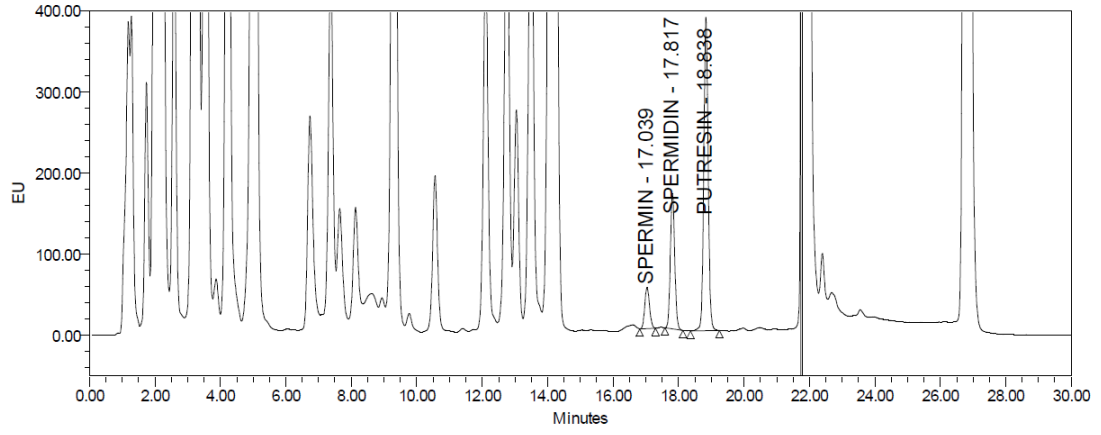
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.005	2212489	233777
2	SPERMIDIN	17.787	5856982	647104
3	PUTRESIN	18.809	13024678	1496824

Şekil 6.2.3.8. %50'lik günler arası tekrarlanabilirlik 2. gün kromatogramı



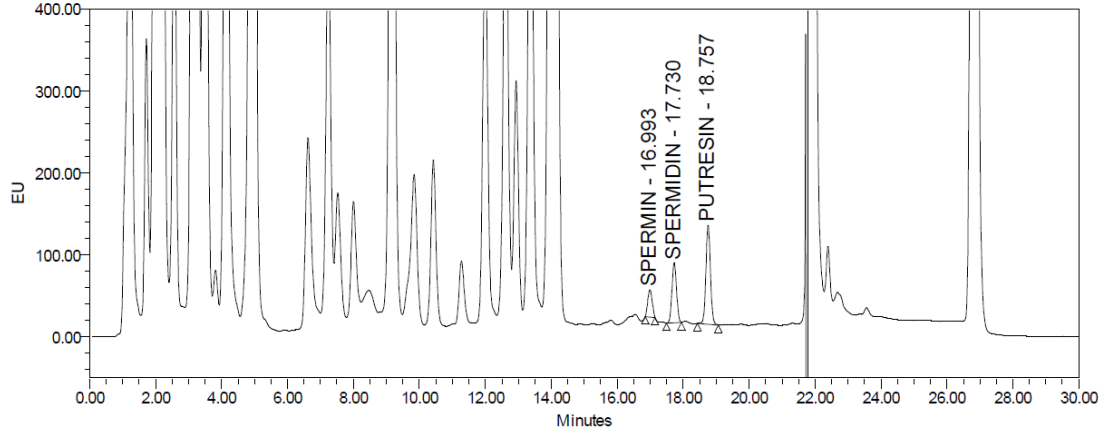
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.003	3622209	371524
2	SPERMIDIN	17.789	10647434	1149129
3	PUTRESIN	18.805	23282953	2639485

Şekil 6.2.3.9. %100'lük günler arası tekrarlanabilirlik 2. Gün kromatogramı



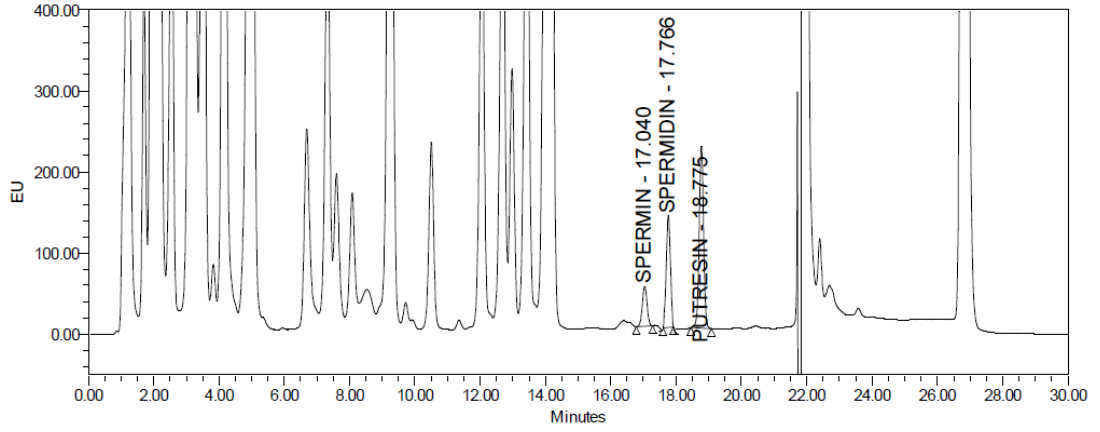
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.039	5117284	509685
2	SPERMIDIN	17.817	15508778	1667355
3	PUTRESIN	18.838	35890882	3870433

Şekil 6.2.3.10. %150'lik günler arası tekrarlanabilirlik 2. gün kromatogramı



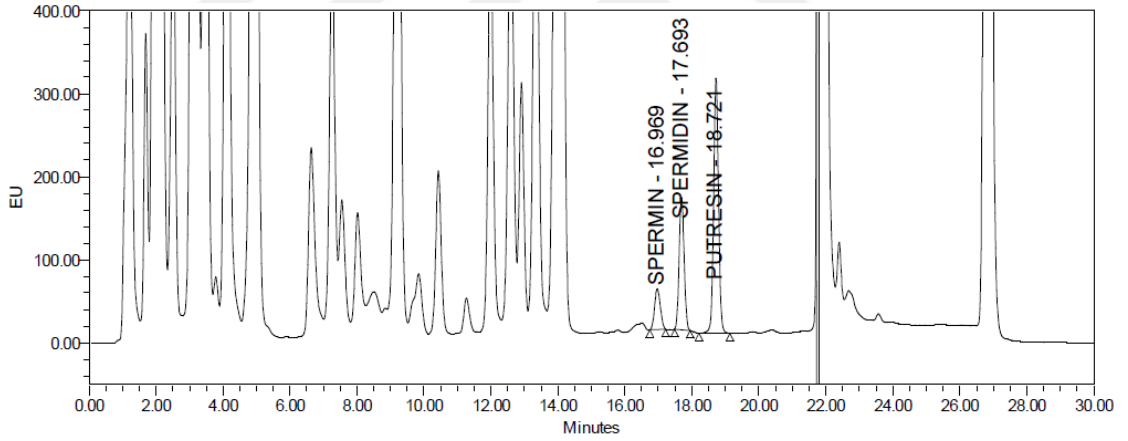
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	16.993	3112985	333827
2	SPERMIDIN	17.730	7092855	734306
3	PUTRESIN	18.757	11615328	1214359

Şekil 6.2.3.11. %50'lik günler arası tekrarlanabilirlik 3. gün kromatogramı



	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.040	4903915	494650
2	SPERMIDIN	17.766	11335546	1315432
3	PUTRESIN	18.775	20882202	2257173

Şekil 6.2.3.12. %100'lük günler arası tekrarlanabilirlik 3. gün kromatogramı



	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	16.969	5858900	493359
2	SPERMIDIN	17.693	16498612	1596553
3	PUTRESIN	18.721	31396772	3075410

Şekil 6.2.3.13. %150'lik günler arası tekrarlanabilirlik 3. gün kromatogramı

6.2.4. Geri Kazanım (Recovery) Çalışması

Geri kazanım çalışması için bölüm 5.8.4.'te anlatıldığı gibi standart eklenmiş serum numunelerinden her seviyeden 3'er adet numune hazırlandı ve 3'er tekrarlı olarak enjeksiyon yapıldı. Üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek) hazırlanan geri kazanım numunelerinin kromatogramları alındı. Elde edilen alanlardan eklenen konsantrasyonlar hesaplandı.

Geri kazanım değeri putresin için %89.55, spermidin için %89.62 ve spermin için %88.36 olarak bulundu. Bu sonuçlara göre geri kazanım yeterlidir. Putresin, spermidin ve spermin için metot validasyonu geri kazanım parametresi uygundur. Geri kazanım çalışma sonuçları putresin için Tablo 6.2.4.1.'de, spermidin için Tablo 6.2.4.2.'de ve spermin için Tablo 6.2.4.3.'te verilmiştir.

Tablo 6.2.4.1. Putresin geri kazanım çalışma sonuçları

Konsantrasyon Seviyesi	Eklenen Konsantrasyon(ng/ml)	Hesaplanan Konsantrasyon(ng/ml)	%Geri Kazanım
%50	49.33	47.00	95.28
	49.33	47.44	96.17
	49.33	43.45	88.08
%100	98.67	87.63	88.82
	98.67	82.82	83.93
	98.67	85.86	87.02
%150	148.00	133.24	90.03
	148.00	128.82	87.04
	148.00	132.64	89.62
Ortalama % Geri Kazanım Değeri (ng/ml):		89.55	
Geri Kazanım %95 Güven Aralığı Sınırları (ng/ml):		86.53-92.57	
Standart Sapma (ng/ml):		3.93	
Bağıl Standart Sapma (%):		4.39	

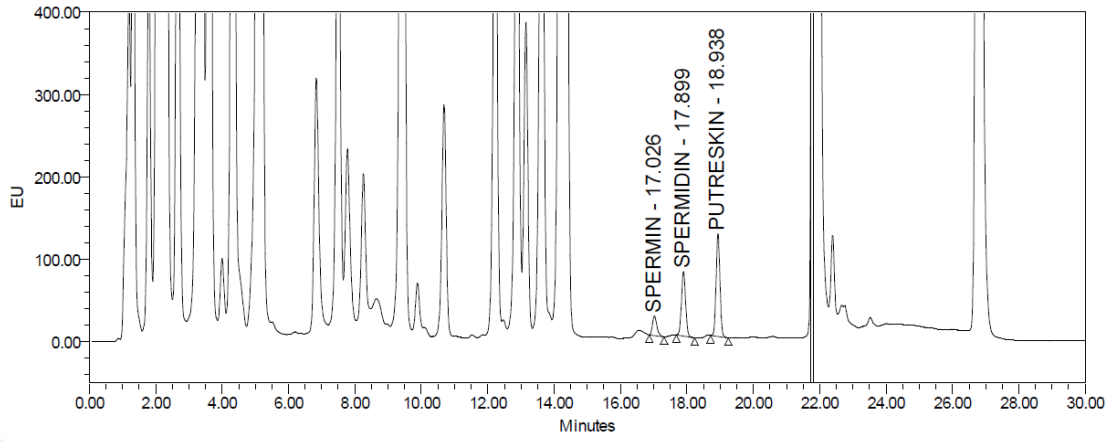
Tablo 6.2.4.2. Spermidin geri kazanım çalışma sonuçları

Konsantrasyon Seviyesi	Eklenen Konsantrasyon(ng/ml)	Hesaplanan Konsantrasyon(ng/ml)	%Geri Kazanım
% 50	51.09	52.31	102.39
	51.09	52.22	102.21
	51.09	48.90	95.71
% 100	102.18	88.13	86.25
	102.18	83.82	82.03
	102.18	86.81	84.96
% 150	153.27	130.83	85.36
	153.27	126.93	82.82
	153.27	129.98	84.81
Ortalama % Geri Kazanım Değeri (ng/ml):		89.62	
Geri Kazanım %95 Güven Aralığı Sınırları (ng/ml):		83.32-95.92	
Standart Sapma (ng/ml):		8.19	
Bağıl Standart Sapma (%):		9.14	

Tablo 6.2.4.3. Spermin geri kazanım çalışma sonuçları

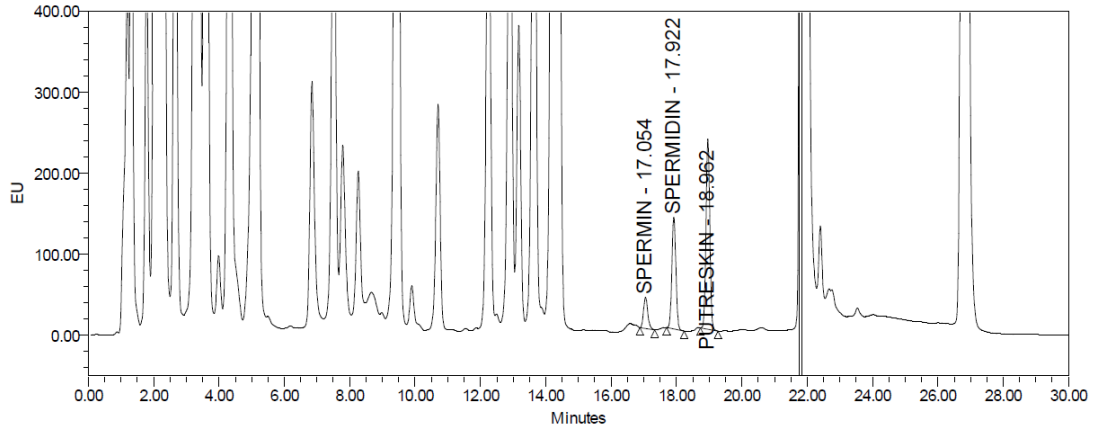
Konsantrasyon Seviyesi	Eklenen Konsantrasyon(ng/ml)	Hesaplanan Konsantrasyon(ng/ml)	%Geri Kazanım
% 50	51.46	53.65	104.26
	51.46	49.62	96.43
	51.46	46.71	90.77
% 100	102.92	84.82	82.42
	102.92	81.06	78.76
	102.92	84.79	82.38
% 150	154.38	129.61	83.95
	154.38	134.40	87.06
	154.38	137.73	89.22
Ortalama % Geri Kazanım Değeri (ng/ml):		88.36	
Geri Kazanım %95 Güven Aralığı Sınırları (ng/ml):		82.23-94.49	
Standart Sapma (ng/ml):		7.98	
Bağıl Standart Sapma (%):		9.03	

Uygulanan yöntem sonucu elde edilen geri kazanım çözelti kromatogramları aşağıda verilmiştir.



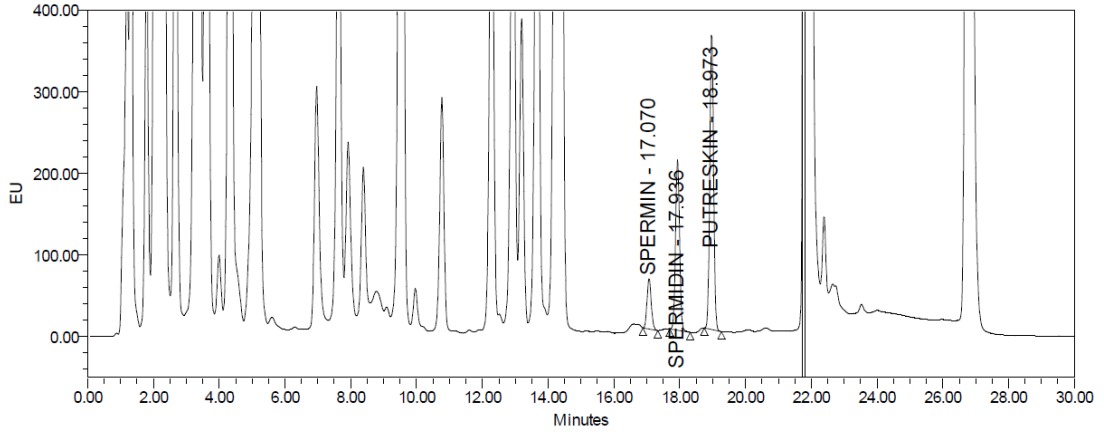
	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.026	2196323	241813
2	SPERMIDIN	17.899	6729971	782616
3	PUTRESKIN	18.938	10059504	1246774

Şekil 6.2.4.1. %50'lik geri kazanım çözelti kromatogramı



	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.054	3454060	385853
2	SPERMIDIN	17.922	11703606	1379811
3	PUTRESKIN	18.962	19101275	2350697

Şekil 6.2.4.2. %100'lük geri kazanım çözelti kromatogramı



	Peak Name	RT	Area	Height
1	SPERMIN	17.070	5448393	615289
2	SPERMIDIN	17.936	17739121	2087656
3	PUTRESKIN	18.973	29179813	3622869

Şekil 6.2.4.3. % 150'lik geri kazanım çözelti kromatogramı

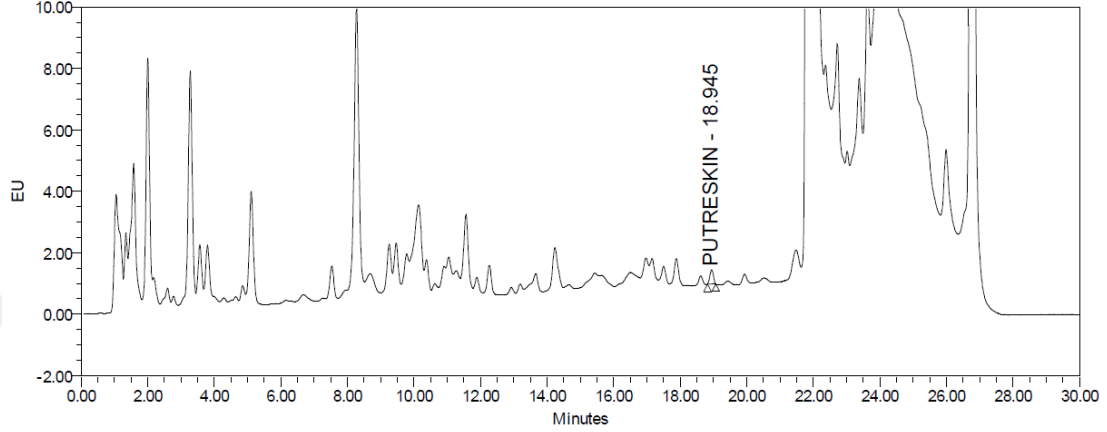
6.2.5. Miktar Tayini Alt Sınırı (LLOQ) Çalışması

Doğrusallık çalışma aralığındaki en küçük değerın altında derişimlere sahip bir seri çözelti hazırlandı. Bu çözeltiler enjeksiyon yapılarak kromatogramları alındı. Kromatogramlardan Empower 3 programı ile European pharmacopeia (EP) sinyal/gürültü (S/N) hesaplama yöntemine göre hesaplanan S/N değerinin 10 olduğu derişim LLOQ olarak belirlendi. Yöntemin LLOQ değerleri putresin için 0.2 ng/ml, spermidin için 0.5 ng/ml ve spermin için 1.0 ng/ml olarak belirlendi. LLOQ sonuçları Tablo 6.2.5.1.'de verilmiştir.

Tablo 6.2.5.1. Miktar tayini alt sınırı (LLOQ) sonuçları

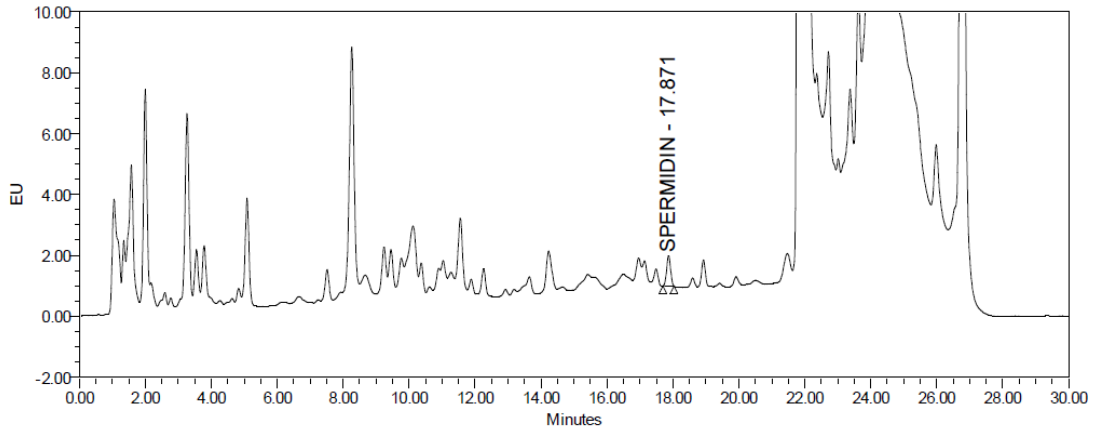
Etken Madde	LLOQ Derişmi (ng/ml)	Ortalama Alan	Ortalama S/N oranı
Putresin	0.2	33024	9.7
Spermidin	0.5	83864	11.3
Spermin	1.0	33853	7.4

Miktar tayini alt sınırı (LLOQ) sonucu elde edilen kromatogramlar putresin için Şekil 6.2.5.1.'de, spermidin için Şekil 6.2.5.2.'de ve spermin için Şekil 6.2.5.3.'te verilmiştir.



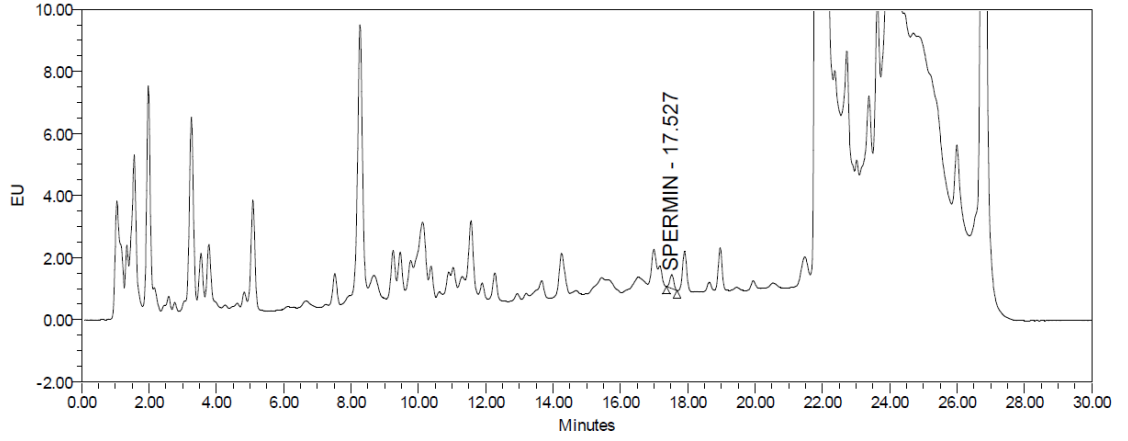
	Peak Name	RT	Area	Height	EP s/n
1	SPERMIN	17.219			
2	SPERMIDIN	17.985			
3	PUTRESKIN	18.945	33021	4583	10.9

Şekil 6.2.5.1. Putresin LLOQ çözelti kromatogramı



	Peak Name	RT	Area	Height	EP s/n
1	SPERMIN	17.219			
2	SPERMIDIN	17.871	82406	9952	10.9
3	PUTRESKIN	19.117			

Şekil 6.2.5.2. Spermidin LLOQ çözelti kromatogramı



	PeakName	RT	Area	Height	EP s/n
1	SPERMIN	17.527	35364	4481	8.6
2	SPERMIDIN	17.985			
3	PUTRESKIN	19.117			

Şekil 6.2.5.3. Spermin LLOQ çözelti kromatogramı

6.2.6. Stabilite Çalışması

Kısa süreli sıcaklık stabilite çalışması için bölüm 5.8.4.'te anlatıldığı gibi üç farklı seviyede poliamin spike edilmiş serum örnekleri hazırlandı. Bu örnekler 4 °C'de bekletilerek 0, 2, 4, 8, 12 ve 24'üncü saatlerde analiz edildi. Her bir seviye için alanlar belirlendi. Her bir çalışma için başlangıç alanları ile olan % değişimler tespit edildi. 24. Saat sonunda % değişim putresin için % 9.1, spermidin için % 9.9 ve spermin için % 9.8 olarak bulundu. Bu sonuçlara göre putresin, spermidin ve spermin çözeltileri 4 °C'de 24 saat stabildir. Stabilite sonuçları Tablo 6.2.6.1.'de verilmiştir.

Tablo 6.2.6.1. Kısa süreli sıcaklık stabilite çalışması sonuçları

Konsantrasyon Seviyesi	2. saat %Değişim	4. saat %Değişim	8. saat %Değişim	12. saat %Değişim	24. saat %Değişim
Putresin	5.1	5.7	7.3	8.9	9.1
Spermidin	4.8	4.2	5.6	5.1	9.9
Spermin	3.8	5.0	5.1	7.2	9.8

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Poliaminler (putresin, spermidin ve spermin), fizyolojik koşullar altında tamamen protonlanmış, ökaryotik ve prokaryotik hücrelerin temel bileşenleri olan basit alifatik primer aminlerdir. Hücre büyümesi ve farklılaşması ve reseptör fonksiyonunu içeren birçok hücre fonksiyonunun gerçekleştirilmesinde rol oynarlar (2). Ayrıca DNA replikasyonu, gen ekspresyonu, protein sentezi, lipidlerin stabilizasyonu, beyin gelişimi, sinir büyümesi ve rejenerasyonunu etkilemektedirler (94,3).

Poliamin araştırması, memelileri, bitkileri, protozoon parazitleri ve daha geniş çeşitlilikte poliaminlere sahip olan termofiller de dâhil olmak üzere birçok mikroorganizmayı kullanarak genetik, biyokimyasal ve fizyolojik çalışmaları kapsayan çok sayıda yayın içeren çok aktif bir alandır (95).

Poliaminlerin biyosentetik yolağı, paraziter hastalıkların, neoplazinin ve kanser gelişiminin kimyasal bileşiklerle önlenmesi tedavisinde yararlı ilaçların sentezi için geçerli bir hedef olarak ifade edilmiştir (35).

Poliaminler (putresin, spermidin ve spermin), fizyolojik koşullar altında tamamen protonlanmış, ökaryotik ve prokaryotik hücrelerin temel bileşenleri olan basit alifatik primer aminlerdir. Hücre büyümesi ve farklılaşması ve reseptör fonksiyonunu içeren birçok hücre fonksiyonunun gerçekleştirilmesinde rol oynarlar (2). Ayrıca DNA replikasyonu, gen ekspresyonu, protein sentezi, lipidlerin stabilizasyonu, beyin gelişimi, sinir büyümesi ve rejenerasyonunu etkilemektedirler. Poliaminlerin aşırı üretimi veya aşırı alımı hücreler için toksiktir ve oksidatif mekanizma ile hücre ölümünü kolaylaştırır veya baş ağrılarına, bulantı, hipo veya hipertansiyona ve kalp çarpıntısına neden olabilir (94,3). Bu bileşikler, olası tümör belirteçleri olarak da önerilmiştir (4,5,6,96). Klinik tanıda anlaşılan önemleri nedeniyle poliaminlerin ucuz, kolay, tekrarlanabilir bir metod ile tespiti gerekli hale gelmiştir.

Biyolojik sıvıların validasyonu için EMA ve FDA güncel olarak kılavuzlar yayımlamaktadırlar ve biyolojik sıvıların analitik metod validasyonlarında bu

kılavuzlar kullanılmaktadır (23). Bu kılavuzlarda belirtilen parametreler dikkate alınarak geliştirilen yöntemin analitik metot validasyonunda; seçicilik, doğrusallık, doğruluk ve kesinlik, geri kazanım, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik, LLOQ ve çözelti stabilitesi çalışmaları gerçekleştirildi.

Poliamin molekülleri absorpsiyon yapıcı fonksiyonel grupları bulundurmaması nedeniyle UV ve floresan absorpsiyon göstermezler (11,12,13). Poliaminlerin analizi için çeşitli yöntemler uzun yıllardır çalışılmıştır. Seiler ve ark. aminlerin tespiti için İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) yöntemini (14), İsobe ve ark. enzimatik assay yöntemini (15) önermişlerdir. Teknolojik gelişmelere paralel sıvı kromatografi sistemleri kullanılarak UV, floresan ve MS dedektörler ile birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Sethi ve ark. HPLC UV dedektör kullanarak poliaminlerin benzoil klorür türevlendirmesi ile tespiti için yöntem önermişlerdir (16). Koski ve ark. Aynı yöntemi dansil klorür türelendirmesi ile uygulamışlardır (17). Her iki çalışmada da aminlere UV absorpsiyon yapabilme kabiliyeti kazandıran fonksiyonel gruplar eklenerek UV dedektör ile tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda türevlendirme pre kolon türevlendirmesi olarak gerçekleştirilmiştir ve türevlendirme işlemi in-line olarak değil out-line olarak yapıldığı için örnek hazırlama süreci uzun, hatalara açık ve oldukça zahmetlidir. Sethi ve ark. çalışmasında numune hazırlık sürecinde 20 dk. bekletme, 15 dk. santrifüj işlemi ile çökertme, 2 defa dietil eter ekstraksiyon işlemi ile poliaminlerin organik faza alınması, azot gazı altında uçurma ve 229 nm dalga boyunda UV dedektörde analiz işlemi uygulanmaktadır. Çalışmamızda numune hazırlık aşamasında numuneler 1.5 M HClO₄ ve 2M K₂CO₃ kullanılarak proteinler çötürülmüş ve 3 dk. santrifüj işleminin ardından o-Fitalaldehit–N-asetil-L-sistein reaktiflerinden hazırlanan çözelti ile in-line türevlendirme yöntemi kullanılarak floresan dedektörde analiz gerçekleştirilmiştir. Sethi ve ark. ve Koski ve ark. çalıştıkları yöntemler uyguladığımız yönteme göre çok uzun numune hazırlık süresi, türevlendirmenin cihaz tarafından enjeksiyon öncesi in-line olarak değil numune hazırlık aşamasında out-line olarak yapılıyor olması ve floresan detektöre göre daha az seçici olan UV dedektörler ile yapılmış olması dezavantajlarını içerir. Bu nedenlerle çalıştığımız yönteme göre tekrarlanabilirlik ve hassasiyeti daha azdır.

Ducros ve ark. dansil klorür ile türevlendirme yöntemini LC-MS sistemi ile uygulayarak kırmızı kan hücrelerinde polimain tayini için yöntem önermişlerdir (18). Hunter ve ark. hem UV dedektör hem de floresan dedektörün kullanıldığı floreskamin türevlendirme yöntemi ile poliamin tayini için bir yöntem önermişlerdir (19). Falco ve ark. poliaminlerin o-Fitalaldehit–N-asetil-L-sistein reaktifleri kullanılarak HPLC sisteminde floresan türevlendirme yöntemi ile tespiti için yöntem önermiştir (20). Bu yöntemde floresan dedektör kullanılması bir avantaj sağlamıştır. Ancak türevlendirme işlemi in-line olarak değil out-line olarak yapıldığı için örnek hazırlama süreci uzun, hatalara açık ve oldukça zahmetlidir. Yine Dai ve ark. o-Fitalaldehit–N-asetil-L-sistein reaktifleri kullanılarak HPLC sisteminde floresan türevlendirme yöntemi ile poliaminlerin tespiti için yöntem önermiştir (21). Bu yöntem floresan dedektör kullanıma avantajını sunarken aynı zamanda pre kolon türevlendirme yöntemi ile türevlendirmelerin in-line olarak HPLC sistemi tarafından yapılması ile pre analitik hataların ve deney süresinin kısaltılmasının avantajlarını da sunmaktadır. Lopez ve ark. LC-MS sisteminde iyon değişim kromatografisi ile bitki örneklerinde poliamin tespiti için yöntem önermiştir (22) ve Liu ve ark. karaciğer kanseri hastalarının plazma ve idrar örneklerinde poliamin düzeylerinin tespiti için yöntem önermişlerdir (23). LC-MS sistemleri UV ve Floresan sistemlerine göre en seçici, hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar sunan sistemlerdir. Bu kriterler dikkate alındığında önerilen her iki yöntemde de LC-MS sisteminde uygulanması ve türevlendirme yapılmadan poliaminlerin direkt tespiti gibi avantajlar sunmakla birlikte kullandığı teknolojinin yüksek maliyetli olması dezavantajını içermektedir.

Teknolojik gelişmelere paralel MS sistemlerinin gelişmesi ile HPLC / Q-TOF-MS sistemleri ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Liu ve ark. HPLC / Q-TOF-MS sistemini kullanarak benzoil klorür türevlendirme işlemi ile insan plazmasında poliaminlerin miktarlarını tespit edebilmek için yöntem önermişlerdir (25). Bu sistemler HPLC UV ve floresan ve LC-MS sistemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir. Ancak numune hazırlığında pre kolon out-line türevlendirme yöntemi kullanımı ve sistem maliyetleri nedeniyle dezavantajlıdır.

HPLC yöntemleri, yüksek hassasiyet ve tekrarlanabilirlik ve otomasyon kolaylığı nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bizim hedefimiz ise, ters faz

kromatografisi(C18) HPLC tekniği kullanarak poliaminlerin ayrıştırılması ve nicelendirilmesi için; basit, hızlı, hassas, doğru ve kesin bir yöntemin geliştirilmesidir. Tüm bu çalışmalar dikkate alındığında geliştirilecek ve validasyonu yapılacak metotun klinik uygulamalarda kullanılabilir olması için; ucuz, hızlı, tekrarlanabilir ve pratik bir yöntem olması amaçlanmaktadır. Bu amaçla HPLC sisteminde floresan dedektörü ile o-Fitalaldehit–N-asetil-L-sistein reaktifleri kullanılarak pre kolon in-line türevlendirme yöntemi tercih edilmiştir.

Metot Geliştirme

Hareketli faz A bileşimi; Ters faz sıvı kromatografisinde bileşiklerin alıkonma zamanları önemlidir. Polarite hareketli faz sistemlerinde ayırım gücünün bir ölçüsüdür ve hareketli faz bileşimi ayırım gücünü etkiler. Çalışmada hareketli faz olarak Dai ve ark.(2014) önerdiği metotta belirtilen hareketli faz A 0.1 M sodyum asetat; pH 7.2 tamponu için öncelikle pH değışikliği denendi. Hareketli faz A pH oranları 0,1 M HCl ile pH 7.0, 6.5 ve 2.3, 0,1 M NaOH ile pH 7.5 ve 8.2'ye ayarlandı. Hareketli faz pH oranlarında yapılan değışim ile etkin bir ayırım sağlanamadı.

Hareketli faz B bileşimi; Etkin bir ayırım sağlamak amacıyla Dai ve ark. (2014) yönteminde belirtilen hareketli faz B olarak kullanılan metanol, asetonitril olarak değıştirildi. Asetonitril ile çeşitli gradient denemeler gerçekleştirildi. Yapılan tüm denemelerde metanole göre daha etkili ayrımlar sağlandı.

Kolon sıcaklığı; Ayrımanın arttırılmasında kolon sıcaklığı önemli bir parametredir. Bu nedenle kolonun çalışabileceği en uygun sıcaklığı belirlemek amacıyla kolon sıcaklığı 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C sıcaklıkları en uygun görülen gradient program ile denendi. Deneme sonucu en iyi ayrımanın 25 °C'de sağlandığı belirlendi.

Kromatografi kolonu; Kolonun dolgu maddesi, çapı, boyu ve dolgu maddesinin partikül büyüklüğü etkin bir ayırım için önemlidir. Kolon denemesi için öncelikle aynı uzunluk, çap ve partikül büyüklüklerine sahip fakat farklı dolgu maddeleri içeren kolonlar denendi. Bu amaçla C8 ve C18 dolgu maddeleri içeren

kolonlar denendi. En iyi ayırım ve pik şekli C18 dolgu maddesine sahip kolonda elde edildi.

Dalga boyu denemesi; yapılan literatür taramaları sonucunda Dai ve ark. (2014)'nın önerdiği dalga boyunun gerçekleştirilen türevlendirme yöntemine en uygun olan dalga boyu olduğu için metod geliştirme aşamasında dalga boyu denemesi gerçekleştirilmedi. Seçicilik çalışmasında alınan spektrumlarla çalışılan dalga boyunun ideal dalga boyu olduğu tespit edildi.

Şırınga filtre denemesi; çözeltilerden gelebilecek çözünmemiş partiküllerin kolona ve cihaz hatlarına zarar vermesini önlemek amacıyla şırınga filtreleri kullanmak önemlidir. Kullanılacak filtrenin yapısı etken madde içeriğini absorblamayacak ancak diğer çözünmemiş partikülleri tutabilecek geçirgenliğe sahip olmalıdır. Bu nedenle 0.45 µm por çapına sahip Regenerated Cellulose (RC), Polytetrafluoroethylene (PTFE) ve Polyvinylidene Fluoride (PDVF) filtreler denendi. En iyi geri kazanım 0.45 µm PTFE filtre ile elde edildi.

Enjeksiyon Hacmi; Enjeksiyon hacmi kolon yükleme kapasitesini aşmamalı ve dedektörü satüre edecek konsantrasyonda olmamalıdır. Bu amaçla enjeksiyon hacmi denemeleri standart çözeltiden 5 µl, 10 µl, 50 µl ve 100 µl olarak gerçekleştirildi. En uygun enjeksiyon hacminin 10 µl'de sağlandığı tespit edildi.

Gradient program; Serum örneklerinde poliamin standartları alıkonma zamanlarında gelen girişimleri ortadan kaldırmak amacıyla gradient program denemeleri yapıldı. Referans olarak alınan Dai ve ark. (2014) yöntemindeki gradient program ile poliamin pikleri alıkonma zamanlarında girişim olduğu gözlemlendi. Bu girişimleri ortadan kaldırmak amacıyla gradient programının polaritelerinde değişiklikler yapıldı. Hareketli faz A oranının 0. dk.'da %95, %70, %60 ve %50 ile başlayarak 25 dk. sonunda %30'a kadar düştüğü gradient program denemeleri gerçekleştirildi. En iyi ayırım 0. dk.'da %95 ile başlayarak 25 dk. sonunda %30'a düştüğü gradient programda alındı. Bu gradient programda serum numunelerinden gelen girişimlerin ilk 14 dk.'da kolonu terk ettiği gözlemlendi.

Numune Hazırlık ve Poliaminlerin Türevlendirilmesi

Poliaminler suda iyi çözünen yüksek polariteye sahip bileşiklerdir. Bu nedenle serum örneklerinde öncelikle proteinler çöktürüldü. Bu işlem için serum örneği 1.5 M HClO₄ eklendi. Proteinlerin çöktürülmesi işleminde pH önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle tampon etkisi ve pH ayarlaması amacıyla çöktürmenin tamamlanması için numune çözeltisine 2 M K₂CO₃ eklenerek santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant sıvı HPLC vialinde son hacmine tamamlanarak enjeksiyonu yapıldı.

Numune hazırlık aşamasında en önemli kriter geri kazanım oranlarının uygunluğudur. Bu nedenle poliamin geri kazanımlarını tespit etmek amacıyla numune hazırlama basamakları için çalışmalar yapıldı. İlk olarak santrifüj süreleri denendi. Santrifüj süreleri 3, 5, 10 ve 15 dk. olmak üzere 14000 g'de denemeler yapıldı. En iyi geri kazanım 3 dk. ve 14000 g'de elde edildi. Burada elde edilen geri kazanım spermin için %60, spermidin için %80 ve putresin için %70 bulundu. Santrifüj süresinin geri kazanımı etkilediği görüldü ve en ideal süre olarak 3 dk. belirlendi.

Santrifüj hızını geri kazanım miktarlarını etkileyen diğer bir parametre olduğu için bu aşamada denemeler yapıldı. Sırası ile 5000, 14000 ve 15000 g'de yapılan denemeler sonucu en iyi geri kazanım oranlarının 14000 g'de olduğu belirlendi. Bu sayede numune hazırlama basamağı 15 dk. santrifüj süresi ve 15000 g dönme hızından 3 dk. ve 14000 g dönme hızına düşürülerek süre kısaltılmış oldu. Ayrıca geri kazanım oranları %90 üzerine çekilmiş oldu.

Türevlendirme işlemi için konsantrasyon denemeleri gerçekleştirildi. En ideal sonuç 1:1 opa-nac türevlendirme karışımı ile elde edildi. Türevlendirme işlemini oto örnekleyicide örnek ve türevlendirme çözeltisi HPLC sisteminin türevlendirme hattında karıştırılarak gerçekleştirilmektedir. Bu işlemde Dai ve ark. önerdiği 10 µl numune ve 10 µl türevlendirme çözeltisi en ideal enjeksiyon hacmi ve karışımı olarak tespit edildi.

Metot Validasyonu

Seçicilik çalışmasında standart çözeltisinin 30 dk.'lık gradient program ile enjeksiyonu sonucunda elde edilen alıkonma zamanları yaklaşık olarak putresin için 19.2 dk. , spermidin için 18.0 dk. ve spermin için 17.1 dk. olarak bulundu. Empower 3 programından elde edilen purity angle ve purity threshold değerleri sırasıyla putresin için 0.570 ve 1.103, spermidin için 0.361 ve 0.406, spermin için 1.144 ve 1.241 olarak bulundu. Bu verilere göre geliştirilen yöntemde pik saflıkları uygundur ve pikler saf olarak elde edilmiştir. Dai ve ark. uyguladıkları yöntemde uyguladıkları 30 dk.'lık gradient program sonucunda alıkonma zamanlarını yaklaşık olarak putresin için 12.2 dk. , spermidin için 11.1 ve spermin için 14.1 olarak bulmuştur (21).

Putresin, spermidin ve spermin için LLOQ dâhil doğrusallık limitleri sırasıyla 0.1-250 ng/ml, 0.5-250 ng/ml, 1-250 ng/ml bulundu. Korelasyon değerleri sırasıyla 0.9998, 0.9990 ve 0.9968 olarak bulundu. Liu ve ark. doğrusallık limitlerini her bir poliamin için 0.4-200.0 ng/ml ve korelasyon değerlerini sırasıyla 0.9941, 0.9939 ve 0.9937 olarak bulmuştur (25). Yaptığımız çalışma sonucu bulunan değerler FDA ve EMA validasyon kılavuzlarında belirtilen kriterleri sağlamaktadır (26).

Putresin, spermidin ve spermin için miktar tayini alt sınırı değerleri sırasıyla 0.2 ng/ml, 0.5 ng/ml ve 1.0 ng/ml olarak bulundu. Liu ve ark. miktar tayini alt sınırı değerlerini 0.02-0.1ng/ml aralığında bulmuştur (25).

Geri kazanım değerleri putresin için %89.6, spermidin için %89.6 ve spermin için %88.4 olarak bulundu. Liu ve ark. geri kazanım değerlerini putresin için %80.6, spermidin için %79.5 ve spermin için %84.0 olarak bulmuştur (25). FDA kılavuzuna göre analitin geri kazanımının % 100 olması istenmekle beraber bir analitin ve dâhili standardın geri kazanım derecesi tutarlı, kesin ve tekrarlanabilir olmalıdır (26). Yapılan çalışmada %100'e yakın bir yüksek geri kazanım elde edilerek; tutarlı, kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar yöntemin geri kazanım derecesinin uygun olduğunu göstermektedir.

Putresin, spermidin ve spermin için sırasıyla gün içi doğruluk değerleri %6.3-13.6, %3.4-8.6, %1.5-6.0 bulundu. Liu ve ark. sırasıyla gün içi doğruluk değerlerini

%7.8-9.3, %5.0-14.0, %3.9-7.9 olarak bulmuştur (25). FDA kriterlerine göre doğruluk değerleri %15'in altında olmalıdır (26). Yapılan bu çalışmada tüm değerler %15'in altında bulunarak yöntemin doğruluk kriterleri sağlanmıştır.

Putresin, spermidin ve spermin için sırasıyla gün içi kesinlik değerleri %0.9-1.7,%0.2-0.3, %0.1-0.7 bulundu. FDA kriterlerine göre kesinlik değerleri %15'in altında olmalıdır (26). Yapılan bu çalışmada tüm değerler %15'in altında bulunarak kesinlik kriterleri sağlanmıştır.

Putresin, spermidin ve spermin için sırasıyla günler arası doğruluk değerleri %5.7-12.4, %6.1-9.1, %4.5-12.6 bulundu. Liu ve ark. sırasıyla günler arası doğruluk değerlerini %4.3-9.8, %7.3-11.1, %2.9-3.5 olarak bulmuştur (25). FDA kriterlerine göre doğruluk değerleri %15'in altında olmalıdır (26). Yapılan bu çalışmada tüm değerler %15'in altında bulunarak yöntemin doğruluk kriterleri sağlanmıştır.

Putresin, spermidin ve spermin için sırasıyla gün içi kesinlik değerleri sırasıyla %6.2-9.7, %1.6-6.1, %5.4-13.8 bulundu. FDA kriterlerine göre kesinlik değerleri %15'in altında olmalıdır (26). Yapılan bu çalışmada tüm değerler %15'in altında bulunarak kesinlik kriterleri sağlanmıştır.

Sonuç olarak; serum örneklerinin klinik laboratuvarlarda rutin analizi için hassas, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Bu çalışma genişletilerek biyolojik sıvıların tümü için uygulanabilir hale getirilebilir ve rutin analizler için uygulanabilir.

8. KAYNAKLAR

1. Williams, K. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.* 325 (Pt 2, 289–97 (1997).
2. Alsouz, M. A. K. Separation And Determination Of Benzoylated Polyamines (Spermidine Andspermine) Using Hplc Techniqe. *Chem. Mater. Res.* 7, 33–38 (2015).
3. Teti, D., Visalli, M. & McNair, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 781, 107–149 (2002).
4. Ma, Y., Liu, G., Du, M. & Stayton, I. Recent developments in the determination of urinary cancer biomarkers by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 25, 1473–84 (2004).
5. Gerner, E. W. & Meyskens, F. L. Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer* 4, 781–792 (2004).
6. Criss, W. E. A review of polyamines and cancer. *Turkish J. Med. Sci.* 33, 195–205 (2003).
7. Milovic, V. Polyamines in the gut lumen: Bioavailability and biodistribution. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 1021–1025 (2001).
8. Li, L. et al. Rapid and simultaneous determination of hair polyamines as N-heptafluorobutyryl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 876, 257–260 (2008).
9. Ubhi, B. K. et al. Analysis of chloroformate-derivatised amino acids, dipeptides and polyamines by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 934, 79–88 (2013).
10. Aygün O., M. Biyojen Aminler - Süt ve Süt Ürünlerindeki Varlığı ve Önemi Giriş. 22, 91–95 (2003).
11. Häkkinen, M. R. et al. Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45, 625–634 (2007).
12. Shen, X. & Tomellini, S. A. Indirect photometric and fluorometric detection in high-performance liqued chromatography: A tutorial review. *Crit. Rev. Anal.*

- Chem. 37, 107–126 (2007).
13. Draisci, R. et al. Improved ion chromatography-integrated pulsed amperometric detection method for the evaluation of biogenic amines in food of vegetable or animal origin and in fermented foods. *J. Chromatogr. A* 798, 109–116 (1998).
 14. Seiler, N. Identification and quantitation of amines by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A* 63, 97–112 (1971).
 15. Isobe, K., Yamada, H., Soejima, Y. & Otsuji, S. A rapid enzymatic assay for total blood polyamines. *Clin. Biochem.* 20, 157–161 (1987).
 16. Sethi, R., Chava, S. R., Bashir, S. & Castro, M. E. An Improved High Performance Liquid Chromatographic Method for Identification and Quantization of Polyamines as Benzoylated Derivatives. *Am. J. Anal. Chem.* 02, 456–469 (2011).
 17. Koski, P., Helander, I. M., Sarvas, M. & Vaara, M. Analysis of polyamines as their dansyl derivatives by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 164, 261–266 (1987).
 18. Ducros, V. et al. Determination of dansylated polyamines in red blood cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 390, 46–51 (2009).
 19. Hunter, K. J. & Fairlamb, A. H. and Amino Acids by a Fluorescamine-HPLC. *J. Chromatogr. A* 79, 125–130 (1983).
 20. Campíns-Falcó, P., Molins-Legua, C., Sevillano-Cabeza, A. & Tortajada Genaro, L. A. O-phthalaldehyde-N-acetylcysteine polyamine derivatives: Formation and stability in solution and in C18 supports. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 759, 285–297 (2001).
 21. Dai, Z., Wu, Z. & Wang, J. Analysis of polyamines in biological samples by HPLC involving pre-column derivatization with o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine. 1557–1564 (2014). doi:10.1007/s00726-014-1717-z
 22. Sánchez-López, J. et al. Underivatized polyamine analysis in plant samples by ion pair LC coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 592–598 (2009).
 23. Liu, R. et al. Determination of polyamine metabolome in plasma and urine by

- ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: Application to identify potential markers for human hepatic cancer. *Anal. Chim. Acta* 791, 36–45 (2013).
24. González, O. et al. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *J. Chromatogr. A* 1353, 10–27 (2014).
 25. Liu, R. et al. Determination of polyamines in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 47, 1341–1346 (2012).
 26. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. *Guid. Ind.* 1–22 (2013).
 27. EMA. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA, *Comm. Med. Prod. Hum. Use* 44, 1–23 (2012).
 28. Dekarboksilaz, P. S. & Yerlikaya, A. Derleme [Review Article] Polyamines and S-Adenosylmethionine Decarboxylase. *J. Biochem.* 29, 208–214 (2004).
 29. Moinard, C., Cynober, L. & de Bandt, J. P. Polyamines: Metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.* 24, 184–197 (2005).
 30. Xiong, X. & Zhai, S. Rapid and Simultaneous Quantification of Polyamines in Human Plasma by LC–MS/MS After Pre-column Derivatization with N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide. *Chromatographia* 79, 561–570 (2016).
 31. Weisell, J. M. Structure and Function of Charge Deficient Polyamines. University of Eastern Finland. 17-35 (2012)
 32. Stadnik, J. & Dolatowski, Z. J. Biogenic Amines in Meat and Fermented Meat Products. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 9, 251–263 (2010).
 33. Murphy, G. M. Polyamines in the human gut. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 1011–1014 (2001).
 34. Akyol, V. Gıdalarda Biyojen Aminler Biogenic Amines in Foods. 11, 294–305 (2015).
 35. Coleman, C. S., Hu, G. & Pegg, A. E. Putrescine biosynthesis in mammalian tissues. *Biochem. J.* 379, 849–855 (2004).

36. Kalač, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005-mid 2013. *Food Chem.* 161, 27–39 (2014).
37. Casero, R. A. & Marton, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 373–390 (2007).
38. Silla Santos, M. H. Biogenic amines: Their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 213–231 (1996).
39. Büyükuslu, N. Besinlerin Poliamin İçerikleri. *J. Marmara Univ. Inst. Heal. Sci.* 4, 105–110 (2014).
40. Soda, K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30, 1–9 (2011).
41. Brzozowski, T., Koniurek, S. J., Drozdowicz, D., Dembinski, A. & Stachura, J. Healing of chronic gastric ulcerations by L-arginine. *Digestion* 56, 463–471 (1995).
42. Takigawa, M. et al. Tumor angiogenesis and polyamines: alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits B16 melanoma-induced angiogenesis in ovo and the proliferation of vascular endothelial cells in vitro. *Cancer Res.* 50, 4131–4138 (1990).
43. Takahashi, Y., Mai, M. & Nishioka, K. Alpha-Difluoromethylornithine Induces Apoptosis As Well As Anti-Angiogenesis in the Inhibition of Tumor Growth and Metastasis in a Human Gastric Cancer Model. *Int. J. Cancer* 85, 243–247 (2000).
44. Cipolla, B. G., Havouis, R. & Moulinoux, J. P. Polyamine contents in current foods: A basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients. *Amino Acids* 33, 203–212 (2007).
45. Seiler, N. & Raul, F. Polyamines and the Intestinal Tract. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 44, (2007).
46. Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M. & Vidal-Carou, M. C. In vitro antioxidant activity of dietary polyamines. *Food Res. Int.* 51, 141–147 (2013).
47. Tkachenko, A., Nesterova, L. & Pshenichnov, M. The role of the natural



- polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 176, 155–157 (2001).
48. Seiler, N. & Raul, F. Polyamines and apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 623–642 (2005).
 49. Lefèvre, P. L. C., Palin, M. F. & Murphy, B. D. Polyamines on the reproductive landscape. *Endocr. Rev.* 32, 694–712 (2011).
 50. Thomas, T. & Thomas, T. J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 244–258 (2001).
 51. Minois, N., Carmona-Gutierrez, D. & Madeo, F. Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany, NY)*. 3, 716–732 (2011).
 52. Karovicova, J. & Kohajdova, Z. Biogenic Amines in Food. *ChemInform* 36, (2005).
 53. Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L. & Holzapfel, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* 5, 42–49 (1994).
 54. Arruabarrena-Aristorena, A., Zabala-Letona, A. & Carracedo, A. Oil for the cancer engine: The cross-talk between oncogenic signaling and polyamine metabolism. *Sci. Adv.* 4, 1–12 (2018).
 55. Doğan, A., Otlu, S. & Büyük, F. Sisteamin , Putresin ve Sisteamin-Putresin Kombinasyonunun Bazı Bakteriler Üzerine Etkileri Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-6928 Effects of Cysteamine , Putrescine and Cystemine-Putrescine Combination on some Bacterium. 18, 1015–1019 (2012).
 56. Yuan, Q., Ray, R. M., Viar, M. J. & Johnson, L. R. Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells. 38164, 130–138 (2012).
 57. Pegg, A. E., McCann, P. P., Marton, L. J. & Pegg, A. E. Polyamine metabolism and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 55–91 (1982).
 58. Büyüksulu, N. & Eröz, S. E. Poliaminler ve Kanser; Kanserli Hastaların Beslenmesinde Poliaminlerin Rollerini. 5, 123–128 (2015).
 59. Guerra, G. P., Rubin, M. A. & Mello, C. F. Modulation of learning and

- memory by natural polyamines. *Pharmacol. Res.* 112, 99–118 (2016).
60. Santa, T., Al-Dirbashi, O. Y. & Fukushima, T. Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for biomedical analysis. *Drug Discov Ther* 1, 108–118 (2007).
 61. Ranade, V. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research (EMPA) 13, (2006).
 62. Katz E., Eksteen R., Schoenmakers P., Miller N., *Handbook of HPLC, Chromatographic Science Series, Volume 78*. 210-252 (1998)
 63. Snyder, L. R. & Kirkland, J. J. *Solvents. Introduction to Modern Liquid Chromatography* (1979).
 64. A. O. F. B. et al. SOFTbank E-Book Center Tehran, Phone: For Educational Use. *Environmental Chemistry* (2000). doi:10.1002/9781444308785
 65. Agilent Technologies. *The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development*. 163 (2015).
 66. Soediono, B. Introduction. *Principles of Instrumental Analysis* 53, (2007).
 67. Thammana, M. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Res. Rev. J. Pharm. Anal. RRJPA* 5, 22–28 (2016).
 68. Union, I., Pure, O. F. & Chemistry, A. International Union Of Pure And Applied Chemistry Scientific Committee , Analytical Section Expert Panel On Quantities And Unitst Quantities And Units In Clinical Chemistry : Nebulizer And Flame Properties In Flame Emission And. 58, 1737–1742 (1986).
 69. Gündüz T. *İnstrümental Analiz*. Gazi Kitapevi, Ankara, 2002: 101.
 70. Wiberg K. *Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions*. Baski. Institutionen för analytisk kemi, Univ., 2004.
 71. Holler F, Nieman T, Skoog D. *Principles of instrumental analysis*. Saunders College Publishing, Philadelphia, 1998.
 72. Wiberg, K. *Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions*. (2004).
 73. Nomanbhay, S. & Ong, M. Y. A Review of Microwave-Assisted Reactions for Biodiesel Production. *Bioengineering* 4, 57 (2017).
 74. Gauglitz, E. G. *Handbook of Spectroscopy Near-Infrared Spectroscopy Handbook of Analytical Techniques In-situ Spectroscopy in Heterogeneous*

- Catalysis. *Journal of the American Chemical Society* 126, (2003).
75. Hollas JM. *Modern spectroscopy*. 4th Baskı. Chichester ; Hoboken, NJ, J. Wiley, 2004.
 76. Mayerhöfer, T. G., Mutschke, H. & Popp, J. Employing Theories Far beyond Their Limits—The Case of the (Boguer-) Beer–Lambert Law. *ChemPhysChem* 1948–1955 (2016). doi:10.1002/cphc.201600114
 77. Swinehart, D. F. The Beer-Lambert Law. *J. Chem. Educ.* 39, 333 (1962).
 78. Nikalje P. A., *A Handbook of Chromatography*. 2–3 (2017).
 79. Günzler H. and Gremlich H.-U., *IR Spectroscopy. An Introduction*, Wiley-VCH, Weinheim (2002).
 80. Pharmacopoeia, E. *Elaboration Of Technical guide for the*. (2015).
 81. Hagel, L., Jagschies, G. & Sofer, G. *Handbook of Process Chromatography*. *Handbook of Process Chromatography* (2008). doi:10.1016/B978-012374023-6.50010-5
 82. Mayr, C. M. & Schieberle, P. Development of Stable Isotope Dilution Assays for the Simultaneous Quantitation of Biogenic Amines and Polyamines in Foods by LC-MS/ MS. (2012). doi:10.1021/jf204900v
 83. T., O. *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy*. Hewlett-Packard Co. 38–61 (1996). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 84. Owen, T. Principles and applications of UV-visible spectroscopy. *Fundam. UV-visible Spectrosc.* 18 (1996).
 85. Prathap, B. et al. Analytical method development and validation for the simultaneous estimation of olmesartan medoxomil and hydrochlorothiazide in combined tablet dosage form by Rp-hplc. *J. Pharm. Chem.* 4, 71–74 (2010).
 86. Huber, L. Validation of Analytical Methods. *Agil. Technol.* 2, 1–65 (2010).
 87. Moein, M. M., El Beqqali, A. & Abdel-Rehim, M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1043, 3–11 (2017).
 88. World Health Organization. *Handbook: Good Laboratory Practice*. *Dict. Pharm. Med.* 82–82 (2009). doi:DOI 10.2471/TDR.09. 978-924-1547550
 89. Environment Directorate OECD. *OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring*. *Ann. Ist. Super. Sanita* 33, 1–

- 172 (1997).
90. Ich. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Int. Conf. Harmon. 1994, 17 (2005).
 91. Wharf, C. & Kingdom, U. European Medicines Agency Guideline on bioanalytical method validation. 44, 1–23 (2012).
 92. FDA. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guid. Ind. 1–15 (2015).
 93. Doç, Y. & Lg, D. İ. L. E. K. B. İ. 11k Bilimlcri Ens. (2014).
 94. Manning, W. J. Invited review. Environ. Pollut. 138, 377 (2005).
 95. Pegg, A. E. Mammalian polyamine metabolism and function. IUBMB Life 61, 880–894 (2009).
 96. Wallace, H. M. & Caslake, R. Polyamines and colon cancer. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 13, 1033–1039 (2001).

9. ETİK KURUL ONAYI

	
T.C. İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı	
Sayı : 10840098-604.01.01-E.25326 Konu : Etik Kurulu Kararı	E-İmzalıdır 31/07/2017
Sayın Doç. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI	
<p>Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "HPLC Floresans Dedektör ve LC-MS/MS Yöntemleriyle Poliaminlerin Serum ve İdrarda Saptanması İçin Metod Geliştirme ve Validasyonlarının Yapılması" isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.</p>	
Bilgilerinize rica ederim.	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı	
Ek: -Karar Formu (2 sayfa)	
<small>Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 31.07.2017 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınıza https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza linkinden 2DB59AE6X1 kodu ile doğrulayabilirsiniz.</small>	
İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacak Mah. Ekineler Cad.No:19 Kavacak Kavsağı 34810 Beykoz/İSTANBUL	Tel: 444 85 44 İnternet: www.medipol.edu.tr Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	HPLC Floresans Dedektör ve LC-MS/MS Yöntemleriyle Poliaminlerin Serum ve İdrarda Saptanması İçin Metod Geliştirme ve Validasyonlarının Yapılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADISOYADI	Doç. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Taribi	Yersiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ PLANI	27.07.2017		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	BİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	27.07.2017		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No: 277		Tarih: 28/07/2017			
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Prof. Dr. Hasefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kuruma	Cinsiyet		Araştırma ile ilgili		Karar *		İmza
Prof. Dr. Serif DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hasefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	2.
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiki-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	3.
Yrd. Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	4.
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Hilmet ÖÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	5.

* :Toplantıda Bulunan



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.10020
Konu : Etik Kurulu Hk.

27/03/2018

Sayın Doç. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI

Üniversitemizin Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 28/07/2017 tarihinde 277 karar no ile onay verdiği "HPLC Floresans Dedektör ve LC-MS/MS Yöntemleriyle Poliaminlerin Serum ve İdrarda Saptanması İçin Metod Geliştirme ve Validasyonlarının Yapılması" başlıklı konunun çalışma başlığının "HPLC Floresans Dedektör Kullanılarak Poliaminlerin Serumda Saptanması İçin Metod Geliştirme ve Validasyonlarının Yapılması" olarak değiştirilmesi, çalışmanın HPLC metodu ve serum ile sınırlı tutulup, LC-MS/MS yöntemi ve numune türü olarak idrarın çalışmadan çıkarılması isteğiniz uygun bulunmuş olup, kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 27.03.2018 tarihinde e-İmzalanmıştır. Evrakınız <https://diysa.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 2D3B9957XF kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinçiler Cad.No:19 Kavacak Kevşakı 34810
Beşiktaş/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin: bilgi@medipol.edu.tr

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı :	Orhan Çakan
E-mail :	orhancakan@hotmail.com.tr

Eğitim Bilgileri

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	-	-
Yüksek Lisans	Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kalite Yönetimi (Tezsiz)	2015
Lisans	Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya (Normal Öğretim)	2009
Lise	Bağcılar Barbaros Lisesi	2004

Deneyim / İşyeri Bilgileri

Görevi	Kurum	Tarih
Araştırmacı Kimyager	Medipol Üniversitesi REMER Proteomik Lab.	10.2015-
Ar-Ge Analitik Geliştirme Uzmanı	World Medicine İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş.	08.2013-10.2015
Hammadde Kalite Kontrol Uzmanı	Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A.Ş.	03.2011-08.2013
Üretim Sorumlusu	Acto Pharma Hijyen San. Tic. A.Ş.	05.2010-03.2011

Bilgisayar/Program Bilgileri

Program	Kullanma Becerisi
MS Office	Çok iyi
MS Project	İyi
Empower	Çok iyi
Masslynx	Çok iyi
ChemStation	Çok iyi

Yabancı Dil Bilgileri

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Bilimsel Yayınlar

Yayın Türü	Yayın İçeriği	Tarih
Bildiri	M. SÜRMEK, S. SÜRMEK, O. ÇAKAN, S. PENÇE, I. YAYLIM, A. KARADAG & N. EMEKLI, Amonyum Bikarbonatın Kütle Spektrometresi Tabanlı Protein Profili Verimliliğine Etkisi, Poster Sunumu, 2. Ulusal Proteomik Kongresi	24-25.11.2017
Bildiri	H. TETİK, T. YIGITBASI, Ç. ÇAKICI, N. BÜYÜKUSLU, O. ÇAKAN, P. YIGIT, C. PARLAYAN & N. EMEKLI, Putrescine Level And Its Relationship With Oxidative Stress In Obesity, Poster Sunumu, Vi. International Congress Of Molecular Medicine	22-25.05.2017
Bildiri	N. GÖKTÜRK, T. YIGITBASI, Ç. ÇAKICI, N. BÜYÜKUSLU, O. ÇAKAN, P. YIGIT, C. PARLAYAN & N. EMEKLI, Spermidine And Spermine Levels And Their Relationship With Oxidative Stress In Obesity, Poster Sunumu, Vi. International Congress Of Molecular Medicine	22-25.05.2017

Sertifika Bilgileri

Kurum	Sertifika Adı	Tarih
İstanbul Medipol Üniversitesi	Q-TOF, LC-MS/MS ve HPLC kullanıcı eğitimleri	2016
World Medicine İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş.	Analitik metod validasyonu ve metod geliştirme	2014
Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A.Ş.	GxP Eğitimi	2013
Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A.Ş.	HPLC, GC ve AAS kullanıcı eğitimi	2011