

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİS	i
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
GİRİS ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Katekolaminler	3
<i>?-Amino Bütirik Asit ve L-Glutamat</i>	7
<i>Histamin</i>	9
<i>Asetilkolin</i>	11
<b>Sivi Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi</b>	12
<i>Sivi kromatografisi-kütle spektrometrisinde kullanılan iyonlaştırma yöntemleri</i>	13
<i>Sivi kromatografisi-kütle spektrometrisinde kullanılan kütle analizörleri</i>	14
<i>Sivi kromatografisi-kütle spektrometrisi çalışmalarında kullanılan hareketli fazın özellikleri</i>	15
<b>Mikrodiyaliz</b>	16
<i>Mikrodiyaliz pompası</i>	16
<i>Mikrodiyaliz çözeltisi</i>	16
<i>Mikrodiyaliz problemleri</i>	17
<i>Mikrodiyaliz problemlerinden geri kazanım</i>	18
<i>Standart çözelti kullanarak in vitro geri kazanım</i>	18
<i>Zero-net flux</i>	18
<i>No net flux</i>	18
<i>Retro dialysis</i>	19

<b>Stereotaksik Sistem</b>	19
<b>GEREÇLER</b>	21
<b>Kullanılan Maddeler</b>	21
<b>Kullanılan Cihazlar</b>	21
<b>YÖNTEMLER</b>	23
<b>Sivi Kromatografisi-Kütle Spektrometresi</b>	
<b>(Iyon Tuzagi) Çalışmaları</b>	23
<i>Nörotransmitterlerin stok çözeltileri</i>	23
<i>Kütle spektrometrisi parçalanmaları</i>	23
<i>Nörotransmitterleri sivi kromatografisi-kütle spektrometresi ile ayırım ve saptama denemeleri</i>	24
<i>Nörotransmitterlerin türevlendirilmesi</i>	24
<i>Türevlendirme reaksiyonunda kullanılan çözeltiler</i>	25
<i>Türevlendirme reaksiyonu</i>	25
<i>Türevlerin sivi kromatografisi-kütle spektrometresi ile analizleri</i>	25
<i>Kromatografik koşullar</i>	25
<i>Kütle spektrometresi koşulları</i>	26
<i>Türev sinyallerinin belirlenmesi</i>	26
<i>Türev ortamının pH'sinin taranması</i>	27
<i>Sivi kromatografisi-kütle spektrometresi yönteminin validasyonu</i>	27
<i>Doğrusallık</i>	27
<i>Doğruluk ve kesinlik</i>	27
<b>Mikrodiyaliz Çalışmaları</b>	28
<i>Mikrodiyaliz probu</i>	28
<i>Probun kullanıma hazır hale getirilmesi ve yeniden kullanımı</i>	28
<i>Örnek toplanacak beyin bölgelerinin koordinatlarının belirlenmesi</i>	28
<i>Mikrodiyaliz probunun yerleştirilmesi ve örneklerin toplanması</i>	31
<i>Probun geri kazanımı</i>	31
<i>Örneklerin analizi</i>	32
<b>BULGULAR ve TARTISMA</b>	33
<b>Kütle Spektrometrisi Parçalanmaları</b>	33
<b>Nörotransmitterlerin Sivi Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile Ayırım ve Saptama Denemeleri</b>	42

<b>Nörotransmitterlerin türevlendirilerek analizleri</b>	44
<b><i>Türevlerin sivi kromatografisi -kütle spektrometresi sinyallerinin belirlenmesi</i></b>	45
<i>Türev ortamının pH'sinin taranması</i>	49
<b><i>Kromatogramları oluşturmak için uygun sinyallerin seçimi</i></b>	50
<i>Türev bileşenlerinin kütle parçalanmalarının belirlenmesi</i>	51
<b><i>Sivi kromatografisi-kütle spektrometresi yönteminin validasyonu</i></b>	55
<i>Seçicilik</i>	55
<i>Doğrusallık</i>	55
<i>Tayin sınırı</i>	56
<i>Keskinlik ve doğruluk</i>	58
<b>Örneklerin Toplanması</b>	59
<b>Kullanılan Mikrodiyaliz Probanda Geri Kazanım</b>	60
<b>Örneklerin Analizi</b>	61
<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	67
<b>KAYNAKLAR</b>	69
<b>EKLER</b>	
<b>EK-1</b>	<b>Etik Kurul Kararı</b>
<b>EK-2</b>	<b>Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası</b>

## ÇİZELGELER DIZINI

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 Elektrosprey İyonlastırma Parametreleri	23
Çizelge 2 Uygulanan Gradient Sistem	25
Çizelge 3 Paxinos ve Watson Atlasına Göre İlgili Bölgelerin Koordinatları	29
Çizelge 4 Bileşenlerin Kütle Parçalanmaları	41
Çizelge 5 ?-Amino Bütirik Asit ve Histaminin Türev Bileşenleri	45
Çizelge 6 Yöntemin Doğrusallık Parametreleri	56
Çizelge 7 Yöntemin Kesinlik ve Doğruluk Parametreleri	59
Çizelge 8 <i>In Vivo</i> Sıçan Deneylerinde Prob Koordinatlarının Hesapları	60
Çizelge 9 Prob Geri Kazanımı	61
Çizelge 10 Bölgelere Göre ?-Amino Bütirik Asit Derisimi	65

## SEKILLER DIZINI

SEKIL NO ve ADI	SAYFA
<b>Sekil 1</b> Sivi Kromatografisi-Kütle Spektrometrisinde İyonlaştırma Yöntemlerinin Seçimi	13
<b>Sekil 2</b> İyon Tuzunun Üç Boyutlu Kesiti ve Parçaları	15
<b>Sekil 3</b> Hücreler Arası Sıvıdan Endojen Moleküllerin Probdan Diyaliz Çözeltisine Difüzyonu	17
<b>Sekil 4</b> Geometrilerine Göre Prob Şekilleri ve Diyaliz Çözeltisinin Probdan Geçisi	18
<b>Sekil 5</b> Paxinos ve Watson Atlasının Siçan Kafatası Üzerindeki Referans Noktaları	19
<b>Sekil 6</b> 4-Kloro-7-Nitro-2,1,3-Benzoksadiyazol Molekülü ile Primer Amin Tasiyan Moleküllerin Reaksiyonu	24
<b>Sekil 7</b> <i>Ventral Anterior Nucleus</i> (Griye Boyanmış Bölge) ve Probdan Beyindeki Konumu	30
<b>Sekil 8</b> <i>Lateral Hypothalamus</i> (Griye Boyanmış Bölge) ve Probdan Beyindeki Konumu	30
<b>Sekil 9</b> <i>Corpus Striatum</i> (Griye Boyanmış Bölge) ve Probdan Beyindeki Konumu	30
<b>Sekil 10</b> Histaminin (A) MS 112 m/z ve (B) MS <sup>2</sup> 95.1 m/z Spektrumları	34
<b>Sekil 11</b> ?-Amino Bütirik Asitin (A) MS 103.2 m/z ve (B) MS <sup>2</sup> 87.2 m/z Spektrumları	35
<b>Sekil 12</b> L-Glutamatin (A) MS 147 m/z, (B) MS <sup>2</sup> 130 m/z ve (C) MS <sup>3</sup> 84 m/z Spektrumları	36
<b>Sekil 13</b> Asetilkolinin (A) MS 146 m/z ve (B) MS <sup>2</sup> 87.2 m/z Spektrumları	37
<b>Sekil 14</b> Dopaminin (A) MS 154 m/z, (B) MS <sup>2</sup> 137 m/z ve (C) MS <sup>3</sup> 119 ve 91.1 m/z Spektrumları	38
<b>Sekil 15</b> Epinefrinin (A) MS 184 ve 166 m/z, (B) MS <sup>2</sup> 166 m/z ve (C) MS <sup>3</sup> 135 m/z Spektrumları	39
<b>Sekil 16</b> Norepinefrinin (A) MS, (B) MS <sup>2</sup> ve (C) MS <sup>3</sup> Spektrumları	40
<b>Sekil 17</b> 3,4-Dihidroksifenilasetik Asitin Eksi İyonlaştırma ile Elde Edilmiş MS 167.3 m/z Spektrumu ve 123.4 m/z Parçalanma Ürünü	41

<b>Sekil 18</b>	Zorbax C18 (2.1 x 100mm)Aqua Kolonda Su İçerisinde Hazırlanmış 500 ng.mL <sup>-1</sup> Derisiminde Bileşenlerin Sinyalleri	43
<b>Sekil 19</b>	Zorbax C18 (2.1 x 100mm)Aqua Kolonda Ringer Çözeltisi İçerisinde Hazırlanmış 500 ng.mL <sup>-1</sup> Derisiminde Bileşenlerin Sinyalleri	43
<b>Sekil 20</b>	4-Kloro-7-Nitro-2,1,3-Benzoksadiyazol Molekülü ve Primer Aminli Moleküller ile Reaksiyonu	44
<b>Sekil 21</b>	Türev İşlemi Uygulanmış Ringer Çözeltisinin 267 m/z Ana Kütle Kromatogramı	46
<b>Sekil 22</b>	?-Amino Bütirik Asitin Artan Derisimlerde 267 m/z Ana Kütle Kromatogramı	46
<b>Sekil 23</b>	Türev İşlemi Uygulanmış Ringer Çözeltisinin 275 m/z Ana Kütle Kromatogramı	47
<b>Sekil 24</b>	Histaminin Artan Derisimlerde 275 m/z Ana Kütle Kromatogramı	47
<b>Sekil 25</b>	?-Amino Bütirik Asitin Kütle Spektrumu 267.4 m/z Ana Sinyali	48
<b>Sekil 26</b>	Histaminin Kütle Spektrumu 275.2 m/z Ana Sinyali	49
<b>Sekil 27</b>	Türev Ortaminin pH'sinin Oluşan Türev Bileşenlerin Pik Alanlarına Etkisi	50
<b>Sekil 28</b>	?-Amino Bütirik Asit Türev Bileşiminin Kütle Spektrumu 249 m/z Parçalanma Ürünü	52
<b>Sekil 29</b>	Histamin Türev Bileşiminin Kütle Spektrumu 95.2, 258 m/z Parçalanma Ürünleri ve Parçalanmayan 275 m/z'lik Ana Kütle Sinyali	53
<b>Sekil 30</b>	Kantitatif Analiz İçin Belirlenen Sinyaller ile Bos Ringer Kromatogramı	54
<b>Sekil 31</b>	Artan Derisimlerde Histamin ve ?-Amino Bütirik Asit Türev Çözeltilerinin Kromatogramı	54
<b>Sekil 32</b>	Bos Ringer Çözeltisinin Kromatogramı	57
<b>Sekil 33</b>	10 ng.mL <sup>-1</sup> Derisimde ?-Amino Bütirik Asit Çözeltisinin Kromatogramı	58
<b>Sekil 34</b>	50 ng.mL <sup>-1</sup> Derisiminde Histamin Çözeltisinin Kromatogramı	58
<b>Sekil 35</b>	(A) Probun <i>Ventral Anterior Nucleus</i> ve <i>Lateral Hypothalamus</i> 'a Yerleştirilmesi İçin Kafatasına Açılan Deligin Konumu (B) Probun <i>Corpus Striatum</i> 'a Yerleştirilmesi İçin Açılan Deligin Konumu	60

<b>Sekil 36</b>	(A) <i>Ventral Anterior Nucleus</i> 'tan Toplanan Diyalizatin Kromatogramı (B) ?-Amino Bütirik Asit Sinyalinin Büyütülmüş Görüntüsü	62
<b>Sekil 37</b>	(A) <i>Corpus Striatum</i> 'tan Toplanan Diyalizatin Kromatogramı (B) ?-Amino Bütirik Asit Sinyalinin Büyütülmüş Görüntüsü	63
<b>Sekil 38</b>	(A) <i>Lateral Hypothalamus</i> 'tan Toplanan Diyalizatin Kromatogramı (B) ?-Amino Bütirik Asit Sinyalinin Büyütülmüş Görüntüsü	64

## **SIMGE ve KISALTMALAR DIZINI**

<b>1-MH</b>	: 1- metilhistamin
<b>ACh</b>	: Asetilkolin
<b>ACN</b>	: Asetonitril
<b>APCI</b>	: Atmosferik Basınçla Kimyasal İyonlastırma
<b>APPI</b>	: Atmosferik Basınçla Foto İyonlastırma
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum Klorür
<b>CE</b>	: Kapiler Elektroforez
<b>Ch</b>	: Kolin
<b>DOPAC</b>	: 3,4-dihidroksifenilasetik asit
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit Disodyum Tuzu
<b>EIC</b>	: Ayrılmış İyon Kromatogramı
<b>ESI</b>	: Elektrosprey İyonlastırma
<b>FEP</b>	: Floro Etilen Propilen
<b>GA</b>	: Güven Aralığı
<b>GABA</b>	: ?-amino bütirik asit
<b>GC</b>	: Gaz Kromatografisi
<b>GC-MS</b>	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
<b>Glu</b>	: Glutamik Asit
<b>5-HIAA</b>	: 5- hidroksiindolasetik asit
<b>HCl</b>	: Hidroklorik Asit
<b>HPLC</b>	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
<b>HVA</b>	: Homovanilik Asit
<b>IS</b>	: İç Standart
<b>i.p.</b>	: Periton İçine
<b>KCl</b>	: Potasyum Klorür
<b>LC</b>	: Sıvı Kromatografisi
<b>LC-MS</b>	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
<b>L-GLU</b>	: L- glutamat
<b>LLOQ</b>	: En Düşük Tayin Sınırı
<b>LOD</b>	: Saptama Sınırı
<b>LOQ</b>	: Tayin Sınırı
<b>MeOH</b>	: Metanol



<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum Klorür
<b>MRM</b>	: Çoklu Reaksiyon İzleme
<b>MS</b>	: Kütle Spektrometrisi
<b>m/z</b>	: Kütle/Yük
<b>NaCl</b>	: Sodyum Klorür
<b>NADPH</b>	: İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid 2'-fosfat
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	: Sodyum bikarbonat
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Sodyum Dihidrojen Fosfat
<b>NH<sub>4</sub>COOCH<sub>3</sub></b>	: Amonyum Asetat
<b>NBD-Cl</b>	: 4-kloro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiyazol
<b>NBD-F</b>	: 4-floro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiyazol
<b>NDA</b>	: Naftalen-2,3-dikarboksaldehit
<b>OPA-ME</b>	: o-ftaldialdehit-merkaptolanol
<b>PC</b>	: Polikarbonat
<b>PES</b>	: Polietersülfon
<b>PSE</b>	: 4-(1-piren) bütirik asit N-hidroksisüksinimit ester
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SH</b>	: Standart Hata
<b>S/N</b>	: Sinyal/Gürültü
<b>SRM</b>	: Seçilmiş Reaksiyon Görüntüleme
<b>TIC</b>	: Toplam İyon Kromatogrami
<b>TOF</b>	: Uçuş Zamanlı
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>VMA</b>	: Vanil Mandelik Asit



## GIRIS ve AMAÇ

Tarih boyunca insanlık, kendi organizmasının isleyisi hakkındaki meraklarını gözlemlerle ya da yaptığı aletler yardımıyla gidermeye, edindiği bilgiler ile organizmanın gerek yapısındaki gerekse isleyisindeki aksaklıkları anlamaya ve düzeltmeye çalışmıştır. Bu bağlamdaki öğrenme ihtiyacı, kullanılan ilk stetoskopun keşfini ve günümüzün yüksek teknolojiye manyetik görüntüleme araçlarının buluş temelinin oluşturmıştır.

Çevremizdeki canlı cansız her şey elementlerden ve moleküllerden oluşmuş kimyasal kümelerdir. Canlıları, cansızlardan ayıran en birincil fark canlı organizmalardaki alt kümelerin sürekli kimyasal tepkimelerle birbirleriyle iletişim içinde olmalarıdır. İnsanlar nasıl sözcükler kullanarak birbirleriyle iletişim kuruyorsa, canlı organizmalardaki doku ve organ sistemleri de; hücrelerde kimyasal reaksiyonlar sonucu sürekli oluşan moleküller yardımıyla (bu moleküller endojen kimyasallar olarak tanımlanmaktadır) birbirleriyle iletişim kurmaktadır. Bu açıklamalar doğrultusunda insan organizmasındaki endojen kimyasal maddeler, insanoglunun konuşarak iletişim için kullandığı kelimelere benzetilebilir. Konuşma ve sözcük üretimindeki sorunlar insanların iletişimini nasıl engellerse, canlı organizmada iletişimi sağlayan kimyasalların sentezlenmesinde ve/veya saliverilmesindeki problemler de organlar arası iletişimde, dolayısıyla organizmanın isleyisinde sorunlara neden olmaktadır.

Canlı organizmasını çözümlenebilmek gerçekte organizmanın dilini çözmek anlamına gelmektedir. Bu nedenle organizmanın isleyisinde rol oynayan kimyasalların neler olduğunu, hangi organlardan, ne koşullarda, ne kadar sentezlenip saliverildiklerini saptamak önemlidir.

Bu amaç doğrultusunda uygulanan pek çok yöntem vardır, ancak canlı organizma üzerinde, *in vivo* koşullarda, canlı organizmanın kimyasının araştırılabilirdiği yöntem mikrodializ yöntemidir. Mikrodializ tüm dokuların kimyasının incelenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Ancak, özellikle canlı beyin dokusunda ve istenilen özel alanlarda, sinir hücrelerinin iletişimde çok önemli rol oynayan *nörotransmitter* (aracı kimyasal maddeler) adı verilen kimyasalların araştırılmasında özel bir yere sahiptir. Mikrodializ ile canlı beyinde, sinir dokusuna en az zararı vererek örnekler toplanabilmekte ve sinir hücrelerinin birbiriyle iletişim kurmak için salıverdikleri kimyasal moleküller incelenebilmektedir.

Son on seneyi kapsayan kaynaklar tarandığında uluslararası SCI kapsamındaki dergilerde beyinde yapılan mikrodializ çalışmalarının bin âdetin üzerinde olduğu görülmektedir. Bu çalışmaların % 95'i sıçanlar üzerinde yapılmıştır. Gelecekte de bu tür çalışmaların artarak devam edeceği öngörülmektedir. Tezin kapsamı bu öngörü doğrultusunda belirlenmiştir.

Beyindeki *nörotransmitter* analizi için geliştirilmiş ve geliştirilmekte olan analitik yöntemler sinir sistemi fizyolojisinin anlaşılabilmesine ek olarak birçok sinir sistemi hastalıklarının mekanizmalarının aydınlatılmasında ve bu hastalıkların tedavileri için ilaç geliştirilmesinde çok önem arz etmektedir.

Mikrodiyaliz ile canlı dokuların kimyasının incelenmesine ek olarak eczacılık teknolojisinde, ilaç geliştirmede önemli farmakodinamik ve farmakokinetik çalışmalar da yapılabilmektedir.

İlaç olarak geliştirilen etkin molekülün hedeflenen dokuya ya da organa ne kadarının ulaşabildiği bununla birlikte formülasyonun etkin maddeyi hedef organa ne kadar yönlendirebildiği mikrodiyaliz yöntemi ile incelenebilmektedir. Bilinmektedir ki, artık sistemik dolaşım farmakokinetiğinden ziyade hedeflenen dokunun farmakokinetik parametreleri daha sağlıklı sonuçlar vermektedir (Lange ve ark., 1999). Özellikle hedef bölgesi beyin olan ilaç etkin maddelerinin sistemik dolaşımındaki farmakokinetik ve farmakodinamik parametreleri ile beyin dokusundaki parametreleri kan beyin bariyeri nedeniyle çok farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle ilaç etkin maddelerinin beyin dokusunda, özellikle hedeflenen bölgeye geçiş kinetiklerinin incelenmesi için mikrodiyaliz yönteminin önemi vurgulanmaktadır (Lange ve ark., 1997)

Bu bağlamda belirlenen tez çalışmasında sinir sisteminin işleyişinde beyinde bulunan son derece önemli ve temel rollere sahip bazı *nörotransmitter* (aracı moleküllerin) ölçümüne uygun bir analitik yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, mikrodiyaliz örnekleri, sıçan beyinin özel alanlarından stereotaksik yöntemle (üç boyutlu haritalandırma ile) toplanması ve toplanan örneklerin LC-MS (iyon tuzagi) ile analizleri planlanmaktadır.

Analitik özellikleri incelenecek sekiz adet nörotransmitter seçilmiştir. Bunlar histamin,  $\gamma$ -amino bütirik asit (GABA), L-glutamat (L-GLU), asetil kolin (ACh), dopamin, DOPAC, epinefrin ve norepinefrindir.

Gelistirilen yöntemin uygulanabilirliği, biyo-analitik validasyonu ile kesinliği, doğruluğu istatistiksel değerlerle gösterilmiştir

## KAYNAK BILGISI

Tez kapsamında ele alınan endojen *nörotransmitter*'lerin analizine yönelik araştırmalarla ilgili kaynaklar incelendiğinde genel olarak LC'yi temel alan çalışmalara rastlanmaktadır. Sivi kromatografik yöntemlerde bu kimyasalları saptamak için yaygın olarak kullanılan detektör tipleri ise elektrokimyasal, iletkenlik ve floresans detektörlerdir. Yakın zamanlarda MS detektörlerinin daha sık kullanıldığı görülmektedir. *Nörotransmitter*'lerin tayini konusunda son on yıl içinde yapılan araştırmalar tarandığında rastlanan çalışmalara aşağıda kısaca değinilmiştir.

### Katekolaminler

Katekolaminler dopaminerjik ve adrenerjik reseptörler aracılığıyla etki eden ve regülatör sistemin çeşitli kısımlarında etkili olan bileşiklerdir. Stres, fizikomotor aktivite, duygusal süreç, öğrenme, uyku ve hafıza ile ilgili yanıtının düzenlenmesinde kısmi olarak rol oynar. Birçok katekolaminerjik yolağa bağlı olarak geniş bir alandaki işlevleri hem merkezi hem periferik sinir sistemi ile ilişkilidir. Bu nedenle ekstraksiyonları ve miktar tayinleri için güvenilir tekniklerin geliştirilmesi önemlidir (Bergquist ve ark., 2002).

Dopamin, epinefrin, norepinefrin ve serotoninin biyolojik örneklerdeki doğru ve seçici ölçümleri hem klinik tani, hem de Parkinson veya Alzheimer hastalıkları, depresyon, şizofreni ve diğer ruhsal rahatsızlıklar gibi bazı hastalıkların patolojik çalışmalarında önemlidir (Rinne ve ark., 2006). Beyin katekolaminlerinin ölçümü psikiyatrik hastalıkların değişiminin izlenmesi için önemli olabilir. Bunların dışında, psikiyatrik hastalıkların kontrolünde kullanılan ilaçlar, katekolaminerjik yolları kullanarak etki gösterdikleri için, ilaç etkisinin aydınlatılmasında katekolaminlerin tayini gerekli olabilmektedir (Chi ve ark., 1999).

Bazı fizyolojik ve patolojik durumlarda otonom sinir sisteminin rolünü ve nöroendokrin hastalıkların değerlendirilmesini amaçlayan çalışmalarda katekolaminlerin ve metabolitlerinin plazmadaki tayini gereklidir (Raggi ve ark., 1999). Hasta idrarlarında katekolamin metabolitlerinin tayini feokromasitoma, Parkinson hastalığı ve stresin teşhisinin önemli bir parçasıdır. Katekolamin metabolitlerinin tayininde basit analitik problem, benzer kimyasal yapıları ve biyolojik sıvılardaki küçük derisimleridir. Katekolaminler yağ dokusundan yağ asitlerinin salınmasında ve hormonların salgılanmasında önemli bir role sahiptir. (Siren ve ark., 2004).

Cao ve Hoshino (1998), kulometrik elektrokimyasal detektörlü HPLC yöntemiyle bazı monoaminlerin analizini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında, örnek hazırlama sırasında uygulanan ultrasonik banyo işlemlerinin, monoaminlerin stabilitesi üzerine etkilerini göstermişler ve sonuç olarak sıcaklığın 3°C'de tutularak 10 dk'dan az süreyle ultrasonik banyoda tutmanın en iyi koşulları sağlayacağını belirtmişlerdir.

Chi ve ark. (1999), siçan beyin dokusundan katekolaminler (norepinefrin, dopamin, serotonin) ve metabolitlerinin (5-HIAA ve HVA) tayini için amperometrik dedektörlü ters faz bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. İzokratik hareketli faz ile ayırmaların sağlandığı yöntemin dogrusal aralığı 10–150 pg, saptama sınırları 3.8–7.5 pg düzeyinde bildirilmektedir.

Raggi ve ark. (1999), insan plazmasındaki katekolaminlerin tayini için elektrokimyasal detektöre bağlı LC yöntemini kullanmışlardır. Hareketli fazın pH'si ve bileşimi ve saptama potansiyeli gibi kromatografik performans ile ilgili çeşitli parametreler araştırılmıştır. Difenilborat ile katekolamin kompleksleri oluşturulduktan sonra kati faz ekstraksiyonu işlemi yenilik olarak ifade edilmekte ve validasyonu gösterilen yöntemin geri kazanımının % 92–98 olduğu bildirilmektedir.

Alberts ve ark. (1999), sempatik sinir sisteminin *in vivo* çalışmasının araştırılması için olanak sağlayan mikrodiyaliz tekniğini kullanmışlardır. Küçük örnek hacimlerinde topladıkları mikrodiyaliz örneklerinde ön deristirme basamağı gerektirmeksizin doğal ve sentetik katekolaminleri aynı çalışmada tayin etmek için bir HPLC yöntemi önermektedirler. Örnekler 1,2-difeniletildiamin ile türevlendirildikten sonra ayrılarak tayin edilmiştir. LOD, 30–200 fg olarak bildirilmektedir.

Yamaguchi ve ark. (1999) mikrodiyaliz örneklerindeki norepinefrinin benzilamin ile türevlendirildikten sonra tayini için mikrobor kolonlu LC yöntemi önermektedirler. Bu çalışmada türevlendirme işleminin ayrıntılı bir tanımı verilmektedir. Potasyum heksasiyanoferrat (III) varlığında oluşan benzoksazol türevinin oldukça dayanıklı ve floresans şiddetinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Saptama sınırı 10 µL'lik örnek enjeksiyonu için 90 amol olarak bildirilmektedir. Mikrodiyaliz örnekleri uyanık haldeki sıçanların *hipokampus*, *frontal cortex* veya *hypothalamus* bölgelerinden toplanmış ve basal ekstraselüler norepinefrin düzeyi ölçümleri ile birlikte, norepinefrinin geri emilimini engelleyen bileşiklerden olan maprotilin ve amitriptilin ile norepinefrin düzeylerindeki artma, reserpin ile norepinefrin düzeylerindeki azalma deneysel olarak gösterilmiştir.

Manini ve ark. (2000), insan idrarında HVA, VMA, DOPAC ve 5-HIAA gibi asidik monoamin metabolitlerinin tayini için tandem MS detektörlü LC yöntemi geliştirmişlerdir. Metabolitler C16 amit kolonda ayrılmış ve 30–70 µg.L<sup>-1</sup> düzeyinde LOD bildirilmiştir. Yöntemin validasyonu gösterilmiştir. Toprak kaynaklı kursun kontaminasyonuna maruz kalan yetişkin ve çocuklara ait idrarların analizlerinde, metabolit miktarlarının, kirlenmiş bölgelerde yaşayan çocuklarda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunduğu, yetişkinler için kontrollere göre metabolit miktarları arasında önemli bir fark bulunmadığı bildirilmektedir.

Katekolaminlerin iletkenlik detektörüne bağlı iyon kromatografik analizi Guan ve ark. (2000), tarafından gösterilmiştir. Norepinefrin, epinefrin ve dopamin için geliştirilen yöntem ile analizin 10 dk'dan daha kısa bir sürede tamamlandığı, % 97'lik geri kazanım elde edildiği, norepinefrin için 1 ng.mL<sup>-1</sup>, epinefrin ve dopamin için ise 10 ng.mL<sup>-1</sup> değerinde LOD bildirilmektedir. Analizin validasyonu gösterilmiştir ve ilaç formundaki katekolaminlerin rutin kalite kontrol analizlerinde önerilmektedir.

Unceta ve ark. (2001), bazı katekolaminleri ve metabolitlerini plazmadan, kati faz ekstraksiyonu uygulandıktan sonra kulometrik detektöre bağlı LC yöntemiyle tayin etmişlerdir. Çalışmada analitlerin saptama sınırlarının 0.01-0.05 ng.L<sup>-1</sup> düzeylerinde bulunduğu bildirilmektedir. Standart çözeltiler 0.2 M perklorik asitte hazırlanmış ve hareketli faz çözeltisinin optimum pH'i 3.0 olarak belirlenmiştir.

3,4-dihidroksibenzilamin iç standart olarak kullanılmış ve yöntemin validasyonu gösterilmiştir.

Peterson ve ark. (2002), çalışmalarında katekolamin (dopamin, norepinefrin ve epinefrin) ve metanefrinlerin (3-metoksitiramin, normetanefrin, ve metanefrin) idrarda birlikte tayinini CE'ye bağlı ESI-TOF-MS detektörü ile gerçekleştirdiklerini bildirmektedirler. 3,4-dihidroksibenzilaminin iç standart olarak kullanıldığı çalışmada, LOD 0.1–0.3 µM düzeyinde bulunduğu belirtilmektedir. Katekolamin ve metanefrinlerin ön deristirme ve saflastırması için katyon degistirici sorban taşıyan kati faz ekstraksiyon kolonları kullanılmış ve % 80'den fazla geri kazanım elde edilmiştir. Sağlıklı insan idrarında yapılan analizlerde referans değerlere yakın sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir.

Virag ve Whittington (2002), beyin mikrodializatlarında ekstraselüler dopamin tayini için elektrokimyasal deteksiyonlu bir LC yöntemi önermiştir. Yöntemde dar çaplı kolonlar kullanılarak 100 pM altında LOD ve 200 pM altında LOQ değerleri vermektedir. 0.2–10 nM aralığında dogrusal olan yöntem için iyi bir kesinlikle 11 dk süren analiz süresi bildirilmektedir.

Fujino ve ark. (2003), 5 hidroksiindoller ve katekolleri (serotonin, norepinefrin, dopamin ve ilgili bileşikler) benzilamin ve 1,2-difeniletildiamin ile türevlendirdikten sonra floresans detektörlü HPLC ile tayinini gösterdikleri bir yöntem geliştirmişlerdir. Türevin floresans şiddetinin ve dayanıklılığının oldukça yüksek olduğu bildirilmektedir. Bileşiklerin saptanmasında, ekzitasyon dalga boyu olarak 345 nm, emisyon dalga boyu olarak 480 nm'nin kullanıldığı yöntemde 20 µL injeksiyon hacmi için LOD'nin 80 amol ile 86 fmol arasında olduğu bildirilmektedir.

Sirén ve ark. (2004), miselsi elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemiyle idrardaki anyonik katekolamin metabolitlerinin miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. 25 mM sodium tetraborat–65 mM SDS çözeltisinin elektrolit çözeltisi olarak kullanıldığı çalışmada ayırma için en uygun pH'nin 10.82 olarak belirlendiği bildirilmektedir. Yüksek plaka sayısı ve küçük difüzyon katsayısı değerleri elde edilerek 0.05 ve 0.1 µg.mL<sup>-1</sup> düzeyinde LOD ve LOQ bildirilmiştir. Önerilen yöntem hasta idrarlarında katekolamin metabolitleri miktarlarını belirlemek için kullanılmıştır.

Yoshitake ve ark. (2004a), siçan *prefrontal cortex*'inde serotonin, noradrenalin ve dopaminin sinir uçlarından salımının mikrodializ tekniği ile izlenmesi için oldukça duyarlı bir LC yöntemi önermektedirler. Söz edilen katekolaminler benzilamin ve 1,2-difeniletildiamin ile türevlendirildikten sonra 1.0 mm çaplı C18 kolonda 60 dk içinde ayrılmıştır. Saptama sınırı, 10 µL injeksiyon hacmi için 42-95 amol aralığında bildirilmektedir. Reserpinin 5 mg.kg<sup>-1</sup> dozda, i.p. enjeksiyonunun ardından 12 saat sonra yapılan ekstraselüler katekolamin düzeylerinin ölçümünde katekolamin konsantrasyonlarının % 30-40 dolayında azaldığı gösterilmiştir.

Yoshitake ve ark. (2004b), siçan beyin ekstrelerinde ve mikrodializ örneklerinde benzilamin ve 1,2-difeniletildiamin ile türevlendirilen serotonin, noradrenalin, dopamin ve bunların metabolitlerinin (5-hidroksiindol-3-asetik asit ve 3,4 dihidroksi fenilasetik asit) tayini için LC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada

12–847.5 pM araliginda LOD bildirilmektedir. Mikrodiyaliz örnekleri uyanik haldeki siçanlarin *striatum*'undan toplanmistir. Hem beyin homojenatlarinda hem mikrodiyaliz örneklerinde katekolaminlerin ve metabolitlerinin bazal degerleri tayin edilmistir.

Akut kokain uygulamasinda disi siçanlar erkeklere göre daha kararli davranis gösterirler. Bu farklıliklarin temelindeki biyolojik mekanizmalar henüz aydinlatilmamistir. Festa ve ark. (2004), yaptiklari çalismada kokain ile indüklenmis motor davranislarin seksüel dimorfizmin monoaminerjik düzeylerine ve/veya kokain farmakokinetigine bagli olup olmadigini arastirmislardir. Disi ve erkek siçanlara 5, 15, 20 ve 30 mg.kg<sup>-1</sup> kokain ya da serum fizyolojik çözeltilerinin akut enjeksiyonundan sonra davranis aktiviteleri 3 saat izlenmistir. Akut kokain veya serum fizyolojik uygulamasinin ardindan motor davranislar doz ve cinsiyete göre farklılik göstermistir. Ölüm sonrasi dokulardaki nörokimyasal tayinlerde hem disi hem erkek siçanlarda *caudate putamen*'de toplam dopamin artis bildirilmektedir. Ayrica, erkek siçanlarda dihidroksifenilasetik asit/dopamin geri dönüşlerinde azalma izlenmistir. Disi siçanlarin *nucleus accumbens*'inde, toplam dopamin, dihidroksifenilasetik asit, HVA, serotonin, 5-HIAA ve dihidroksifenilasetik asit/dopamin geri dönüşlerinde azalma gözlenmistir. Erkek siçanlarin *nucleus accumbensinde* sadece dihidroksifenilasetik asit/dopamin geri dönüşlerinde azalma ve serotonin düzeyinde artis olduğu bildirilmektedir. Ayrica, kokain metabolizasyonunda cinsiyet farklıligi, disilerde norkokain ve ekgonin metil esterinin daha fazla kan/beyin düzeyleri ile, erkeklerde benzoilekgoninin daha yüksek kan düzeyleri ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar ile, kokain uygulanmasina cinsiyet farklıligina bagli davranis yanitlarinin hem monoaminerjik düzeylerdeki hem de metabolizasyon yolaklarindaki bireysel farklıliklarla kismen açıklanabilecegi önerilmektedir.

Patel ve ark. (2005) tarafından, merkezi sinir sistemi dokularinda serotonin ve bazi katekolaminlerin tayini için elektrokimyasal detektörlü HPLC yöntemi önerilmiştir. Serotonin için LOD 11.86 ng.mL<sup>-1</sup> olarak bulunmüstür. Doku örneklerinin -20°C'de saklanmasinin dopamin ve serotonin kaybina, doku örneklerinin hareketli faz çözeltilisinde hazirlanmasinin ise, perklorik asitte hazirlanan örneklere göre dopamin ve serotonin yanitlarinda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Analiz süresi 15–20 dk olarak bildirilmektedir.

Polar sabit fazlar kullanilarak oldukça polar yapidaki katekolaminlerin alikonmasinin artırilmasi düşünncesinden hareketle, Rinne ve ark. (2006) poröz grafit karbon sabit fazli kolonlari ilk defa kullanarak dopamin, epinefrin, norepinefrin ve serotoninin birlikte tayini için ESI-TOF-MS detektörlü kapiler sivi kromatografik yöntem ile bir arastirma gerçeklestirmislardir. 100 µl'lik örnek hacmi, yükleyici hareketli faz olarak görev yapan % 0.1 pentafloropropionik asit içeren sulu hareketli faz ile 25 mm x 0.32 mm (iç çap) 5 µm Hypercarb kolona verilmiş, ardindan % 0.1 asetik asit içeren su-asetonitril gradienti ile bilesikler 34 mm x 0.32 mm (iç çap) 5 µm Hypercarb kolona aktarilmiştir. Analizler sirasinda katekolaminlerin yükseltgenmesi gözlenmiştir. Bu durumun yükleyici hareketli faz bilesiminden kaynaklandigi ve buna bagli olarak 0.75-3.0 ng.mL<sup>-1</sup> araliginda bulunan saptama limitlerine karsin bu yöntemin kullanılabilirliğini engelledigi ifade edilmektedir. Poröz grafit karbon materyal ile florlu kuvvetli asitlerin



kombinasyonunun katekolaminler gibi kolayca yükseltgenen bileşikler için kullanılamaz olduğu bildirilmektedir.

Kehr ve ark. (2007), siçan beyninden elde edilen mikrodiyalizatlardaki rotigotin miktar tayini için elektrokimyasal deteksiyonlu bir LC yöntemi geliştirmişlerdir. Rotigotinin, dopamin agonisti özelliğe sahip antiparkinson bir ilaç olarak kullanımından dolayı, beynin ekstraselüler bölgesindeki tayininin önemli olduğu vurgulanmıştır. Yöntemin LOD'si 1 nM dolayında bildirilmektedir.

### **?-Amino Bütirik Asit ve L-Glutamat**

GABA glutamik asitin glutamik asit dekarboksilaz aracılığıyla dönüşümü sırasında oluşan, beyindeki baslıca inhibe edici *nörotransmitter*dir. Fizyolojik sivilardaki anormal GABA düzeylerinin çeşitli nörolojik rahatsızlıklarla ilgisini gösteren kanıtlar gittikçe artmaktadır. Menenjit hastalarının beyin-omurilik sıvısında ve otistik çocukların plazmasında GABA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Buna karsin Alzheimer hastalarının beyin-omurilik sıvısında ve bipolar rahatsızlığı ya da duygu durum bozukluğu olan hastaların plazmasında ise GABA düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (Song ve ark., 2005). GABA tayini için geliştirilmiş olan yöntemlere kısaca değinilmiştir.

GABA transaminaz ve suksinik semialdehit dehidrogenaz enzimleri varlığında NADPH üretimine dayalı 340 nm'deki absorpsiyonla spektrofotometrik yolla tayin edilebilmektedir. Ancak analiz örneklerinde çevresel koşullarla (sıcaklık azalması, karanlık ya da mekanik manipülasyon vb.) ilgili olarak GABA düzeyinde artış meydana gelmektedir. Zhang ve Bown (1997), GABA ekstraksiyonu ve tayini için hızlı bir enzimatik yöntem önermektedirler. Bu yöntemde önerilen ekstraksiyon işleminin analiz için doku alınması sırasında hızlı GABA birikmesini önlediği ve 340 nm'de absorpsiyon yapan ve enzimatik tayinin duyarlılığını azaltan renkli bileşenleri uzaklaştırdığı bildirilmektedir. 340 nm'deki absorpsiyonla 10-100 nmol/küvet aralığındaki GABA düzeyleri için doğrusal bulunmuştur.

Kehr (1998) mikrodiyaliz örneklerinde 1.5 nM konsantrasyondaki GABA'nin ölçülebileceği bir yöntem tarif etmektedir. OPA-ME ile türevlendirilerek floresans özellik kazandırılan GABA 1.0 mm'lik mikrobör kolonda ayrıldıktan sonra floresans ve elektrokimyasal detektörler kullanılarak 20 dk içinde tayin edilebilmektedir. Validasyonu gösterilen yöntemin uygulaması siçan beyin *nucleus*'undan elde edilen mikrodiyaliz örneklerindeki GABA düzeyinin ölçümü ile gösterilmiştir.

Struys ve ark. (1999), tek bir GC-MS analizini kullanarak GABA ve  $\beta$ -Alanin'i beyin omurilik sıvısında tayin etmişlerdir. Yöntemin izole GABA ölçüm yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha üstün bir saptama gücünün olduğu vurgulanmaktadır.

Bianchi ve ark. (1999), mikrodiyaliz sırasında ve *süperfüz*at beyin kesitlerinde aspartat, glutamat, taurin ve GABA'nin bazal ve uyarılmış düzeylerinin aynı anda tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. *o*-ftalaldehit ile türevlendirilen bileşenler floresans detektör kullanılarak tayin edilmiştir. Yöntemin LOD'si süperfüz içindeki GABA için 2.0 fmol. $\mu$ L<sup>-1</sup> olarak bildirilmekte ve analiz 15 dk içinde tamamlanmaktadır. Farklı beyin bölgelerinden elde edilen

mikrodiyalizatlarda ve perfuse doku kesitlerinde bulunan söz konusu amino asitler önerilen yöntemle tayin edilmiştir.

Kis uykusu sırasında derin merkezi sinir sistemi baskılanmasına eşlik eden GABA'nin ekstraselüler konsantrasyonunda ( $[GABA]_{ecf}$ ) artış ile ilgili hipotezi test etmek için Osborne ve ark. (1999) kuzey kutbu yöresindeki kis uykusuna yatan ve yatmayan sincapların *striatumunda*  $[GABA]_{ecf}$  düzeyini ölçmek için bu çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Mikrodiyaliz çalışmasının ayrıntılı koşulları bildirilen çalışmada, *o*-ftaldialdehit ile türevlendirilen GABA düzeyleri C18 kolonda elektrokimyasal detektörlü HPLC yöntemi ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, kis uykusuna yatmayan sincaplarda  $[GABA]_{ecf}$  düzeyi 73 nM olarak, kis uykusuna yatanlardaki düzey ise % 50 daha az bulunmuştur.  $[GABA]_{ecf}$ 'deki artışın kis uykusu sırasında merkezi sinir sistemindeki depresyonda baslıca rol oynamadığı, zira  $[GABA]_{ecf}$ 'deki azalma ile paralel olarak plazma ve beyin-omurilik sıvısında glukoz konsantrasyonunda gösterilen azalmanın GABA sentezinde bir azalmaya veya voltaj bağımlı salımlarda bir düşmeye yol açabileceği önerilmektedir.

Ma ve ark. (1999), glutamat dekarboksilaz'ın yarismali ve spesifik inhibitörü olan 3-merkaptopropionik asit ile muamele edilmiş siçanların beyinlerinin çeşitli bölgelerinde ve tüm beyinlerindeki GABA ve Glu birlikte tayini için LC-MS yöntemi önermektedirler. Yöntemin geri kazanımı % 95 dolayında, LOD'si GABA için  $2.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ve Glu için  $5.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  bulunmuştur. 3-merkaptopropionik asit ile muamele işleminden sonra ilk 5 dk'da GABA derisimlerinin göreceli olarak azaldığı, daha sonra tüm beyinde % 63 artığı gösterilmiştir. Glu derisiminin ise muamele işleminden sonra 10 dk içinde tüm beyinde göreceli olarak artarak normal değerine % 154'üne ulaştığı, sonraki 60 dk içinde normal değerine azaldığı bulunmuştur. Yöntemin biyolojik örneklerdeki GABA ve Glu metabolizasyonu çalışmalarında kullanışlı olduğu vurgulanmaktadır.

Kuhawar ve Rajper (2003) beyin-omurilik sıvısında GABA, 2-hidroksinaftaldehit ile türevlendirildikten sonra 330 nm'de UV deteksiyon ile ölçüldüğü bir LC yöntemi geliştirmişlerdir. Glisin, Hisin ve tiraminin GABA ile birlikte bulunduğu karışımında GABA tamamen ayrılmış ve bir çok amin ve aminoasit varlığında GABA'nin seçici olarak ayrıldığı gösterilmiştir. 5  $\mu\text{L}$ 'lik enjeksiyon hacmi için 2.8 ng LOD bulunan yöntemde beyin-omurilik sıvısındaki GABA miktarlarının 19-22  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  olarak ölçüldüğü bildirilmektedir.

Zacharis ve ark. (2004) insan biyolojik sıvılarında GABA'nin otomatik türevlendirilerek LC yöntemiyle *on-line* tayini için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Ardisik enjeksiyon analizi tekniği ile *o*-ftaldialdehitin floresans ajan olarak kullanıldığı türevlendirme işlemlerinde optimize edilen maksimum duyarlık koşullarında analizlerin yapıldığı bildirilmektedir. İnsan idrari ve beyin-omurilik sıvısında  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (ppb) düzeyinde GABA tayini gösterilmiştir.

Song ve ark. (2005), GABA'nin insan plazma ve beyin-omurilik sıvısında miktar tayini için kapiler LC-tandem MS yöntemi geliştirmişlerdir. Kapiler kolon olarak C18 (50 mm x 0.25 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), iç standart olarak döteryum işaretli GABA

kullanılmıstır. Türevlendirme işleminin NBD-F ile yapıldığı ve yöntemin LOD'sinin 5 ng.mL<sup>-1</sup> olduğu belirtilmektedir.

Kang ve ark. (2006), biyolojik örneklerdeki nöroaktif aminoasitlerin tayininde dansil ile türevlendirme işlemlerinin optimizasyonu ve kromatografik analiz koşulların belirmesi için bir araştırma yapmışlardır. Dansil klorür ile GABA'nın da olduğu on iki amino asit türevlendirildikten sonra ayrılmıştır. İzokratik yolla 35 dk sürede ayrılan aminoasitler UV deteksiyon ile saptanmış, iç standart olarak trazodon kullanılarak yöntemin validasyonu gösterilmiştir.

Clarke ve ark. (2007), NDA ile türevlendirilmiş GABA ve L-GLU'nun birlikte tayini için elektrokimyasal ve floresans detektörün kullanıldığı bir HPLC yöntemi tarif etmektedirler. Elüsyon izokratik olarak sağlanmış ve 20 dk'dan az bir sürede tamamlanmıştır. Yöntemin validasyonu geniş bir derişim aralığında gösterilmiştir. Türevlerin 16 saat dayanıklı olduğu bildirilmektedir. Yöntemin uygulaması *hippocampus* ve *brainstem*'deki GABA ve L-GLU düzeylerinin ölçümünde gösterilmiştir.

### **Histamin**

Histamin farklı tipteki hücrelerden vücut fonksiyonlarını düzenlemek için salınan ve biyojenik amin yapısında olan kimyasal bir modulatördür. Histamin periferik dokulardaki TIP-I alerjik hastalıklar ve dijestif ülserlerde yer almakla birlikte merkezi sinir sisteminde de etkilidir. Histamin memeli beynindeki hedef hücreler üzerindeki etkisini ikincil mesajcı olarak H1 ve H2 reseptörlerinin uyarılması yolu ile gösterir. Ancak yakın zamanlarda otoreseptör sınıfına dahil olan ve sadece beyinde bulunan yeni bir H3 reseptörünün H1 ve H2 reseptörlerinden daha farklı farmakolojik yanıtlar ürettiği bildirilmektedir. Histamin bir nörotransmitter olarak nörofizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde görev alır. Ayrıca normal dişi histamin iletimi, Alzheimer hastalığı, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, Down sendromu, epilepsi, Parkinson hastalığı, stres, anksiyete gibi çeşitli beyin hastalıklarının etiyolojisinde yer almaktadır. Histamin ölçümü ile ilgili spesifik ve güvenilir yöntemlere olan gereksinim diğer *nörotransmitter*lerde olduğu gibi çözümlenmeyi bekleyen biyolojik problemlere kolaylık sağlayacaktır (Oguri ve Yoneya, 2002; Yoshitake ve ark., 2003).

Busto ve ark. (1997), kolon içi florimetrik türevlendirilen sekiz adet biyojenik aminin tayini için floresans detektörlü bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Türevlendirme işlemi kolon içinde hareketli faz olarak kullanılan diğer çözücülerle birlikte yapılmıştır. Kolon içi tepkime koşulları (pH, borat ve *o*-ftalaldehit konsantrasyonları) optimize edilmiştir. Ayırma üzerine türevlendirici ajan olarak kullanılan tiyolden kaynaklanan matris etkisi ve sıcaklık etkisi ayrıca çalışılmıştır. Yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini artırmak için anyon deşistirici ve C18 kolonların kullandığı kati faz ekstraksiyon işlemleri türevlendirme işleminden önce uygulanmıştır. Yöntemin doğrusalığı 0.5–15 mg.L<sup>-1</sup> ve LOD'si 100-300 µg.L<sup>-1</sup> aralığında bulunmuştur. Yöntem kırmızı saraplardaki biyojenik aminlerin tayini için uygulanmış ve sonuçları standart ön-kolon yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

Bruce ve Taylor (1998), plazma histamin tayini için kullanılan radyo-enzimatik yöntemin tekrarlanabilirliğinin kan toplanması için kullanılan antikoagulan maddenin varlığından etkilendiği bulgusunu bildirmektedirler. Tüm kanda yapılan

geri kazanım deneylerine göre, EDTA veya sodyum florüre göre heparin ile daha doğru değerler elde edilmektedir; florür heparinle olana göre % 41 daha yüksek ortalama değer vermektedir. Standart kalibrasyon eğrisine florür ilavesi ve porsiyonlara 5 ng histamin eklenmesi, kontrollere göre % 15 ve % 14.1 daha yüksek değerler vermiştir. Florürün saptama sistemine etkisinin olmadığı, histamin ile kontamine olmadığı ve S-adenosil-L-metiyonin'in (metil donörü) bozulmasına da neden olmadığı bulunmuştur. Sonuç olarak, heparinin antikoagulan seçiminde uygun olduğu ve florürün domuz beynindeki histamin metil transferazi aktive edebileceği belirtilmektedir. Florürün enzim aktivatör olarak biyolojik bir role sahip olabileceği önerilmektedir.

Histamin artropod fotoreseptörlerinde bir *nörotransmitter*'dir. Meyva sineği *Drosophila melanogaster*, sinir bilimleri araştırmalarında yaygın kullanılan bir modeldir ve sinir sistemindeki histamin içeriği henüz bildirilmemiştir. Borycz ve ark. (2000), OPA-ME kullanarak türevlendirme ile bu aminin *Drosophila*'da tayin etmek için elektrokimyasal deteksiyonlu bir HPLC yöntemi önermektedirler. Sineğin baş kısmında ölçülen histamin miktarı ortalama 2 ng'dir. Yöntem kullanılarak diğer mutantlardaki histamin düzeyleri de ölçülmüştür.

Brown ve ark. (2001) beyindeki histamin fiziolojisi ile ilgili olarak hazırladıkları derlemede, histamin salıveren nöronların *pattern*leri ve elektrofiziyojisi, histamin reseptörleri, hedef bölgelere histaminin etkileri, sinaptik bozuklarda histamin etkileri, sinir sistemindeki görevleri ve davranışları başlıkları ile detaylı olarak bilgi vermektedir.

Oguri ve Yoneya (2002), endojen histaminin ve metabolitlerinin biyolojik önemi ve tayini için kullanılan yöntemleri kapsayan bir derleme hazırlamışlardır. Bu derlemenin ilk bölümünde histaminin biyolojik önemi ve biyolojik yollar ele alınmakta, daha sonra GC, LC, CE ve kapiler elektrokromatografi gibi mikro ayırma teknikleri tarihsel süreçte verilmektedir. Son bölümde, kan, idrar, beyin ve hücreler gibi biyolojik örneklerde histamin ve metabolitlerinin tayini için söz edilen yöntemlerin kullanılması tartışılmaktadır.

Yoshitake ve ark. (2003), uyanık haldeki siçanlardan elde edilen beyin mikrodializ örneklerinde histamin tayini için floresans deteksiyonlu duyarlı ve seçici bir LC yöntemi tarif ederler. Histamin içeren örnekler PSE, potasyum karbonat ve ACN varlığında türevlendirilmekte ve C18 silikajel ile paketlenmiş kolona injekte edilmektedir. Oluşan histamin türevi 450–540 nm aralığında moleküller arası *excimer* floresans oluşturan iki piren kalıntısı içerir, bu ve PSE'nin kendi başına oluşturduğu 360–420 nm'deki monomer floresansından farklılaşmasına izin verir. Histamin-piren türevinin ayrılması 25 dk'da tamamlanmıştır ve LOD 20 µl injeksiyonda 0.3 fmoL'dür. 10 dk'lık fraksiyonda toplanan histaminin basal ekstraselüler düzeyi (10 µL'deki fmoL olarak, n = 10 siçan) *hypothalamus*'ta 35.45, *prefrontal cortex*'te 9.05, *hipokampus*'ta 7.83 ve *striatum*'da 6.54 olarak bulunmuştur. Histaminin voltaj duyarlı salınımı 100 mM derisimde potasyum iyonları veya sodyum kanal blokeri olan tetrodoksinin (1.0 µM) probdan perfüzyonu ile değerlendirilmiştir. Kalsiyum bağımlı salınım kalsiyumsuz Ringer çözeltisi ile perfüzyon yapılarak test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; çeşitli farmakolojik ve fiziyojik koşullarda nöronal salınan histaminin tayini bu yöntemle oldukça duyarlı olarak yapılabilmektedir.

Zhang ve ark. (2005), NBD-F adli türevlendirici ajani kullanarak floresans özellik kazandırılan histamin ve bazı poliaminlerin analizi için floresans detektörlü kapiler zon elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada histamin 3 dk'dan daha kısa bir sürede analiz edilmiş ve LOD 21 nM olarak bulunmuştur. Gelistirilen yöntem *tobacco mesophyll protoplastin* lizatındaki biyolojik aminlerin analizine başarıyla uygulanmıştır.

Von Vietinghoff ve ark. (2006), histamin ve onun kataboliti 1-MH'nin tayini için floresans detektörlü HPLC'nin kullanıldığı bir yöntem geliştirmiştir. Alkali borat tamponunda çözünmüş *o*-ftaldialdehit ile her iki bileşimin kolon içinde yapılan türevlendirmesini ters faz C18 kolonda ayırma izlemiştir. Histamin ve 1-MH 50 nM LOD ile saptanabilmistir. Yöntemin domuz kolon epitelindeki histamin katabolizmasını araştırmak için uygun olduğu kanıtlanmıştır. Yöntem histamin metabolizasyonu üzerine olan araştırmalarda önerilmektedir.

### **Asetilkolin**

ACh ilk bulunan *nörotransmitter*'dir. Ch, ACh'in hem prekürsörü hem de metabolitidir. Kolinerjik sinirler merkezi sinir sisteminin tamamında bulunur. Fizyoloji, patoloji ve farmakolojideki rolünün artan öneminin fark edilmesine bağlı olarak kolinerjik sinir iletimi ile ilgili son yıllarda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. *Nörotransmitter*'lerin tabiatı fonksiyonel durumu yansıtmaktadır ve biyolojik sıvılarda ACh ve/veya metaboliti ya da prekürsörlerinin ölçümleri kolinerjik araştırmaların en önemli parçası haline gelmiştir. Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi sinirsel rahatsızlıkların merkezi kolinerjik fonksiyonlarla ilgili olduğuna dair kanıtlar vardır (Dong ve ark., 2003).

Kehr ve ark. (1998b) mikrodiyaliz örneklerinde ACh, Ch ve fizostigminin saptanması için redoks polimer kaplı elektrotların kullanıldığı kolon sonrası immobilize enzim reaktörlü ve elektrokimyasal deteksiyonlu mikrobor kolon sivi kromatografisini kullanmışlardır. Bu çalışmada kaplı elektrotların stabilitesi ve olası iç standartlar araştırılmıştır. Mikrodiyaliz problemleri uyanık haldeki siçanların *ventral hipokampusunda* konumlandırılarak diyalizat örnekleri toplanmış ve söz edilen maddeler için bazal düzeyler ölçülmüştür.

Tsai, (2002) hazırladığı mükemmel derlemede ACh ve onun baslıca metabolit/prekürsörünün ölçümü için kullanılan basit biyoassayler, radyoenzimatik tayinler, alev iyonizasyon detektörlü GC, GC-MS, elektrokimyasal deteksiyonlu HPLC, HPLC-MS gibi analitik yöntemleri ve biyolojik örneklerdeki (beyin dokusu ve düz kas örnekleri, kan ve beyin-omurilik sıvısı ve mikrodiyalizatlar) uygulamalarını ele almaktadır. Son derece düşük miktarların tayini için sivi kromatografik yöntemlerde kullanılan mikro-immobilize enzim reaktörleri, mikrobor kolonlar ve modifiye elektrot teknolojileri tartışılmıştır.

Jenkins ve ark. (2002), siçanların *pedunculopontine tegmental nucleus*'unun ekzitotoksik lezyonlarından sonra *thalamus* ve *striatum*'da ACh ve dopamin içeriğinin tayinini göstermişlerdir. Elektrokimyasal deteksiyonlu HPLC yöntemi kullanılarak yapılan dokudaki düzeylerin ölçümü ile *pons*'tan *thalamus*'a gönderilen kolinerjik uyarıların, umulandan daha kompleks ve dinamik olduğu belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda talamik ACh'in elektrofizyolojik özellikleri ve yollarının belirlenmesi tartışılırken, bu çalışma ile ilk defa *mesopontin*

*tegmentum*'dan *thalamus*'un sinirsel uyarılması ile ilgili dinamik denge önerilmektedir.

Wise ve ark. (2002), Ch ve ACh ölçümü için elektrokimyasal deteksiyonlu CE yöntemini kullanmışlardır. Gluteraldehit çapraz bağlı kolinesteraz ve ACh esteraz kaplı modifiye platin elektrot ile dolaylı elektrokimyasal deteksiyon sağlanan yöntemde iç standart olarak butirilkolinin kullanıldığı bildirilmektedir. Yöntem 125  $\mu\text{M}$ 'a kadar doğrusaldır ve 2  $\mu\text{M}$  LOD'ye sahiptir. Yöntemin uygulaması *sinaptosomal* preparatlarda kolin geri emilim kinetiğinin izlenmesi ile gösterilmiştir.

Dong ve ark. (2003), beyin mikrodializatlarında ACh ve Ch'in rutin tayini için immobilize enzim reaktör olarak *horseradish* peroksidaz kolonun kullanıldığı elektrokimyasal deteksiyonlu LC yöntemi geliştirmişlerdir. Kullanılan sistem *horseradish* peroksidaz ve ferrosen mediyatorün varlığında okside ferrosene dönüşümle elde edilen ürünün 0 mV'da indirgenmesinin izlenmesi ilkesine dayanır. 1-5000  $\text{nmol.L}^{-1}$  aralığında ACh/Ch derisimleri için mükemmel bir doğrusal ilişki elde edilmiş ve ACh için LOD 2 fmol/5  $\mu\text{L}$  olarak bulunmuştur. Yaygın kullanılan elektrokimyasal yöntemler ile karşılaştırıldığında önerilen yöntemin LOD'sinde 200 misli duyarlılık sağlanmıştır. Siçan beyin mikrodializatlarında ACh ve Ch düzeyleri ölçülmüştür.

### **Sivi Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi**

MS, oluşturulmuş elektromanyetik alanda yüklü moleküllerin m/z oranlarına göre farklı hareket etmelerini temel alan bir yöntemdir. İyon, elektriksel alan ve vakum olarak özetlenebilecek üç ana esas üzerinde çalışır. MS yönteminin molekülleri birbirinden ayırabilmesi ve saptayabilmesi için çalışılan maddelerin mutlaka iyonik ya da iyonlaştırılabilecek halde olmaları gerekir. İyonik haldeki moleküllerin uçurularak m/z oranlarına göre farklı rotalar çizmesine neden olacak bir elektriksel alan gereklidir. İyonların elektriksel alanda hareketlerini engelleyecek ya da kimyasal yapılarını değiştirebilecek başka moleküller olmamalıdır. Bu nedenle, iyonların elektriksel alanda uçurulduğu bölgeye vakum uygulanarak havasız bir boşluk yaratılmalıdır. MS yöntemi ile hem bileşenlerin kütleleri ve kütle parçaları, dolayısıyla kimyasal yapıları hakkında kalitatif veriler, hem de miktarları hakkında kantitatif veriler elde edilebilmektedir.

MS yöntemi ilk defa 1956'da F.W. McLafferty ve R.S. Gohlke tarafından iyonların gaz fazında, boşlukta, elektriksel alanın etkisiyle uçurulması nedeniyle GC'de detektör olarak kullanılmaya başlanmıştır. GC'nde ayrılan gaz fazındaki maddeler direkt MS cihazına aktarılabilmektedir. Bu nedenle ilk defa ticari amaçla GC-MS analiz cihazları geliştirilmiştir. İlk HPLC-MS birleşimi ise 1974'te P.J. Arpino ve arkadaşları tarafından denenmiştir. Fakat 1988 yılına kadar maddelerin HPLC'deki sivi fazdan MS için gerekli gaz fazına iyonlaşarak geçmeleri verimli olarak sağlanamamıştır. J. Fenn 1988 yılında HPLC'de ayırımı gerçekleşen maddelerin sivi fazdan kurtarılıp iyonlaştırılabildiği ESI yöntemini geliştirmiştir (Hoffman ve Stroobant 2001a). J. Fenn, bu çalışmasıyla 2002 Nobel kimya ödülüne layık görülmüştür (<http://>).

Günümüzde kullanılan LC-MS cihazları genel olarak HPLC, iyonlaştırma odacığı ve bileşenlerin ayrıldığı kütle analizöründen oluşmaktadır.

### **Sivi kromatografisi-kütle spektrometrisinde kullanılan iyonlaştırma yöntemleri**

LC-MS sistemlerinde iyonlaştırma odacıkları kullanılan iyonlaştırma tekniğine göre ESI, APCI ve APPI olarak çeşitlenmektedir.

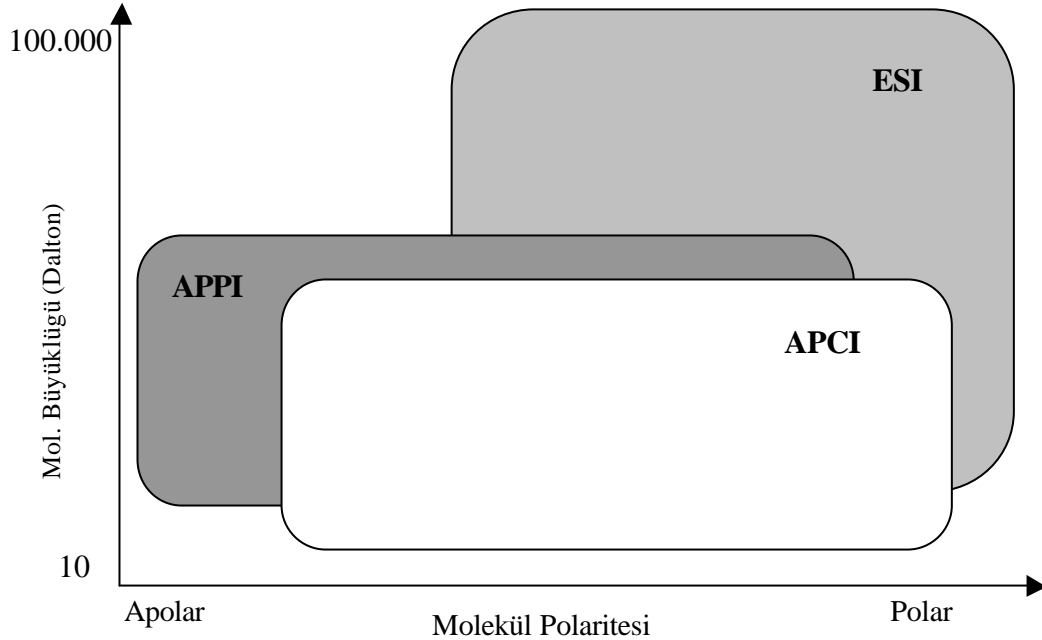
ESI yönteminde LC'den çıkan maddeleri taşıyan hareketli faz elektriksel bir alanda azot gazı yardımıyla spreylenmektedir. Sprey aşamasında sıvı hareketli faz damlacıklarına dönüşmekte ve bu damlacıklar giderek küçülerek içerisindeki iyonlar *Coulomb* patlamasıyla sıvı fazdan kurtulup uygulanan elektrik alanı yardımıyla kütle ayrıştırıcıya doğru hızlandırılmaktadır.

APCI yönteminde LC'den çıkan hareketli faz spreylenirken 120°C'ye ısıtılır ve sıvı hareketli fazın gaz fazına dönüşmesi sağlanır. Gaz fazına dönüşen hareketli faz kimyasalları ve hareketli fazın taşıdığı bileşenler elektrik yüklü bir iğneye (corona) doğru püskürtülür. İğne, üzerindeki elektriksel yükün uyarılması sonucunda gaz fazındaki hareketli faz iyonları ya da püskürtücü gazın oluşturduğu iyonlar ile hareketli fazın taşıdığı maddeler arasında proton aktarımı yolu ile veya birbirlerine eklenme yolu ile iyonlaştırma gerçekleştirilir.

APPI yönteminde APCI yönteminde olduğu gibi LC'den çıkan hareketli faz spreylenirken 120°C'ye ısıtılır ve sıvı hareketli fazın gaz fazına dönüşmesi sağlanır. APPI yönteminde APCI'deki yüklü iğne yerine UV radyasyonu yayan bir UV lambası kullanılır. UV lambasından gönderilen fotonların enerjisi yardımıyla spreylenmiş bileşenler iyonlaştırılır.

İyonlaştırılacak bileşenin moleküler büyüklüğü ve polaritesine göre bu üç iyonlaştırma tekniği arasında seçim yapılmaktadır (Hoffman ve Stroobant 2001a).

Bileşenlerin özellikleri ile kullanılan iyonlaştırma teknikleri seçimi **Sekil 1** de gösterilmektedir.



**Sekil 1. Sivi Kromatografisi-Kütle Spektrometrisinde İyonlaştırma Yöntemlerinin Seçimi (Tsoupras, 2005)**

### ***Sivi kromatografisi-kütle spektrometrisinde kullanılan kütle analizörleri***

LC-MS yönteminde MS cihazlarında kullanılan tüm kütle analizörleri kullanılabilir. Bu analizörler çubuklu (quadrapol), üç ardışık seri bağlı üç çubuklu analizörden oluşan tandem, uçuş zamanlı (TOF), iyon kilitron rezonanslı ve iyon tuzagi (ion trap) kütle analizörleri olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bu analizörlerin birbirleriyle farklı birleşimleri de kullanılabilir.

Çubuklu kütle analizörlerinde, iyonlaştırılan bileşenler dört adet çubuk arasında oluşturulan doğru akım ve radyo frekansı kuvvetleri ile uçuşurlar. İyonların çubuklar arasında uçuşu sırasında uygulanan radyo frekansının değiştirilmesi ile iyonlar  $m/z$ 'lerine göre radyo frekansına bağlı olarak ayrı ayrı detektöre ulaşır.

Tandem kütle analizörleri üç çubuklu analizörün seri bağlanmasıyla oluşturulmuş kütle ayırıcılarıdır. Çubuklu analizörler arasındaki bölümlerde iyonlara gönderilen enerji ile iyonların parçalanması ve oluşan parçaların bir sonraki çubuklu analizörde birbirlerinden ayırımı sağlanabilir. Bu cihazların LOD ve LOQ'leri diğer kütle analizörlerinden daha düşük seviyelere inebilir.

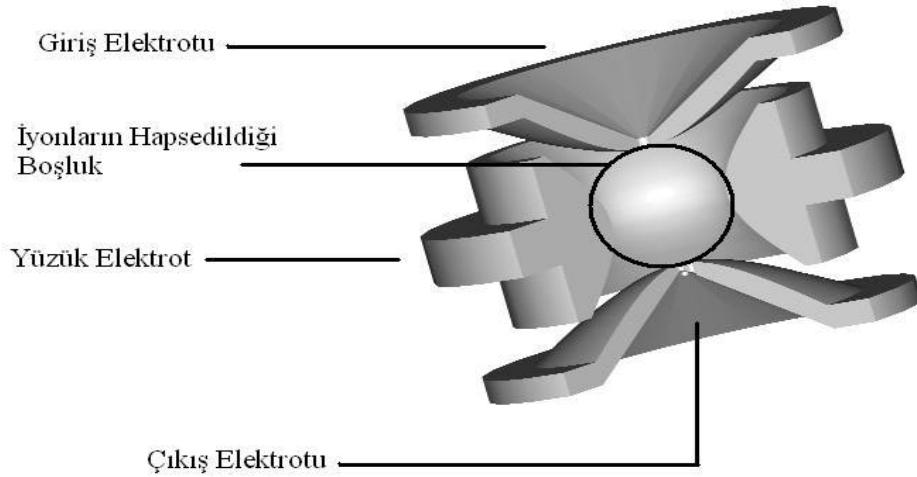
TOF kütle analizörlerinde, iyonlaştırılan bileşenler iki plaka arasına uygulanan elektriksel alan yardımıyla doğrusal bir şekilde uçuşmakta, detektöre varış zamanlarına göre birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Bu yöntem ile, büyük moleküllerin ayırımı ve yüksek çözünürlüklü olarak kütle tayini yapılabilir. Uçuşurlan iyonların kütleleri virgülden sonra altıncı basamak hassasiyetinde belirlenebilir.

Fourier dönüşüm-iyon kilitron rezonans kütle analizörleri, iyon tuzagi gibi iyonların hapsedildiği bir odacıktan meydana gelir. Bu odacıga uygulanan manyetik ve elektriksel alan yardımıyla iyonlar kararlı durumda odacık içinde devamlı uçuşmaktadır. Değiştirilen radyo frekansı ile hapsedilmiş iyonlar rezonansa getirilip odacık içinde aynı zamanda dedektör görevi gören yüzeye çarptırılmaktadır. Yüzeyde oluşan akım zamana bağlı olarak fourier dönüşümü ile kütle-sinyal ilişkisine çevrilir. Bu yöntemle iyon tuzagi analizörleri gibi  $MS^n$  çalışmaları yapılabilir. Bunun yanında büyük moleküllerin yüksek çözünürlüklü ayırımının da yapılabildiği bir yöntemdir. Fakat MS yöntemleri arasında en pahalı olanıdır.

İyon tuzagi kütle ayırıcılarında, iyonlar tuzagin içerisine doldurulmakta ve tuzaga uygulanan elektriksel kuvvetlerle hapsedilmektedir. Hapsedilen iyonlar tuzaga uygulanan radyo frekansının değiştirilmesiyle detektöre sıralı bir şekilde gönderilebilmekte ya da istenen iyon/iyonlar diğer iyonlardan ayrılarak tuzagin içinde yalnız bırakılabilmektedir. Böylelikle istenen iyonlar izole edilip tuzaga uygulanan alternatif akım ile parçalanabilmektedir. Oluşturulan parçalardan istenenler tuzakta izole edilip tekrar parçalanabilmektedir. Dolayısıyla defalarca kütle parçalanma işlemi yapılabilir. Bu özellikten dolayı iyon tuzagi analizörleri  $n$  kadar iyon izolasyonu ve parçalama işlemi yapılabileceğini ifade eden  $MS^n$  simgesiyle gösterilebilmektedir (Hoffman ve Stroobant, 2001a).

İyon tuzagi kütle analizörünün geometrisi **Sekil 2'** de gösterilmektedir.





**Sekil 2. İyon Tuzagının Üç Boyutlu Kesiti ve Parçaları**

$MS^n$  özelliğine sahip kütle analizörlerinde miktar tayini yapılırken bileşen parçalanarak oluşturulan bileşen parçası sinyal olarak değerlendirildiği takdirde sinyal/gürültü oranı (S/N) değeri dolayısıyla analizin hassasiyeti de artırılabilir. Bu özellik MRM ya da SRM olarak ifade edilmektedir (Tsoupras, 2005).

### ***Sivi kromatografisi-kütle spektrometrisi çalışmalarında kullanılan hareketli fazın özellikleri***

LC-MS çalışmalarında iyonlaştırma püskürtme yöntemleriyle yapıldığında hareketli fazın akış hızı püskürtme sırasında oluşan damlacık büyüklüğünü dolayısıyla analizöre giren iyon miktarını değiştirebilmektedir. Bu nedenle geleneksel HPLC analizlerinde kullanılan akış hızlarından daha düşük akış hızları (0.1 ya da 0.2 mL.dk<sup>-1</sup>) tercih edilmektedir. Yavaş akış hızı, iyonlaştırma odacığındaki püskürtmenin verimini dolayısıyla sivi fazdan kurtulup analizöre ulaşan iyonların miktarını arttırmaktadır.

Kullanılan hareketli faz içeriği bakımından da geleneksel HPLC çalışmalarından farklılık göstermektedir. LC-MS çalışmalarında kullanılan hareketli faz içeriklerinde uçucu olmayan bileşenler kullanılmamalıdır. Fosfat tamponu gibi uçucu olmayan bileşenler iyonlaştırma odasında kristalleşerek metal yüzeylerde birirmektedir (Tsoupras, 2005).

LC-MS çalışmalarında iyonlaştırma odacığında bileşenlerin iyonlaşmasını sağlamak ya da kolaylaştırmak için hareketli faza uçucu özellikteki  $H^+$  ya da  $OH^-$  kaynakları eklenmelidir. Genel olarak bu amaçla kullanılan kimyasallar asetik asit, formik asit ve amonyak çözeltileridir. Bu kimyasalların hareketli fazdaki derişiminin % 0.1 ile % 1 arasında değişebileceği kaynaklarda görülmektedir. Tampon çözelti ile çalışılmak istendiğinde LC-MS çalışmalarında uçucu özellikteki  $NH_4COOCH_3$  tamponun 1-10 mM derişim aralığında kullanılması gerektiği kaynaklarda belirtilmiştir (Tsoupras, 2004).

İyonlaştırma odacığındaki metal yüzeylere zarar veren bir diğer kimyasal da HCl gibi mineral asitlerdir. Bu tip asitler odacığındaki metal yüzeyler ile reaksiyona girip yüzeyin bozulmasına neden olmaktadır.

LC-MS çalışmalarında hareketli faza eklenen iyon çifti bileşenleri ya da derişik tuzların cihazın hassasiyetini azalttığı kaynaklarda bildirilmektedir (Törnkvist ve ark., 2004). Bu kimyasallar analiz sırasında kolaylıkla iyonlaştıkları için iyonlaştırma odacığındaki iyon miktarını arttırarak analiz edilecek maddelerin analizöre ulaşan miktarını azaltırlar. Bu etkiye iyon baskılaması denmektedir.

HPLC çalışmalarında kullanan tüm ters faz ayırım kolonları LC-MS çalışmalarında kullanılabilir. Fakat taranan çalışmalarda daha ince (2.1 mm vb) kolonların kullanılmasının analiz hassasiyetini arttırdığı ifade edilmektedir. Kilcal kolon (100 µm) kullanıldığında hassasiyetin çok daha fazla olduğu da belirtilmiştir (Tsoupras 2005).

### **Mikrodiyaliz**

Mikrodiyaliz canlı organizma dokularındaki hücreler arası sıvıdan örnek almak için geliştirilmiş bir *in vivo* yöntemdir. Mikrodiyaliz ilk olarak 1966 yılında Bito ve arkadaşları tarafından yarı geçirgen bir zar kullanılarak köpek beyininde ve plazmasından serbest amino asitlerin toplanması için uygulanmıştır. Delgado ve arkadaşları 1972 senesinde ilk ilkel mikrodiyaliz probunu geliştirmiş ve *dialytrode* olarak isimlendirmişlerdir. Bugünkü anlamıyla ilk *in vivo* mikrodiyaliz düzenegi 1974 senesinde Urban Ungersted tarafından yapay bir kilcal kan damarı örnek alınarak İsveç'teki Karolinska Enstitüsünde oluşturulmuştur (http-2). Mikrodiyaliz araç gereçlerini üreten ve satan ilk ticari firma 1984'te kurulmuştur. Mikrodiyaliz yöntemi seksenlerin sonlarından itibaren de klinik araştırmalarda insanlar üzerinde de kullanılmaya başlanmıştır (http-3).

Temel bir *in vivo* mikrodiyaliz düzenegi diyaliz pompası, diyaliz çözeltisi, diyaliz probu ve örneklerin toplandığı bir toplayıcıdan oluşur.

### **Mikrodiyaliz pompası**

Diyaliz çözeltisini proba pompalayan siringa pompalardır. Akis hızı hassas olarak ayarlanabilmeli ve sabit akis hızı sağlanmalıdır. Toplanması amaçlanan kimyasal maddelerin dokudan birim hacim diyaliz çözeltisine difüzyonu pompanın akis hızına bağlıdır. Mikrodiyaliz pompası diyaliz çözeltisini ne kadar yavaş pompalar ise, dokudaki maddelerin birim hacim diyaliz çözeltisine difüzyonu o kadar fazla olmaktadır. Böylelikle toplanan diyalizatlardaki kimyasal madde derişimi artırılmış olmaktadır. Bununla birlikte pompanın kesin ve sabit bir akis sağlaması diyalizatlardaki maddelerin derişiminde kesinlik ve doğruluk sağlamaktadır. Mikrodiyaliz pompaları 0.5-15 µL.dk<sup>-1</sup> akis hızlarında çalışabilen pompalardır. Beyinde yapılan mikrodiyaliz çalışmalarında hücreler arası sıvıdaki endojen beyin kimyasallarının düşük derişimi nedeniyle 1 ya da 2 µL.dk<sup>-1</sup> akis hızları tercih edilmektedir (Le Quellec ve ark. 1995).

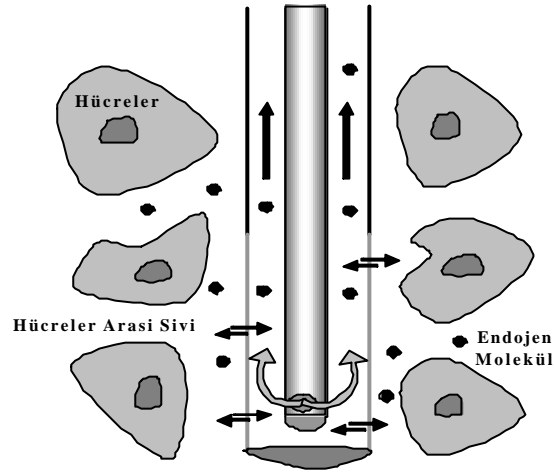
### **Mikrodiyaliz çözeltisi**

Örneklerin toplandığı çözeltidir. Yarı geçirgen bir zarın moleküller ve iyonlar hücreler arası sıvıdan diyaliz çözeltisine basit difüzyon yoluyla, çok derişik olan yerden az derişik olan yere doğru hareket ederler. Probu yerleştirildiği dokudaki hücreler arası sıvının iyonik siddeti ve pH'sına eşit diyaliz çözeltileri kullanılmalıdır. Aksi durumda probun yerleştirildiği doku zarar görmekte bu nedenle toplanacak kimyasal maddelerin bazal derişimleri değişmektedir. Dolayısıyla, diyaliz çözeltisi örnek toplanacak hücreler arası sıvıya göre

belirlenmektedir. Diyalizat örnekleri kandan ya da beyin disinda bir dokudan diyalizat toplanacak ise, mikrodiyaliz çözeltisi olarak % 0.9 NaCl içeren pH 7.4 fizyolojik serum kullanılmaktadır. Örnekler beyin dokusundan toplanacak ise Ringer çözeltisi (135 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.4 mM CaCl<sub>2</sub>) ya da yapay beyin omurilik sivisi (128 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 21.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0) kullanılmaktadır (Chen ve ark., 1997; McNay ve Gold, 1999).

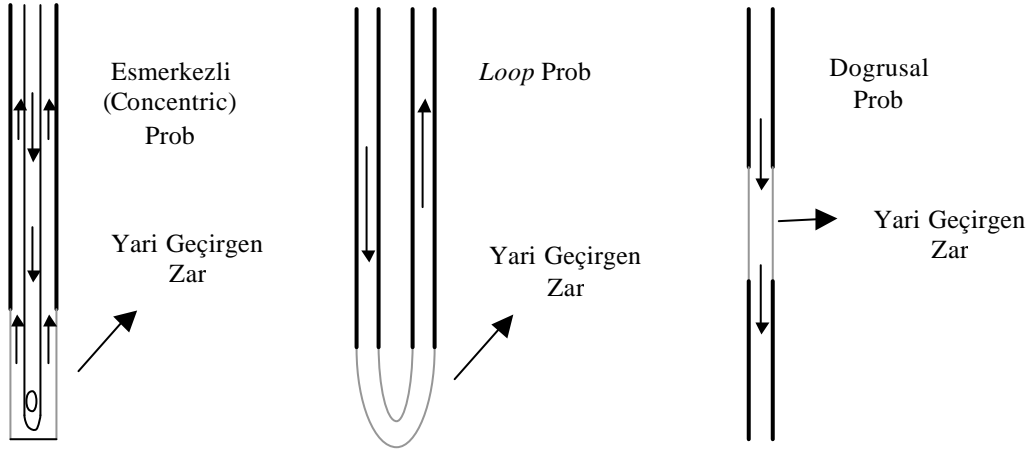
### ***Mikrodiyaliz problari***

Örneklerin toplandigi kismidir. Toplanacak kimyasal maddelerin hücreler arasi sividan yari geçirgen zar araciligi ile diyaliz çözeltisine difüze oldugu kism mikrodiyaliz probudur. Mikrodiyaliz problari sert ya da esnek bir iskeletten ve maddelerin difüzyona ugradigi bir yari geçirgen zardan olusur.



**Sekil 3. Hücreler Arasi Sividan Endojen Moleküllerin Probdan Diyaliz Çözeltisine Difüzyonu**

Toplanacak kimyasal maddelere ve maddelerin toplanacagi dokuya göre, farklı şekillerde ve farklı zar yapılarında proplar geliştirilmiştir. Probu yerleştirileceği dokuya göre esmerkezli, loop ve dogrusal şekillerde proplar mevcuttur. En fazla tercih edilen prob şekli esmerkezli olmaktadır. Siçan beyninde yapılan mikrodiyaliz çalışmalarında probu beynin belli bir bölgesine hassas koordinatlarla konumlandırabilmek için sert iskeletli esmerkez problari kullanılmaktadır. Damara ya da karaciger gibi dokulara yerlestirilen proplar ise esnek iskeletli problardir.



**Sekil 4. Geometrilerine Göre Prob Sekilleri ve Diyaliz Çözeltisinin Probtan Geçisi**

Dokudan toplanılacak kimyasal maddenin molekül büyüklüğüne göre farklı gözenek boyutlarına sahip yarı geçirgen zarlardan yapılmış probalar da mevcuttur. Hedeflenen molekül ya da moleküllerin büyüklüğü 100.000 Dalton'a kadar ise büyük gözenek çaplı PES polimeri, eğer 20.000 Dalton'dan küçük moleküller toplanmak isteniyorsa küçük gözenekli PC polimeri yarı geçirgen zar olarak kullanılabilir (http-4).

#### ***Mikrodiyaliz problarından geri kazanım***

Çalışılan koşullarda mikrodiyaliz yöntemiyle toplanan örneklerin dokudaki gerçek değerini ne kadarını yansıttığını belirlemek için yapılan çalışmalardır. Problardan geri kazanım yöntemleri genel olarak dört başlık altında toplanmaktadır.

#### ***Standart çözelti kullanarak in vitro geri kazanım***

Denek olarak kullanılan organizmadan bağımsız olarak standart çözeltiler kullanılarak yapılan bir işlemdir. Mikrodiyalizatlarda ölçülecek madde/maddelerin standart çözeltilerinin hazırlanması ve probun bu çözeltilere batırılarak biyolojik sıcaklıkta diyalizat toplanması ile gerçekleştirilir. Toplanan diyalizatta ölçülen madde miktarı ile probun batırıldığı standart çözelti içindeki madde miktarı oranlanarak probdan geri kazanım yüzdesi olarak hesaplanır (Le Quellec ve ark., 1995).

#### ***Zero-net flux***

Bu geri kazanım hesaplama yöntemi *in vivo* ya da *in vitro* olarak yapılabilir. Diyalizat çözeltisi artan hızlarda verilerek örnekler toplanır ve analiz edilir. Hız karşı diyalizattaki madde derişiminin grafiği çizilerek sıfır hızdaki diyaliz çözeltisinin derişimi ekstrapole edilir. Sıfır hıza karşı gelen diyalizattaki madde derişiminin dokudaki madde derişimine eşit olduğu kabul edilmektedir (McNay ve Gold, 1999).

#### ***No net flux***

Bu yöntem de *zero-net flux* yöntemi gibi hem *in vivo* hem de *in vitro* yapılabilir. Toplanan örneklerde ölçülecek madde ya da maddeler farklı derişimlerde diyaliz çözeltisine eklenir ve eklenen madde derişimine karşı toplanan diyalizatlarda ölçülen madde derişimleri grafiğe geçirilerek oluşturulan doğru denkleminin

regresyon analizi yapılır. Doğru denkleminin x eksenini kestigi degere karşı gelen derisim dokudaki derisimi ifade etmektedir (Lange ve ark., 1999).

#### *Retro dialysis*

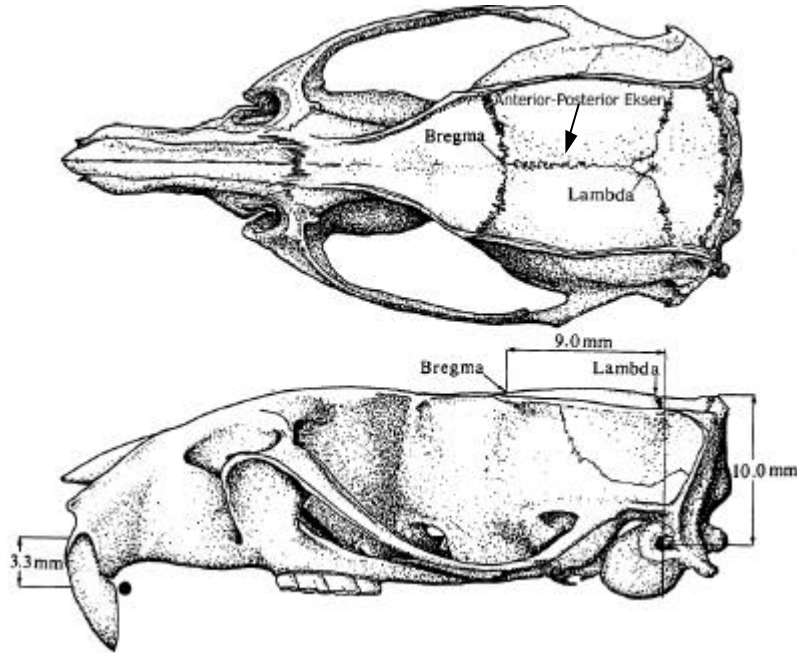
Diyaliz çözeltilisine, ölçümü yapılacak maddenin dışında farklı standart bir madde eklenir ve toplanan diyalizatlarda söz konusu maddenin derisimi de ölçülür. Toplanan diyalizattaki standart maddenin derisiminin, eklenen standart madde derisimine oranını, ölçülecek maddenin geri kazanım oranına eşit olduğu kabul edilerek ölçülen maddenin geri kazanımı hesaplanır (Le Quellec ve ark., 1995).

#### **Stereotaksik Sistem**

Üç boyutlu koordinatlandırma düzenekleridir. Dene hayvanının türüne göre özelleşmiş düzeneklerdir. Stereotaksik tabla mikrodializ probunun beyin dokusunda belirlenen bölüme yerleştirilmesi için kullanılır.

Siçanlarla yapılan beyin mikrodializ çalışmalarında George Paxinos ve Charles Watson adındaki iki Avustralyalı bilim adamının ilk baskısını 1982'de yayınladıkları siçan beyninin stereotaksisi atlasının kullanıldığı görülmektedir (Tunçel ve ark., 2005). Atlasın ilk baskısından sonra sırasıyla 1986, 1996 ve 1998 senelerinde geliştirilmiş ikinci, üçüncü ve dördüncü baskılar da yayınlanmıştır (Paxinos ve Watson, 1996).

Paxinos ve Watson'ın atlasında siçan kafatasında gözle görülebilecek iki referans nokta kullanarak bu referans noktalara olan uzaklıklarına göre beyin bölümleri koordinatlandırılmıştır. Bu referans noktalar *lambda* ve *bregma* olarak adlandırılmıştır. Atlasta beyin bölgelerinin, *lambda*ya ve *bregma*ya uzaklığı, *anterior-posterior* eksenine ne kadar sağında ya da solunda kaldığı ve kafatasının üst noktasından ne kadar derinlikte olduğu 0.1 mm hassasiyetle gösterilmektedir (Paxinos ve Watson, 1996).



**Sekil 5. Paxinos ve Watson Atlasının Siçan Kafatası Üzerindeki Referans Noktaları (Paxinos ve Watson, 1996)**



## **GEREÇLER**

### **Kullanılan Maddeler**

Amonyum Asetat	: Riedel-de Haën, Almanya
Asetik Asit	: Merck, Almanya
ACh	: Sigma, Amerika
ACN	: Merck, Almanya
Borat	: BDH Chemicals Ltd., İngiltere
DOPAC	: Acros Organics, Belçika
Dopamin	: Sigma, Amerika
Epinefrin	: Sigma, Amerika
Etanol	: Tekel, Türkiye
Fosfat	: Merck, Almanya
GABA	: Acros Organics, Belçika
Histamin	: Acros Organics, Belçika
L-GLU	: Merck, Almanya
Kalsiyum Klorür	: Riedel-de Haën, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
Norepinefrin	: Sigma, Amerika
NBD-Cl	: Sigma, Amerika
Potasyum Klorür	: Merck, Almanya
Sodyum Klorür	: Carlo Erba, İtalya
Üretan	: Sigma, Amerika

### **Kullanılan Cihazlar**

Buzdolabi	: Arçelik, No Frost&Electronic, Türkiye
Hassas Terazı	: Ohaus, E12140, İsviçre
İnfüzyon Pompası	: KD Scientific, Amerika
LC-MS	: Agilent Technologies, LC1100, Almanya Agilent 1100 kolon firini Agilent 1100 gaz arındırıcı Agilent 1100 pompa Agilent 1100 oto enjektör Agilent Technologies, MS Trap SL, Amerika

Mikrodiyaliz Düzenegi	: CMA Co., CMA/102, İsveç Pompa 102 Prob CMA 12 PES Örnek toplayici CMA 170
pH Metre	: Electro-mag, M822, Türkiye
Stereotaksik Tabla	: David Kopf Instruments, Amerika
Su Aritma Cihazı	: Human UP 900, Kore
Su Banyosu	: Memmert, WB14, Almanya
Ultrasonik Banyo	: Ultrasonic, LC30, Almanya
Vorteks	: Nuvemix, NM110, Türkiye



## YÖNTEMLER

Bu bölümde, *nörotransmitter*'lerin LC-MS yöntemi ile yapılan analitik denemeler, analiz koşulları, mikrodiyaliz işlemleri, örnek toplanması ve analizi hakkında yapılanlar anlatılmaktadır.

### **Sivi Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (İyon Tuzagi) Çalışmaları**

*Nörotransmitter*'lerin analizi için seçilen LC-MS (iyon tuzagi) yöntemi, bileşenlerin kütle sinyalleri ve kütlelerinin parçalanmalarından elde edilen parça sinyalleri üzerinden kantitatif çalışmalar yapılabilen, seçiciliği yüksek bir yöntemdir. Endojen kimyasalların ve ilaç metabolitlerinin tayini ve saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Hoffman ve Stroobant, 2001a).

Kromatografik çalışmalara geçilmeden önce MS ile bileşenlerin ana kütle ve parçalanma sinyalleri incelenmiştir.

#### ***Nörotransmitterlerin stok çözeltileri***

İncelenen tüm bileşenlerin standartları suda çözünebilen formlarda olduğundan ana standart çözeltileri yaklaşık  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  derisimde olacak şekilde sadece ultra-saf su ile hazırlanmış ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

#### ***Kütle spektrometrisi parçalanmaları***

MS parçalanmalarını incelemek için kullanılan çözeltiler ana çözeltilerden % 25 MeOH içeren  $10 \mu\text{M NH}_4\text{COOCH}_3$  çözeltisi ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Bileşenlerin kütle parçalanmaları sürekli akis yöntemi ile belirlenmiştir. Bir siringa pompa yardımıyla bileşenlerin  $500 \text{ ng.mL}^{-1}$  derisimdeki standart çözeltileri sürekli akis yöntemi ile doğrudan ESI yoluyla kütle analizörüne gönderilerek gerçekleştirilmiştir. % 25 MeOH içeren  $10 \mu\text{M NH}_4\text{COOCH}_3$  çözeltisi ortamında çalışılmıştır. Kütle taraması 50-300 m/z aralığında yapılmıştır.

Bileşenlerin analiz çözeltilerine uygulanan sürekli akis ve ESI parametreleri **Çizelge 1**'de verilmektedir.

**Çizelge 1. Elektrosprey İyonlaştırma Parametreleri**

Enjeksiyon pompasının akis hızı	$800 \mu\text{L.s}^{-1}$
Sprey azotun basıncı	15 psi
Kurutucu azotun akis hızı	$5 \text{ L.dk}^{-1}$
Kurutucu sıcaklık	$325^{\circ}\text{C}$
İyonlaştırma polaritesi <sup>1</sup>	+
Uygulanan parçalama voltajı	1.0
Ana kütlelerin izolasyon aralığı	$2 \text{ m/z}$

<sup>1</sup> DOPAC bileşiminin iyonlaştırılması eksi polaritede gerçekleştirilebilmiştir.

## ***Nörotransmitterlerin sivi kromatografisi-kütle spektrometresi ile ayırım ve saptama denemeleri***

*Nörotransmitter*'lerin oldukça polar yapıda moleküller olduğu kaynaklarda belirtilmektedir (Zhang ve Beyer, 2006). Bu nedenle geleneksel ters faz LC kolonları ile ayırımları gerçekleştirilememektedir (Törnkvist ve ark. 2004). Geleneksel HPLC çalışmalarında polar bileşikler için uygulanan iyon çifti yönteminin MS sinyallerini örttüğü, bu nedenle beyindeki bazal derisimlerinin LC-MS ile analiz edilemediği de kaynaklarda belirtilmektedir (Törnkvist ve ark. 2004). Bu nedenlerle tez çalışmasının basında polar maddeleri, iyon çifti kimyasalları kullanmadan alıkoymak için geliştirilmiş yeni ters faz kolonları denenmiştir. Zorbax (2.1x100 mm) C16 amit kolon ve % 100 sulu hareketli fazda çalışılabilen Zorbax (2.1x100 mm) Aqua kolonu, % 0.1 asetik asit içeren ACN-saf su hareketli faz karışımları ve sadece % 0.1 asetik asit içeren sulu hareketli fazlar kullanılarak denenmiş fakat ayırım sağlanamamıştır.

### ***Nörotransmitterlerin türevlendirilmesi***

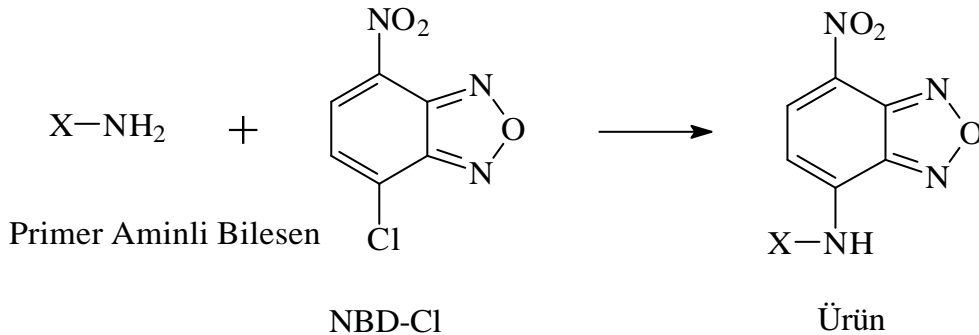
Polar bileşenler için üretilen kolonlardan sonuç alınamayınca *nörotransmitter*'lere başka bir molekül bağlayarak apolar özelliklerinin artırılması yoluna gidilmiştir.

*Nörotransmitter*'lerin türevlendirilmesi için primer amin grubu taşıyan bileşenlerle kolaylıkla bağlanabilen NBD-Cl molekülü seçilmiştir (Song, ve ark. 2005).

NBD-Cl'ün, primer amin grubu taşıyan moleküllerle reaksiyona girerek meydana getirdiği ürüne floresan özellik kazandırmasının yanı sıra, NBD-Cl'nin türev bileşenlerinin, apolar özelliklerini arttırdığı da Song ve ark. tarafından belirtilmektedir (2005).

NBD-Cl ile türevlendirme reaksiyonu, genellikle bazik, bileşene göre değişebilen pH'larda ve 65°C sıcaklıkta 20 dk içinde gerçekleşmektedir (Song., ve ark. 2005) .

Tez kapsamında seçilen *nörotransmitterlerin* arasında primer amin grubu taşıyan GABA, L-GLU, histamin, dopamin ve norepinefrin için NBD-Cl ile türevlendirme çalışması yapılmıştır. NBD-Cl'ün, primer amin grubu taşıyan moleküllerle reaksiyonu **Sekil 6'** da gösterilmektedir.



**Sekil 6. 4-Kloro-7-Nitro-2,1,3-Benzoksadiyazol Molekülü ile Primer Amin Taşıyan Moleküllerin Reaksiyonu**

### *Türevlendirme reaksiyonunda kullanılan çözeltiler*

Tez kapsamında seçilen *nörotransmitter*'ler arasında primer amin grubu taşıyan GABA, L-GLU, histamin, dopamin ve norepinefrin için  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  derisiminde saf su ile stok standart çözeltileri hazırlanmıştır. Türevlendirme işlemleri sırasında bileşenlerin stok çözeltileri seyreltilerek 500, 250, 125  $\text{ng.mL}^{-1}$  derisiminde çözeltiler hazırlanmıştır. Seyreltmelerde mikrodializ vasatı ile benzerlik tasıması için Ringer çözeltisi kullanılmıştır.

Bazık ortam sağlamak üzere 100 mM borat çözeltisi hazırlanmış ve derisik HCl kullanılarak pH'si 9'a ayarlanmıştır.

NBD-Cl çözeltisi ACN içinde çözülerek 10 mM derisimde hazırlanmıştır.

### *Türevlendirme reaksiyonu*

50  $\mu\text{L}$  standart madde çözeltisi, 25  $\mu\text{L}$  10 mM NBD-Cl çözeltisi ve 25  $\mu\text{L}$  100 mM pH 9 borat tamponu 500  $\mu\text{L}$ 'lik kapaklı polipropilen tüplerde vorteks kullanılarak karıştırılmıştır.

Standart madde içermeyen Ringer çözeltisi ile yukarıdaki işlemlerle bir de bos (*blank*) örnek hazırlanmıştır.

Türev reaksiyonu  $65^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış ve su banyosunda 20 dk boyunca karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Sürenin sonunda çözeltiler, karanlıkta 5 dk sogumaya bırakılmış ve 300  $\mu\text{L}$ 'lik polipropilen otomatik örnekleyici viallerine alınmıştır. Olusan türevlerin ısıta kararlılıklarının düşük olması nedeniyle otomatik örnekleyici vialleri alüminyum folyo ile sarılmıştır. NBD-Cl türevlerinin  $4^{\circ}\text{C}$ 'ta 24 saat kararlı olduğu bildirilmektedir. (Song ve ark., 2005).

### *Türevlerin sivi kromatografisi-kütle spektrometresi ile analizleri*

#### *Kromatografik koşullar*

LC-MS sinyallerinin ve olusan türev kütlelerinin belirlenmesi çalışmalarında ikili yüksek basınç gradient hareketli faz sistemi kullanılmıştır. A hareketli fazi % 0.1 asetik asit içeren saf su, B hareketli fazi ise % 0.1 asetik asit içeren ACN olarak hazırlanmış ve ultrasonik banyoda çözünmüş gazlardan arındırılmıştır. Yöntemde kullanılan gradient sistem **Çizelge 2**'de verilmiştir. Hareketli fazın akis hızı  $0.2 \text{ mL.dk}^{-1}$  uygulanmıştır.

**Çizelge 2. Uygulanan Gradient Sistem**

Zaman (dk)	A Hareketli Fazi	B Hareketli Fazi
0–20	% 100'den % 50'ye	% 0'dan % 50'ye
20–25	% 50	% 50
25–28	% 50'den % 100'e	% 50'den % 0'a
28–35	% 100	% 0

Ayırma işlemlerinde C18 (100x2.1 mm) Zorbax Aqua kolon kullanılmıştır. Örneklerin kolona enjeksiyonu 10 µL hacimde gerçekleştirilmiştir.

Ayırım süresince kolon fırını 35°C sabit sıcaklığa ayarlanmıştır.

#### *Kütle spektrometresi koşulları*

MS sinyalleri 50–1000 m/z arasında taranmıştır. ESI'da püskürtücü gaz olarak azot 35 psi basıncında uygulanmıştır. Kurutucu gaz olarak azot kullanılmış ve 350°C'de 9 L.dk<sup>-1</sup> hızda uygulanmıştır. İyonizasyon için artı polarite seçilmiştir. Artı iyonlaşan bileşenleri analizöre hızlandırabilmek için iyonlaşma odacığında -3000 V elektriksel voltaj uygulanmıştır. Kilcal giriş voltajı olarak -3500 V uygulanmıştır.

İyon tuzagina dolan iyon miktarı 60000 *coulombic* yük, tuzagin açık kalma süresi 300 ms olarak uygulanmıştır.

ESI'dan kütle analizörüne kadar olan elektriksel parametreler 300 m/z hedef değere göre yazılım tarafından ayarlanmıştır.

#### *Türev sinyallerinin belirlenmesi*

Türev sinyallerinin belirlenmesinde oluşan türevin kütlesi (olası m/z değeri) ve boş örnek ile farklılaşmalar esas alınmıştır. Bu koşulların sağlandığı durumlarda artan derisimlerdeki sinyal değişiklikleri ile son karar verilmiştir.

Çalışmanın bu kısmında histamin ve GABA bileşenlerinin sinyalleri tanımlanabilmektedir. Diğer primer aminli bileşenlerin analizlerinde boş örnek kromatogramı ile farklılık saptanamamıştır. Bu nedenle çalışmanın geri kalanında sadece histamin ve GABA bileşenleri incelenmiştir.

Alikonma zamanları belirlenen türev bileşenlerinin kantitatif analiz için SRM işlemi uygulanmış ve MS<sup>2</sup> parçalanma ürünleri belirlenmiştir.

SRM işlemi için kromatogramda histaminin ve GABA sinyallerinin olduğu bölgelere ayrı ayrı MS parametreler uygulanmıştır.

Histamin sinyalinin olduğu bölgede iyon optikleri 275 m/z'ye göre yazılım tarafından ayarlanmıştır. MS<sup>2</sup> parçalanması SRM işlemi ile ana kütle 275 m/z kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ana kütle için ±2 m/z aralığında izolasyonu gerçekleştirilmiş ve 1.0 V parçalama enerjisi kullanılmıştır. MS<sup>2</sup> parçalama işlemi 1.0 V enerjinin % 30'undan başlayıp dogrusal olarak artan akıllı parçalama işlemi olarak uygulanmıştır.

GABA sinyalinin olduğu bölgede iyon optikleri 267 m/z'ye göre yazılım tarafından ayarlanmıştır. MS<sup>2</sup> parçalanması SRM işlemi ile ana kütle 267 m/z kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ana kütle için ±2 m/z aralığında izolasyonu gerçekleştirilmiş ve 1.0 V parçalama enerjisi kullanılmıştır. MS<sup>2</sup> parçalama işlemi 1.0 V enerjinin % 30'undan başlayıp dogrusal olarak artan akıllı parçalama işlemi olarak uygulanmıştır.

MS<sup>2</sup> parçalanmaları belirlendikten sonraki çalışmalarda akıllı parçalama işlemi uygulanmamıştır. Histamin için sabit 1.0 V ve GABA için sabit 1.0 V MS<sup>2</sup> parçalama enerjileri uygulanmıştır.

GABA ve histamin sinyallerinin tespit edildiği bölgelerin her ikisinde de kütle tarama aralığı 80-300 m/z arası tutulmuştur. İyon tuzagina dolan iyon miktarı 30000, tuzagın açık kalma süresi 300 ms olarak ayarlanmıştır.

#### *Türev ortamının pH'sinin taranması*

NBD-Cl ya da diğer türevlendirme ajanlarında türevin gerçekleştiği vasatın pH'sinin önemli olduğu belirtilmektedir (Zhang ve ark., 2005). Bu nedenle türevlendirilecek bileşene göre uygun pH'nin belirlenmesi gerekmektedir.

Bu amaç doğrultusunda pH 6, 7, 8 değerleri için 100 mM fosfat tamponları hazırlanmıştır. pH 9 tamponu için ise 100 mM borat tamponu kullanılmıştır. Her bir tampon çözeltisi ile hazırlanmış 250 ng.mL<sup>-1</sup> derisiminde GABA ve histamin içeren çözeltiler 20 dk karanlık ortamda 65°C'lik su banyosunda türevlendirilmiştir.

Sonuçlar histamin için 275 m/z MS EIC pik alanları, GABA için de 267 m/z'lik MS EIC pik alanları kullanılarak değerlendirilmiştir.

#### *Sivi kromatografisi-kütle spektrometresi yönteminin validasyonu*

Yöntemin validasyon çalışmalarında GABA ve histamin için artan derisimlerde SRM parametreleri kullanılarak doğruluk incelenmiştir. LLOQ, düşük derisimli çözelti sinyallerinin, oluşturulan kalibrasyon eğrilerinden sapması esas alınarak hesaplanmıştır (Zhu ve ark., 2005, ).

Yöntemin doğruluk ve kesinliğinin araştırılması farklı derisimlerdeki çözeltilerin sinyallerinin tekrar edilebilirliği esas alınarak gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2005, Shah ve ark., 2000)).

#### *Doğrusallık*

GABA ve histamin karışımı 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ng.mL<sup>-1</sup> derisimlerde Ringer çözeltisi ile üç set hazırlanmıştır. Türev işlemlerinden sonra belirtilen kromatografik ve SRM koşullarında analizleri gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan derisim gradientinin hangi bölgelerinde bileşenlerin doğrusal pik alanı verdiği incelenmiştir. Bu incelemede GABA için 267 m/z'ye sahip ana kütle ile SRM sonucu oluşan 249 m/z ve 250 m/z EIC MS<sup>2</sup> parçalanma ürünlerinin pik alanları kullanılmıştır. Histamin içinse SRM işlemi sonucunda kararlı bir MS<sup>2</sup> parçası oluşmadığından 275 m/z EIC MS pik alanları kullanılmıştır.

#### *Doğruluk ve kesinlik*

GABA ve histamin karışımı 50, 100, 250 ng.mL<sup>-1</sup> derisimlerde Ringer çözeltisi ile üç set hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyondan 5'er enjeksiyon yapılmıştır. Analizler türev işlemlerinden sonra belirtilen kromatografik ve SRM koşullarında gerçekleştirilmiştir ve değerlendirilmiştir.

## **Mikrodiyaliz Çalışmaları**

Analiz edilecek örnekleri toplamak için mikrodiyaliz yöntemi kullanılmıştır. Tezin bu bölümünde gerçekleştirilen *in vivo* ve *in vitro* mikrodiyaliz işlemleri anlatılmaktadır.

### ***Mikrodiyaliz probu***

Çalışmada metal iskeletli CMA 12 es merkezli beyin mikrodiyaliz probu kullanılmıştır. Kullanılan probun yarı geçirgen zari, PES yapıda olup probun uç kısmından 2 mm yüksekliktedir. Problar ile siringa ve toplayıcı arasındaki bağlantılar için iç çapı 0.12 mm ve iç hacmi 1.2 µL/100mm olan FEP yapılı kilcal borular kullanılmıştır.

### ***Probu kullanıma hazır hale getirilmesi ve yeniden kullanımı***

Ticari olarak satılan mikrodiyaliz problemlerinin zarları gliserinle kaplı ve bir kilif içerisinde ambalajlanmaktadır (http-4). Mikrodiyaliz problemlerinin ilk açılışında koruyucu kilifinden çıkarıldıktan sonra % 70 etanol çözeltisine batırılıp mikrodiyaliz pompasıyla % 70 etanol, 5 µL.dk<sup>-1</sup> hızda 20 dk süresince geçirilmiştir. Ardından saf suya daldırılıp 5 µL.dk<sup>-1</sup> hızda 20 dk süresince saf su geçirilmiştir. Sonrasında 20 dk süreyle Ringer çözeltisi 5 µL.dk<sup>-1</sup> hızda geçirilmiştir. Dokuya yerleştirilmeden önce 1 µL.dk<sup>-1</sup> hızda 20 dk süreyle Ringer çözeltisi geçirilmeye devam edilmiştir.

Örnek toplama işlemi bitirildikten sonra diğer örnek toplama işlemine geçmeden önce prob saf suya daldırılıp probdan 20 dk boyunca 5 µL.dk<sup>-1</sup> hızda saf su geçirilmiştir. Ardından ilk açılışta yapılan yıkama işlemleri tekrar edilmiştir.

Çalışma aralarında kullanılan problemler su içerisinde oda ısısında muhafaza edilmiştir.

Probdan geçirilen tüm çözeltiler çözünmüş gazlardan arındırılmış ve 0.45 µm gözenek çaplı nitroselüloz enjektör ucu süzgeçlerden süzülmüştür.

### ***Örnek toplanacak beyin bölgelerinin koordinatlarının belirlenmesi***

Yapılan kaynak taramalarında GABA ve histamin ölçümünün önem arz ettiği üç beyin bölgesi belirlenmiştir. Bu bölgeler *ventral hypothalamik nucleus*, *lateral hypothalamus* ve *corpus striatum* olarak adlandırılmaktadır (Brown ve ark., 2001; Hu ve ark., 2007).

Belirlenen bölgelerin kafatası üzerindeki gözle görülür yapılar olan *lambda* ve *bregmaya* ön-arka (*anterior-posterior*) eksen üzerinden uzaklıkları, kafatasının orta ön-arka ekseninin ne kadar sağında ya da solunda olduğu ve ilgili bölgenin kafatasından ne kadar derinde olduğu Paxinos ve Watson sıçan beyni stereotaksisi atlası kullanılarak belirlenmiştir (Paxinos ve Watson, 1996). Atlasta bulunan koordinatlar **Çizelge 3**'te gösterilmektedir.

**Çizelge 3. Paxinos ve Watson Atlasına Göre İlgili Bölgelerin Koordinatları**

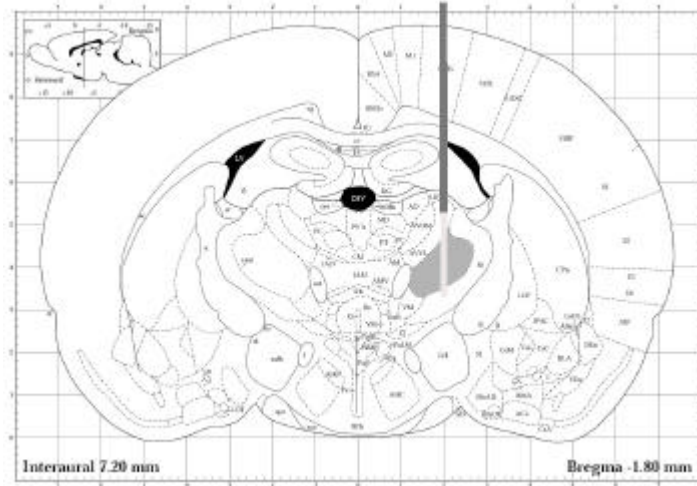
	<i>ventral hypothalamik nucleus</i>	<i>lateral hypothalamus</i>	<i>corpus striatum</i>
<i>Bregmaya</i> uzaklık (mm)	-1.8	-1.8	1.6
<i>Lambda</i> ya uzaklık (mm)	7.2	7.2	10.6
<i>Lateral</i> eksene uzaklık (mm)	-2.0	-2	-2.6
Derinlik (mm)	6.7	8.6	-5.2

Her bölge için ayrı bir denek siçan kullanılmıştır. Siçanların kafataslarında *lambda* ve *bregma* noktaları stereotaksik tablanın koordinat sistemine göre mm cinsinden sayısal hale dönüştürülmüştür. Ön-arka eksene göre siçan kafatasından belirlenen *lambda* ve *bregma* değerleri atlastan belirlenen *lambda*'ya ve *bregma*'ya uzaklık değerleri (mm) ile toplanmıştır. Böylelikle kafatası üzerinde ilgili bölgenin ön-arka eksende hem *lambda* hem de *bregma*'ya uzaklığı hesaplanmıştır. Hesaplanan iki uzaklık değerinin ortalaması alınarak en uygun ön-arka eksen koordinatı hesaplanmıştır.

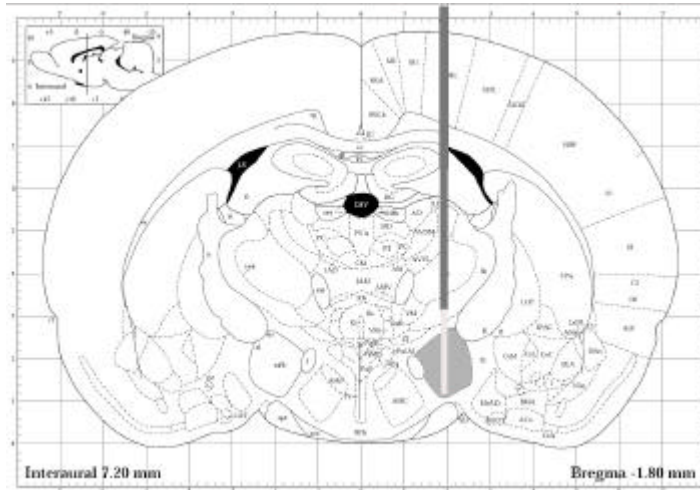
Yansal koordinatin belirlenmesinde orta ön-arka ekseninin stereotaksik tablada koordinatı mm olarak tespit edilip atlastan bulunan orta eksene uzaklık değerleri ile toplanmıştır.

Kafatası yüzeyinin stereotaksik tablaya göre koordinatı okunup atlastan elde edilen derinlik değeri ile toplanarak mikrodializ probunun ne kadar derine yerleştirileceği mm cinsinden hesaplanmıştır.

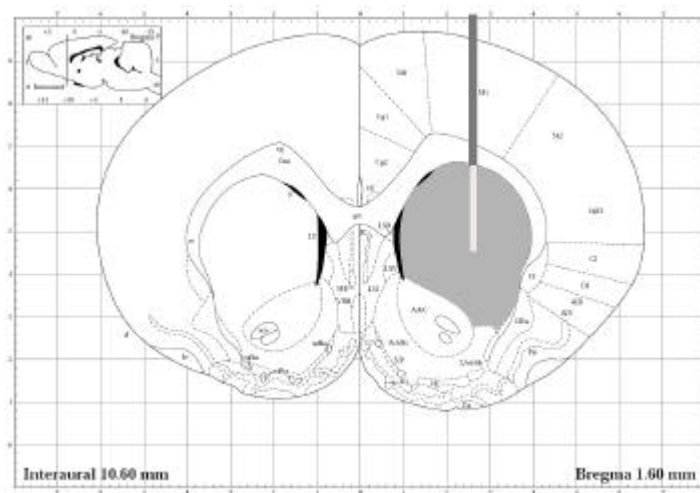
Paxinos ve Watson atlasına göre probun yerleştirildiği beyin bölgeleri **Sekil 7-9**'da gösterilmektedir.



**Sekil 7. Ventral Hypotalamik Nucleus (Griye Boyanmis Bölge) ve Probuun Beyindeki Konumu**



**Sekil 8. Lateral Hypotalamus (Griye Boyanmis Bölge) ve Probuun Beyindeki Konumu**



**Sekil 9. Corpus Striatum (Griye Boyanmis Bölge) ve Probuun Beyindeki Konumu**



### ***Mikrodiyaliz probunun yerlestirilmesi ve örneklerin toplanması***

Örnekler 3–4 haftalık, 12 saat aydinlik 12 saat karanlik periyotlarda büyütölmüş yaklaşık 180 g ağırlığında Wistar siçanlardan toplanmıştır. Siçanlar IP enjeksiyon ile  $1.5 \text{ g.kg}^{-1}$  üreteran verilerek uyutulmuştur. Kulak barları ve üst dişlerin gerisinden bir barla sabitlenerek sterotaksik tablaya yerlestirilmiştir (Tunçel ve ark., 2005). Ön dişlerin gerisine yerlestirilen bar yukarı asagı oynatılarak siçanın kafatasının üst yüzeyi sterotaksik tablaya paralel hale getirilmiştir. Siçanın vücut sıcaklığı ısıtıcı bir tabaka ve *rektal* termostat kullanılarak  $37.4^{\circ}\text{C}$ 'ta sabitlenmiş ve cerrahi işleme hazır hale getirilmiştir. Arka ayakları pens ile sıkıstırmak suretiyle anestezinin derinliği kontrol edildikten sonra cerrahi işleme geçilmiştir.

Kafa derisi, yaklaşık 1.5 cm kesi atılarak açılmıştır. Doku kaziyicisi ile kuvvet uygulamadan kafatası üzerindeki dokular kazınmak suretiyle temizlenmiş ve kafatası 15 dk bir lamba yardımıyla kurutulmuştur. Kuruyan kafatası üzerinde görsel olarak netlesen *lambda* ve *bregma* yapıları belirlenmiştir.

İlgili bölgenin üzerindeki nokta iki boyutlu olarak hem ön-arka eksenindeki yeri hem de yan eksenden uzaklığı belirlenip işaretlenmiştir. Motorlu bir delici ile kafatasında belirlenen noktaya yaklaşık 3 mm çapında bir delik açılmıştır. Beyin zari (*duramater*) steril bir iğneyle delinmiştir. Hazır hale getirilmiş mikrodiyaliz probu deliğin üzerine getirilmiştir. İlgili bölgenin derinliğine kadar iki dk sürecek şekilde yavaşça prob beyin dokusuna yerlestirilmiştir.

Bu işlemler tamamlandıktan sonra mikrodiyaliz pompası çalıştırılıp  $1 \mu\text{L.dk}^{-1}$  hızında Ringer çözeltisi probdan geçirilmeye başlanmıştır. İlk iki saat içinde probdan geçirilen diyaliz çözeltisi toplanmamış, beyin dokusunun kararlı hale gelmesi beklenmiştir. Siçan beyin dokusuna ya da damara yerlestirilen mikrodiyaliz problemlerinin ilk iki saat süresince cerrahi travmaya neden oldukları rapor edilmiştir (Lange ve ark., 1997). Bu sürenin sonunda 40'ar dk sürelerle iki mikrodiyaliz örneği toplanmıştır.

Örnekler  $4^{\circ}\text{C}$ 'ta CMA otomatik örnek toplayıcı ile  $100 \mu\text{L}$ 'lik kapaklı polipropilen tüplere toplanmıştır. Örnekler analize kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'ta saklanmıştır.

### ***Probun geri kazanımı***

Mikrodiyaliz probunun geri kazanımını belirleyebilmek için “Standart çözelti kullanılarak *in vitro* geri kazanım” (s.18) yöntemi kullanılmıştır. Standart çözeltiler olarak 50, 100, 250  $\text{ng.mL}^{-1}$  derisimlerinde Ringer çözeltisi içerisinde hazırlanan GABA ve histamin karışımları kullanılmıştır.

Hazırlanan üç farklı derisimdeki karışımlar  $37.4^{\circ}\text{C}$ 'ta su banyosuna yerlestirilmiştir. Su banyosundaki standart çözeltilere prob daldırılıp anlatılan *in vivo* mikrodiyaliz işlemleri uygulanmıştır.  $1 \mu\text{L.dk}^{-1}$  diyalizat akis hızında Ringer geçirilmiştir. 2 saatin sonunda 40'ar dakikalık süreler boyunca  $40 \mu\text{L}$ 'lik iki örnek  $4^{\circ}\text{C}$ 'ta toplanmıştır. Toplanan geri kazanım örnekleri analize kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'ta saklanmıştır.

Örnekler analiz öncesi oda sıcaklığına getirilmiştir. Türev çözeltilerinin hazırlanmasında  $30 \mu\text{L}$  örnek üzerine,  $15 \mu\text{L}$  pH 9  $100 \text{ mM}$  borat tamponu ve  $15 \mu\text{L}$   $10 \text{ mM}$  NBD-Cl çözeltileri eklenerek karıştırılmıştır. Türevler oluşturulduktan sonra belirtilen koşullarda analizleri gerçekleştirilmiştir.

Toplanan örneklerden ölçülen derisimler ile mikrodiyaliz probunun daldırıldığı standart çözeltilerin derisimleri oranlanıp 100 ile çarpılarak % cinsinden geri kazanım hesaplanmıştır. Farklı derisimlerde hesaplanan prob geri kazanımlarının ortalaması ve standart hataları bulunmuştur.

### ***Örneklerin analizi***

Denek siçanlardan toplanan mikrodiyaliz örnekleri oda sıcaklığına getirildikten sonra türev çözeltilerini hazırlamak için 30 µL örnek üzerine, 15 µL pH 9 100 mM borat tamponu ve 15 µL 10 mM NBD-Cl çözeltileri eklenerek karıştırılmıştır. Türevler oluşturulduktan sonra belirtilen koşullarda analizleri gerçekleştirilmiştir.

Örneklerden hesaplanan derisimlerden, kullanılan probun geri kazanım değeri kullanılarak dokudaki gerçek derisimler aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$GD = \frac{\text{ÖD}}{\%GK} \times 100$$

GD: Dokudaki gerçek derisim

ÖD: Örneklerden ölçülen derisim

% GK: Probun yüzde geri kazanımı

## BULGULAR ve TARTISMA

### Kütle Spektrometrisi Parçalanmaları

Bileşenlerin kütle parçalanmaları sürekli akis yöntemi ile belirlenmiştir. Bir siringa pompa yardımıyla bileşenlerin 500 ng.mL<sup>-1</sup> derisimdeki standart çözeltileri ayrı ayrı sürekli akis yöntemi ile doğrudan ESI yoluyla kütle analizörüne gönderilerek MS, MS<sup>2</sup> ve MS<sup>3</sup> sinyalleri kaydedilmiştir.

% 25 MeOH içeren 10 µM amonyum asetat çözeltisi vasatında bileşenlerin sinyalleri sorunsuz kaydedilebilmiştir. Analiz edilen çözeltilere MeOH ilave edilmesinin nedeni kütle analizörü öncesi ESI aşamasında sıvı faza uçucu özellik kazandırmaktır. Böylelikle iyonlar sıvı fazdan rahatlıkla kurtularak elektriksel alanda kütle analizörüne doğru uçurulabilmektedir. Amonyum asetat ilavesi ile ortamda iyonik siddet oluşturmak, böylelikle bileşenin iyonlaşmasını kolaylaştırmak amaçlanmıştır.

Ortamda iyonik siddet oluşturmak için amonyum asetatın seçilmesinin bir başka nedeni amonyum asetat tamponun uçucu özellik göstermesidir. Böylelikle tamponun ESI odasında kristal oluşturup yüzeyleri kaplayarak yüzeylerde uygulanan elektriksel kuvvetleri deşirmesini engellemektir. Ortamda iyon oluşturmak için uçucu bir asit ya da bazın kullanılmamasının nedeni, bileşenlerin aynı vasat kullanılarak hem artı hem de eksi iyonlaşabilme kabiliyetlerinin incelenmesidir. Eger iyon oluşturmak için uçucu bir asit kullanılırsa ortamdaki proton siddetinden dolayı bileşenlerin eksi yük taşıyan grupları kapanacak ve eksi iyonlaşabilme özellikleri azalacaktır. Uçucu bir baz kullanılmamasının nedeni ise, bileşenlerin artı iyonlaşma özelliğinin ortamdaki OH<sup>-</sup> iyonlarının artı gruplara bağlanması sonucu baskılanacak olmasıdır. Amonyum asetatın ortama hem H<sup>+</sup> hem de OH<sup>-</sup> sunması sonucu bileşenler artı ve eksi iyonlaşabilmiştir.

MeOH ve amonyum asetat ile ilgili derisim taraması yapılmamasının nedeni öngörülen derisimlerde ilgili bileşenlerin kütle ve parçalanma sinyallerinin sorunsuz olarak elde edilmiş olmasıdır. Asıl vasat içeriği incelenmesi kromatografik ayırım çalışmaları aşamasında ele alınmıştır.

İncelenen *nörotransmitter*'lerin kütle sinyalleri 50-300 m/z aralığında taranmıştır. Bu aralık, incelenen *nörotransmitter*'lerin mol kütlelerini kapsamaktadır. Bileşenlerin MS öncü iyon m/z'leri belirlendikten sonra SRM işlemi ile öncü iyonlar 2 m/z aralığında izole edilip 1.0 V parçalama enerjisi ile MS<sup>2</sup> parçaları oluşturulmuştur. Belirlenen MS<sup>2</sup> parçaları MS<sup>3</sup> için ayrı ayrı öncü iyon belirlenerek 2 m/z aralığında izole edildikten sonra 1.0 V parçalama enerjisi ile tekrar parçalanmıştır. Kararlı parçalanma sinyalleri elde edilemediği durumlarda uygulanan parçalama enerjisinin az ya da fazla olduğu düşünülmüş, parçalama enerjisi deşirilerek kararlı sinyaller elde edilmeye çalışılmıştır.

ESI odacığında iyon tuzagina kadar iyonların uçurulduğu (cam kılcal ve iyon optikleri) kısımlara uygulanan elektriksel kuvvetler incelenen bileşenin molekül kütlelerinin yazılıma girilmesi suretiyle, yazılım tarafından en uygun değerlere getirilmiştir.

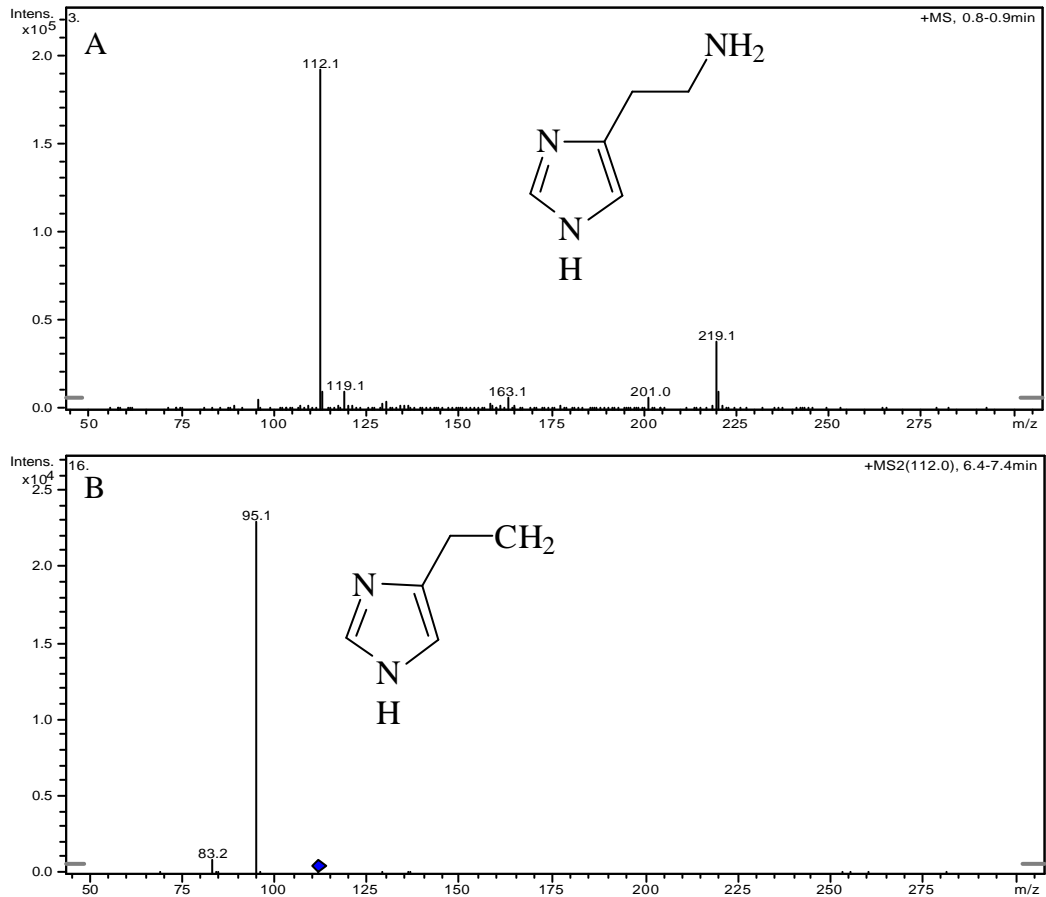
GABA ve L-GLU bileşenleri ESI eksi iyonlaşabilmelerine rağmen artı iyon siddetlerinin daha fazla olması nedeniyle molekül parçalanmaları artı iyonlaştırılarak incelenmiştir.

Böylelikle elde edilen ana kütle m/z sinyalleri ile MS<sup>2</sup> ve MS<sup>3</sup> parçalarının m/z sinyalleri ve sinyallerden çıkarılan ana molekül parçalarının molekül formülleri şekillerde verilen kütle spektrumlarında gösterilmektedir.

Histamin molekülü taşıdığı primer amin grubu üzerine ESI esnasında ortamdan bir H<sup>+</sup> alarak artı iyonlaşmıştır. Bu nedenle histaminin gerçek kütlesi olan 111 g.mol<sup>-1</sup> den bir proton fazla m/z sinyali gözlenmektedir. Kılcal girişine uygulanan -3500 V elektriksel kuvvet ile iyonlar iyon tuzagina doğru hizlandırılmıştır. İyon tuzagina kütle ayırımı ve kütle parçalanmaları gerçekleştirilmiştir.

MS<sup>2</sup> kütle parçalanması bileşenin görece zayıf primer amin grubunun kopması ile gerçekleşmiştir. Primer amin grubunun ana molekülden kopması sonucu oluşan 95.1 m/z sinyaline ait molekül **Sekil 10**'da gösterilmektedir.

MS<sup>2</sup> parçalanma kütlesi 95.1 m/z'den MS<sup>3</sup> parçalanma kütlesi elde edilememiştir.

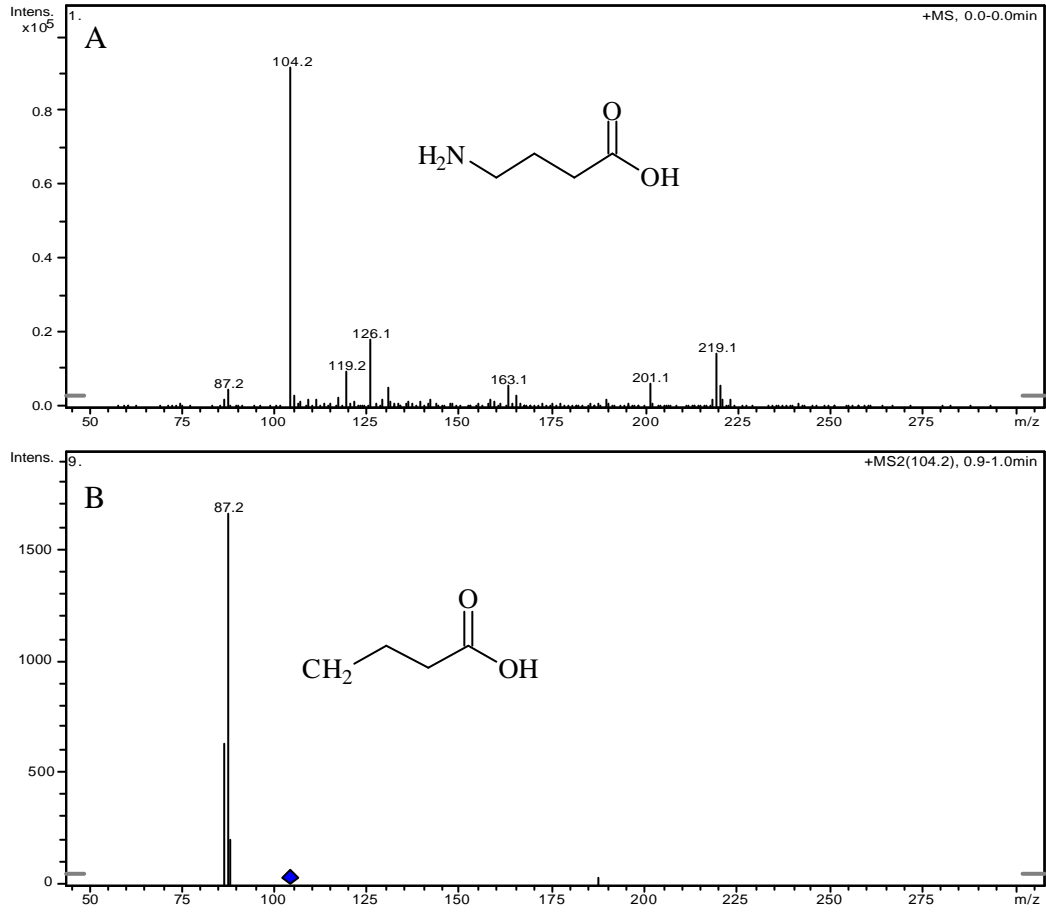


**Sekil 10.** Histaminin (A) MS 112 m/z ve (B) MS<sup>2</sup> 95.1 m/z Spektrumları

GABA molekülü de histamin molekülü gibi tasidigi primer amin grubu üzerine ESI esnasinda ortandan bir  $H^+$  olarak arti ionlasmistir. Bu nedenle GABA'nin gercek kütleli olan  $103 \text{ g.mol}^{-1}$ 'den bir proton fazla  $104 \text{ m/z}$  sinyali gözlenmektedir. Kilcal girisine uygulanan  $-3500 \text{ V}$  elektriksel kuvvet ile iyonlar iyon tuzagina dogru hizlandirilmistir. Iyon tuzagina kütle ayirimi ve kütle parçalanmalari gerçektirilmistir.

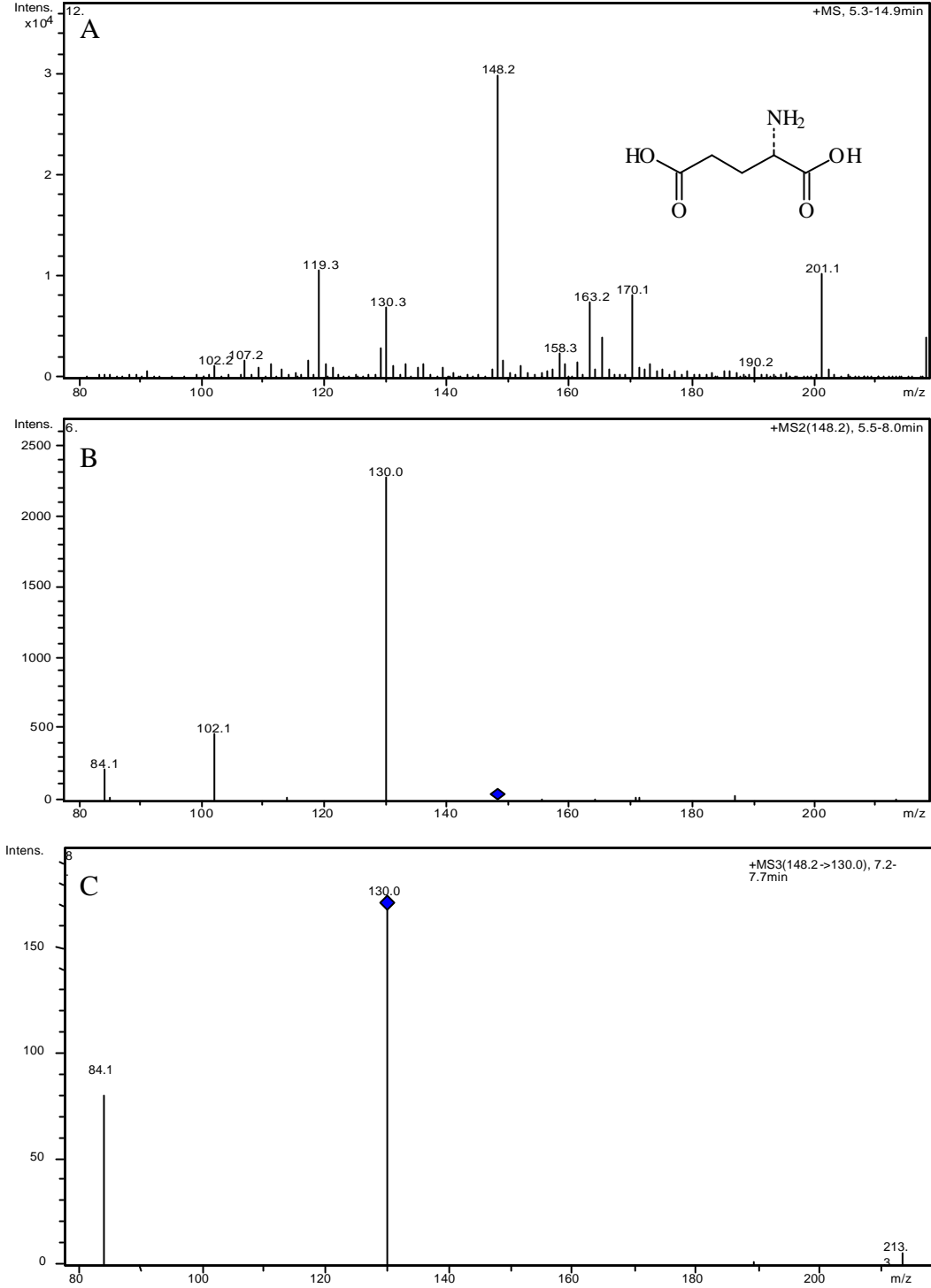
$MS^2$  kütle parçalanmasi bilesenin göreceli olarak zayif primer amin grubunun kopmasi ile gerçektirilmistir. Primer amin grubunun ana molekülden kopmasi sonucu olusan  $87.2 \text{ m/z}$  sinyaline ait molekül **Sekil 11**'de gösterilmektedir.

$MS^2$  parçalanma kütleli  $87.2 \text{ m/z}$ 'den  $MS^3$  parçalanma kütleli elde edilememistir.



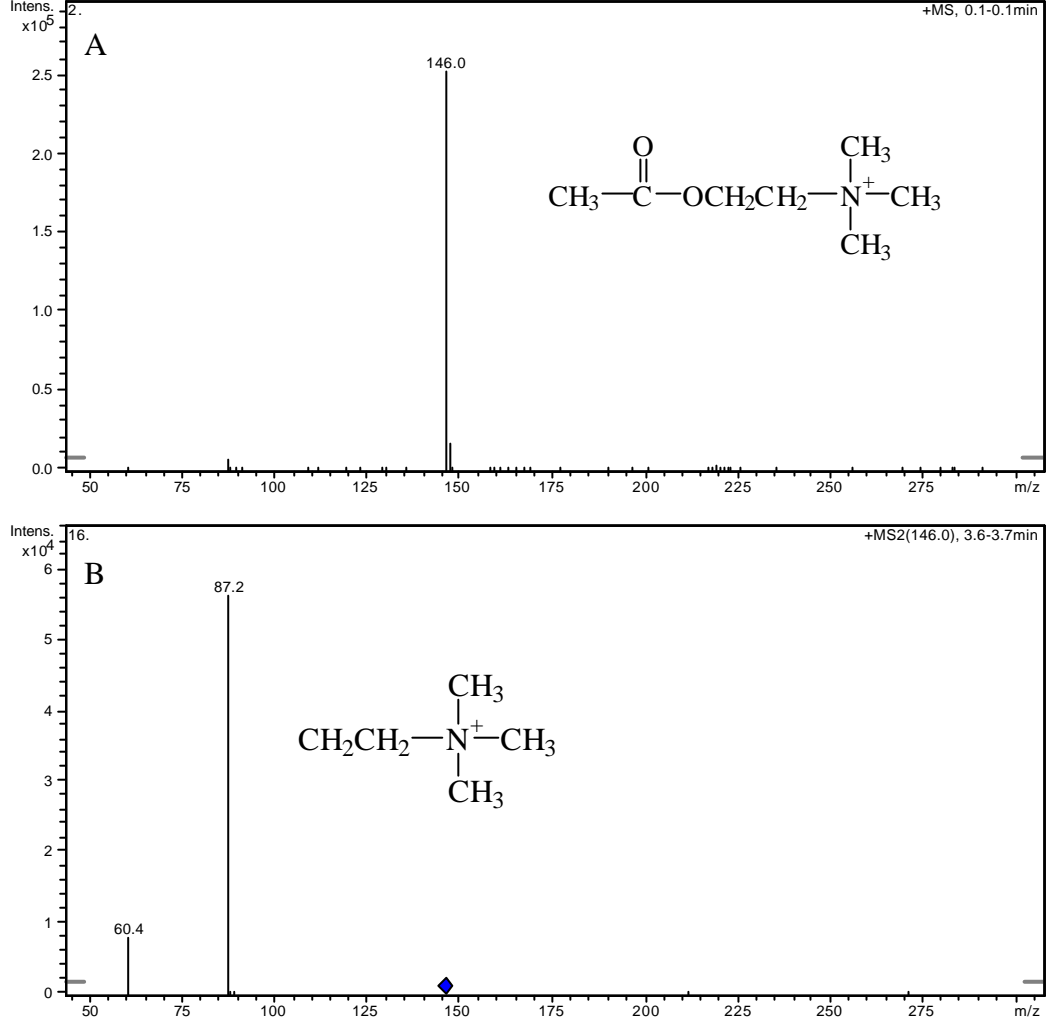
**Sekil 11.  $\gamma$ -amino bütirik asitin (A)  $MS$   $103.2 \text{ m/z}$  ve (B)  $MS^2$   $87.2 \text{ m/z}$  Spektrumları**

L-Glutamat bileşeninin MS<sup>2</sup> ve MS<sup>3</sup> parçalanma ürünleri elde edilmiş olmasına karşın bu ürünlerin molekül yapıları hakkında kaynaklarda bulgu bulunamamış ve parçalanma ürünleri yorumlanamamıştır (**Sekil 12**). MS<sup>2</sup> parçasındaki 18 m/z'lik azalma bileşenin su molekülü kaybettiğini ifade etmektedir.



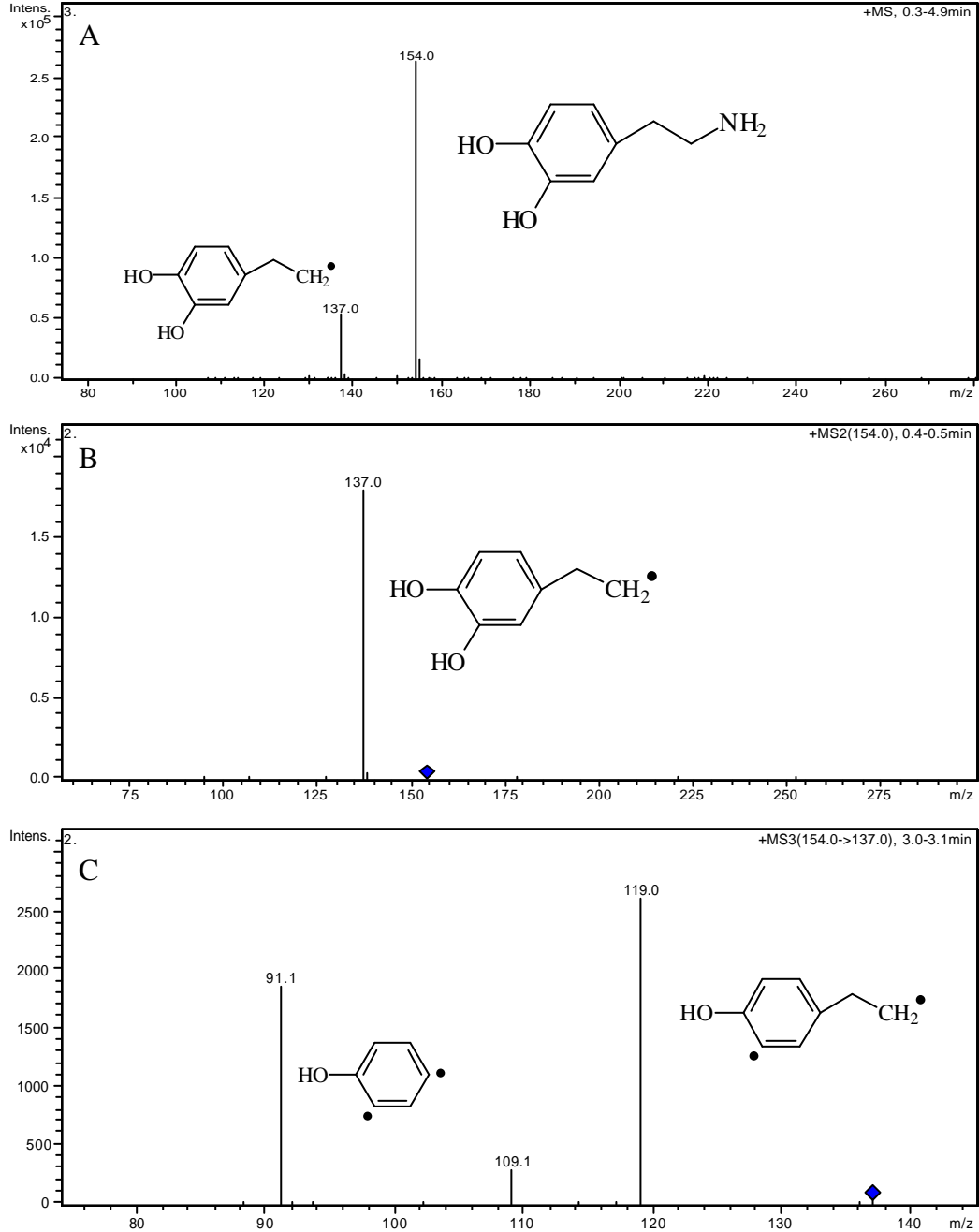
**Sekil 12. L-Glutamatin (A) MS 147 m/z, (B) MS<sup>2</sup> 130 m/z ve (C) MS<sup>3</sup> 84 m/z Spektrumları**

ACh molekülü kendi kimyasal yapısında + yüklü kuarterner amin grubuna sahip olduğundan üzerine proton alarak iyonlaşmamıştır. Bu nedenle ACh molekülünün mol kütesinin ve MS sinyalinin aynı değer 146 m/z olduğu görülmüştür (**Sekil 13**). Taranan kaynaklarda ACh bileşenin iyonik yapısından dolayı iyon degistirme kromatografisi ile ayrıldığı belirtilmektedir (Huang ve ark., 1995). Bu nedenle ACh'in MS spektrumlarından elde edilen bulgular bahsedilen kaynaklari destekler niteliktedir.



**Sekil 13.** Asetilkolinin (A) MS 146 m/z ve (B) MS<sup>2</sup> 87.2 m/z Spektrumları

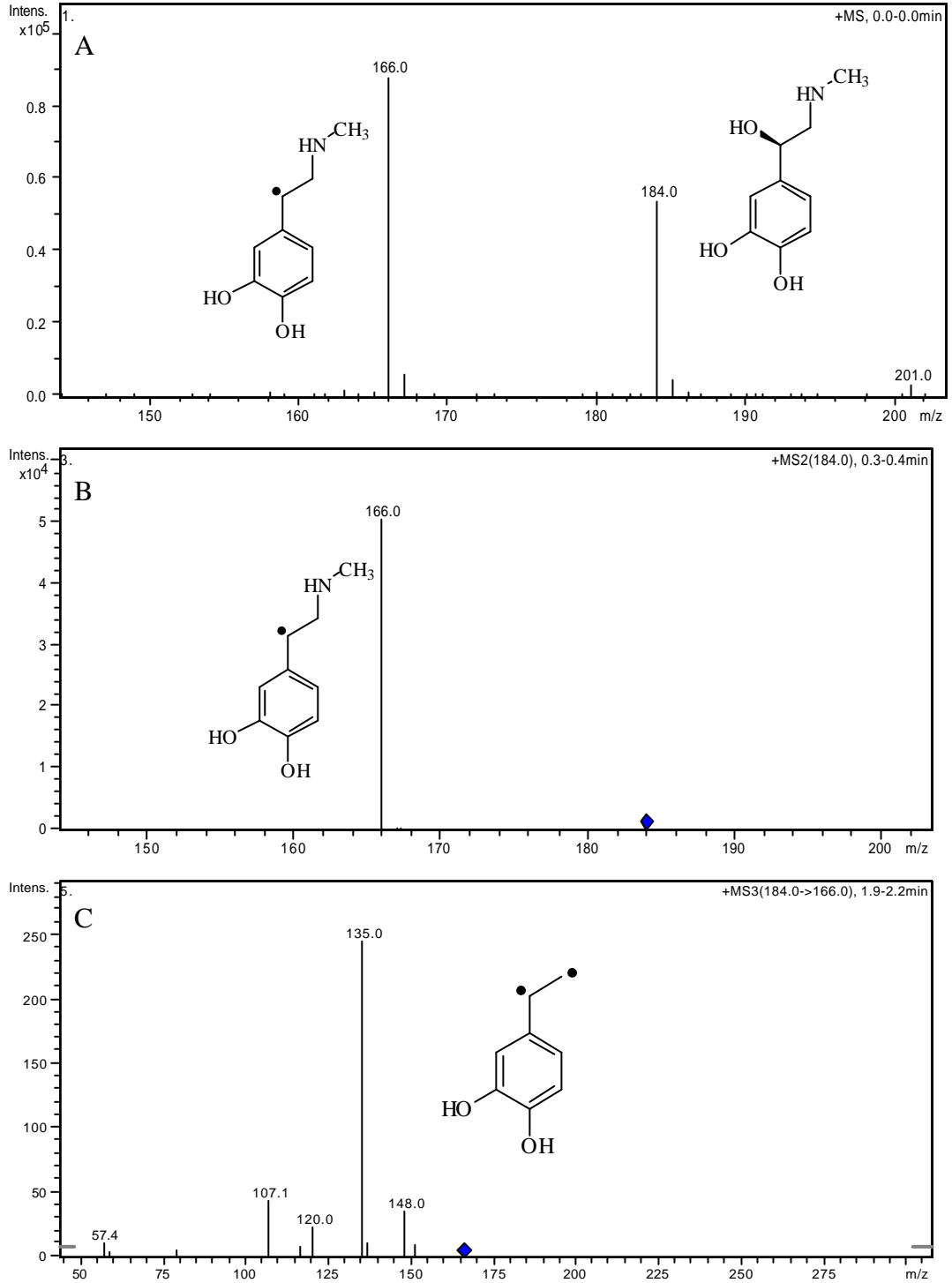
Dopamin bileşeninin de, **Sekil 14**'de görüldüğü gibi, tasidığı primer amin grubu üzerine proton alarak artı iyonlaştığı tespit edilmiştir. MS parçalanmaları GABA ve histamin bileşenlerinde olduğu gibi primer amin grubundan başlamıştır. Farklı olarak dopamin bileşeninin primer amin grubunun GABA ve histamininkinden çok daha kararsız olduğu moleküle herhangi bir parçalama enerjisi uygulanmadan ESI esnasında primer amin grubunun kopmasından anlaşılmaktadır. Bu nedenle dopamin bileşeninin MS sinyallerinde primer amin grubunun kopmasıyla oluşan 137 m/z'lik kütle sinyali görülmektedir.



**Sekil 14.** Dopaminin (A) MS 154 m/z, (B) MS<sup>2</sup> 137 m/z ve (C) MS<sup>3</sup> 119 ve 91.1 m/z Spektrumları

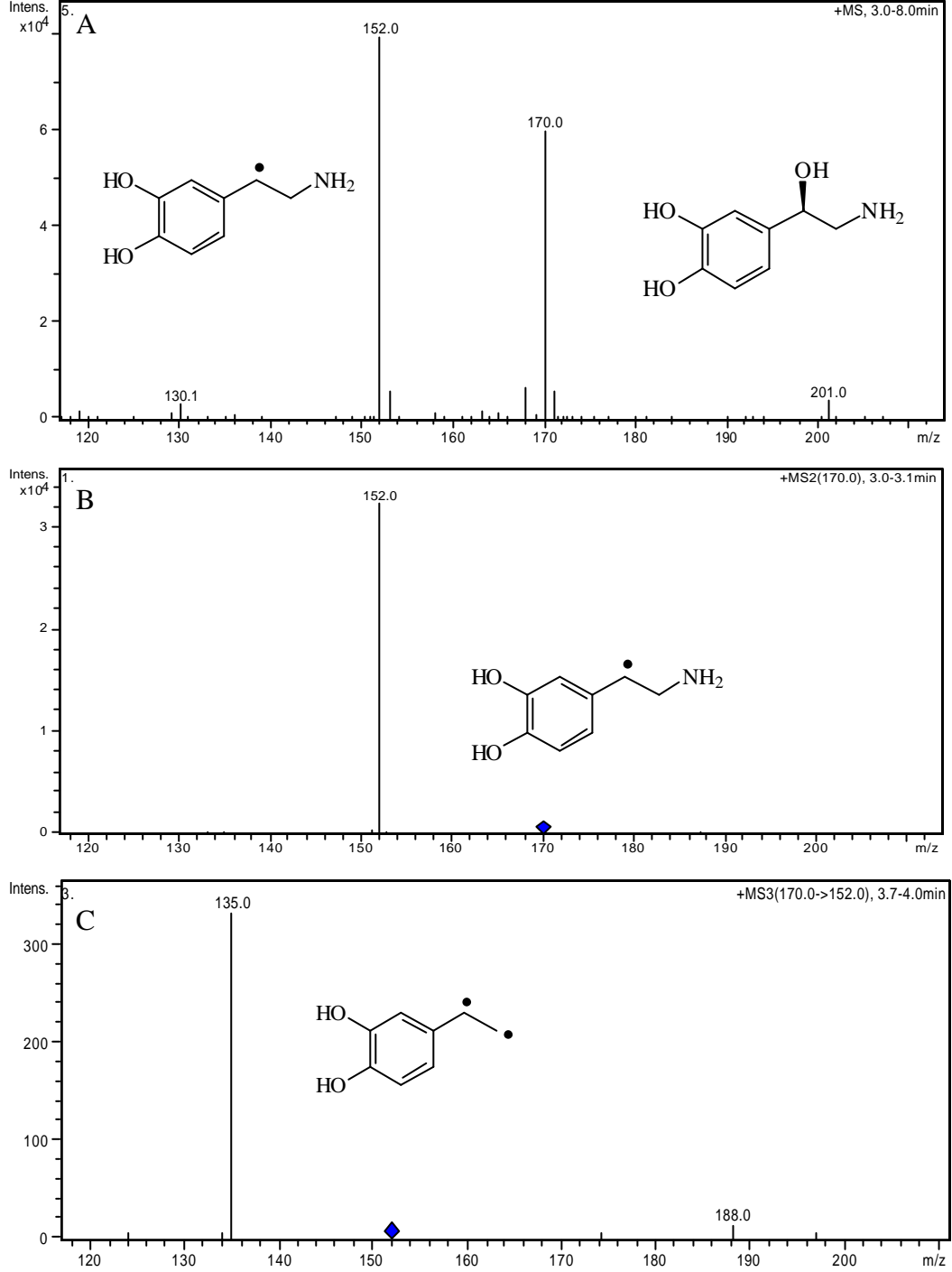


Epinefrin bileşiminin MS spektrumunda ESI esnasında oluşan ana kütle sinyali ile OH grubunun kopması ile oluşan parçasının sinyalinin oluşması, bileşenin kararlılığının düşük olduğunu göstermektedir (Şekil 15).



Şekil 15. Epinefrinin (A) MS 184 ve 166 m/z, (B) MS<sup>2</sup> 166 m/z ve (C) MS<sup>3</sup> 135 m/z Spektrumları

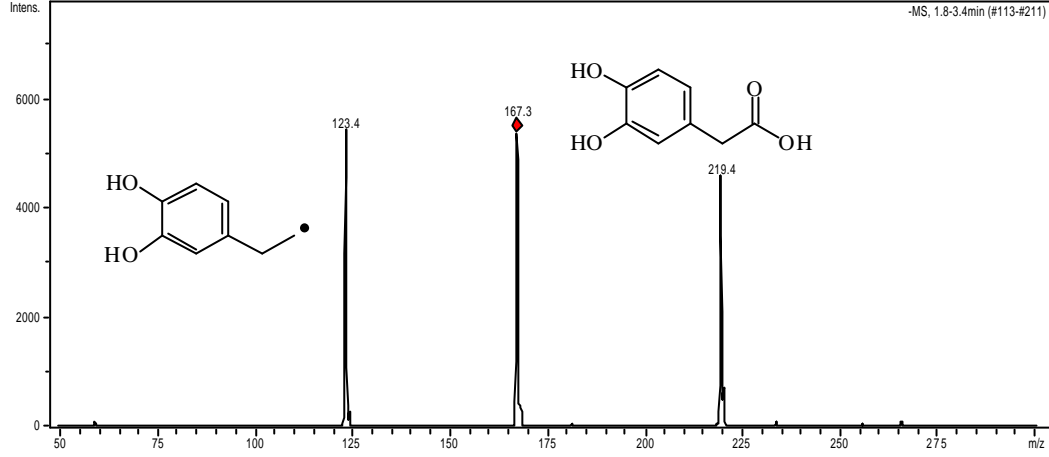
Norepinefrin bileşiminin MS spektrumunda (Sekil 16), ESI esnasında oluşan ana kütle sinyali ile OH grubunun kopması ile oluşan parçasının sinyalinin oluşması bileşenin kararlılığının düşük olduğunu göstermektedir.



Sekil 16. Norepinefrinin (A) MS, (B) MS<sup>2</sup> ve (C) MS<sup>3</sup> Spektrumları

DOPAC bileşeni incelenen diğer *nörotransmitter*'ler gibi artı polaritede iyonlaştırılmamıştır. Bunun nedeni bileşenin proton alabilecek primer amin grubu gibi bir grubunun olmamasıdır. **Sekil 17**'de görüldüğü gibi, DOPAC bileşeni karboksil grubundan bir  $H^+$  vererek eksi polaritede iyonlaştırılmıştır. Bu nedenle molekül kütlesi 168 olmasına rağmen kütle analizörüne bir  $H^+$  kaybederek girdiği için 167  $m/z$ 'lik sinyal vermektedir.

ESI esnasında karboksil grubunun kopmasıyla oluşan 123  $m/z$  parçalanma ürünü, bileşenin kararlılığının düşük olduğunu göstermektedir.



**Sekil 17. 3,4-Dihidroksifenilasetik Asidin Eksi İyonlaştırma ile Elde Edilmiş MS 167.3  $m/z$  Spektrumu ve 123.4  $m/z$  Parçalanma Ürünü**

MS parçalanmaları incelenen *nörotransmitter*'lerden elde edilen ana kütlelerin ve parçalanma ürünlerinin sinyalleri **Çizelge 4**'te verilmektedir.

**Çizelge 4. Bileşenlerin Kütle Parçalanmaları**

Bileşen	Mol. Kütlesi	MS ( $m/z$ )	MS <sup>2</sup> ( $m/z$ )	MS <sup>3</sup> ( $m/z$ )
Histamin	111	112	95.1	--
DOPAC <sup>1</sup>	168	167.3, 123.4	--	--
GABA	103	104.3	87.3	--
L-Glu	147	148.2	130.1	84.3
ACh	145	146	87.2	--
Dopamin	153	154, 137	137	119
Epinefrin	183	184, 166	166	135, 107
Norepinefrin	169	170, 152	152	135, 107

<sup>1</sup> ESI ile eksi iyonlaştırılmıştır

## **Nörotransmitterlerin Sivi Kromatografisi - Kütle Spektrometresi ile Ayırım ve Saptama Denemeleri**

*Nörotransmitterlerin* oldukça polar yapıda moleküller olmaları nedeniyle geleneksel ters faz sivi kromatografisi kolonları ile ayırımları gerçekleştirilememektedir. Geleneksel HPLC çalışmalarında polar bileşikler için uygulanan iyon çifti yönteminin MS sinyallerini örttüğü, bu nedenle beyindeki bazal derisimlerinin LC-MS ile analiz edilemediği de kaynaklarda belirtilmektedir (Törnkvist ve ark., 2004).

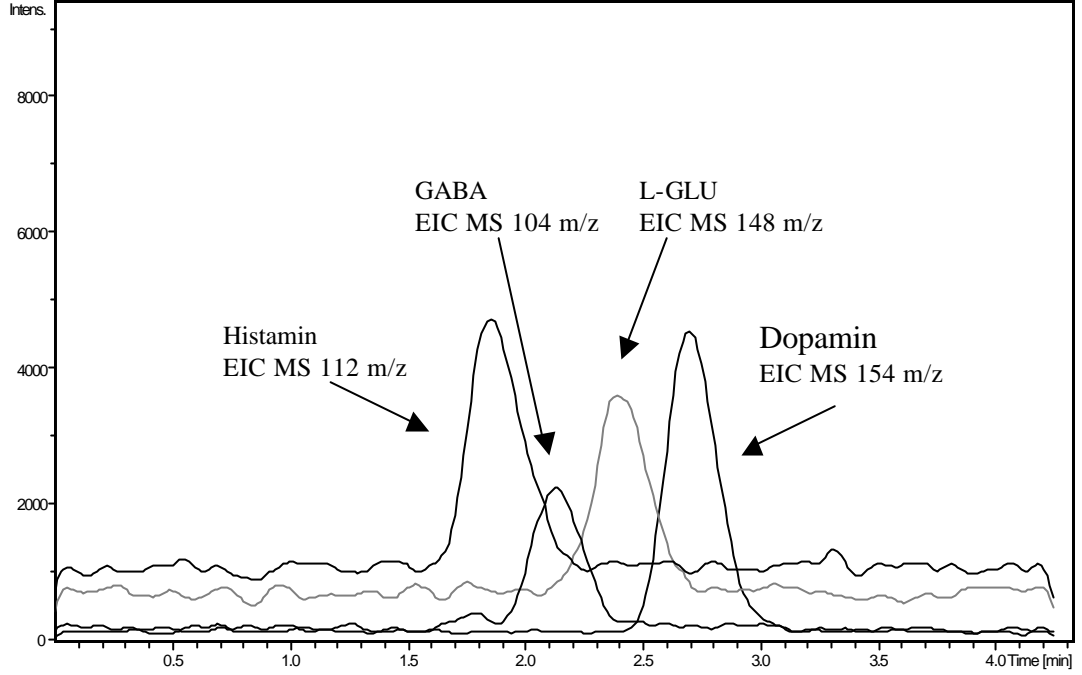
Bu nedenle çalışmanın başında, bazik pH'da hareketli faz içerisinde, amin grubu taşıyan bazik bileşenlerin, Handerson-Hasselbach esitliğine göre nonpolar özelliklerini arttırılarak ters faz kromatografi kolonunda alıkonmasının sağlanması ile ilgili denemeler yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, geniş pH aralıklarında kararlı Zorbax C18 Extend kolon (2.1x150 mm, 3.5 µm) kullanılmıştır. % 0.1 amonyak içeren su ve ACN hareketli fazları hazırlanmış ve gradient koşullardaki elüsyon ile bileşenlerin kütle sinyalleri elde edilmeye çalışılmış, fakat bileşenlerin sinyalleri kaydedilememiştir. Bu durumun bileşenlerin kolondan tutulmadan *solvent front*'la birlikte çıkması ya da bazik ortamda ESI ile iyonlaşmadıklarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Çalışmanın devamında, polar maddelerin ayrılması için iyon çifti kimyasallarını kullanmadan alıkoymak amacıyla geliştirilmiş olan yeni ters faz kolonları ile denemeler yapılmıştır. Zorbax C16 (2.1x100 mm) amit kolon ile % 0.1 asetik asit içeren ACN-saf su hareketli faz karışımları ve sadece % 0.1 asetik asit içeren sulu hareketli fazlar bu amaçla kullanılmış fakat ayırım sağlanamamıştır.

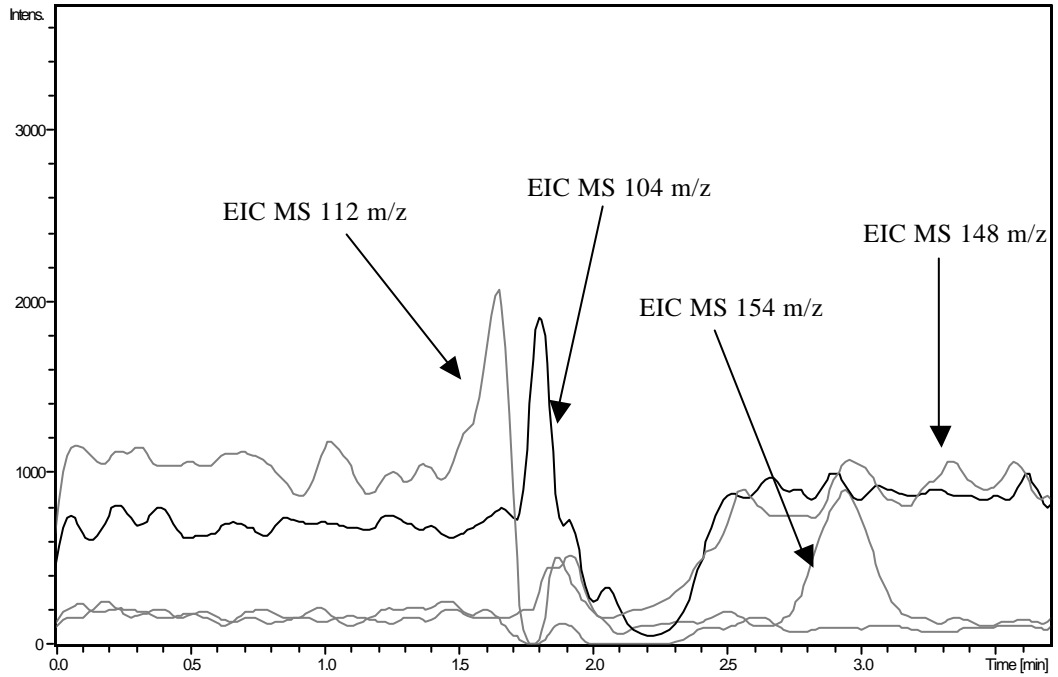
% 100 sulu hareketli fazlarda çalışabilen Zorbax C18 (2.1x100 mm) Aqua kolonu ile % 0.1 asetik asit-su hareketli fazında az da olsa dopamin, GABA, L-GLU ve histamin bileşenleri kütle analizörünün de yardımıyla birbirlerinden ayrılmıştır. Fakat mikrodializ örneklerinin vasatı olan Ringer çözeltisi ile standart çözeltiler hazırlandığında elde edilen sinyaller kaybolmuştur. Bunun nedeni olarak bileşenlerin *solvent front*'tan yeterince ayrılamadıkları için Ringer çözeltisinin içerdiği iyonlar tarafından ESI aşamasında baskılandıkları ve iyon analizörüne ulaşamadıkları düşünülmektedir.

**Sekil 18**'de bileşenlerin 500 ng.mL<sup>-1</sup> derisimde sulu ortamdaki karışım çözeltilerinin analizi gösterilmektedir. Görüldüğü üzere bileşenler kromatografik olarak birbirlerinden tam ayrılmamış olsalar da kütle analizörü yardımıyla bileşenlerin m/z'lerine göre ayrılması sağlanarak her bir bileşen için bir pik oluşturulmuştur. Dopamin için EIC MS 154 m/z, GABA için EIC MS 104 m/z, L-GLU için EIC MS 148 m/z, histamin için EIC MS 112 m/z sinyalleri kullanılmıştır.

**Sekil 19**'da aynı derisimlerde, Ringer çözeltisi ile hazırlanan standart karışımın analizinde, Ringer çözeltisi iyonlarının bileşenlerin kütle sinyallerini baskılaması gösterilmektedir.



**Sekil 18. Zorbax C18 (2.1 x 100mm) Aqua Kolonda Su İçerisinde Hazırlanmış 500 ng.mL<sup>-1</sup> Derisiminde Bileşenlerin Sinyalleri**



**Sekil 19. Zorbax C18 (2.1 x 100mm) Aqua Kolonda Ringer Çözeltisi İçerisinde Hazırlanmış 500 ng.mL<sup>-1</sup> Derisiminde Bileşenlerin Sinyalleri**

Öngörülen çalışmalarda sonuç alınamamış ve çalışmanın geri kalanında bileşenlerden uygun olanların türevlendirilerek apolar hale getirilmesine karar verilmiştir.

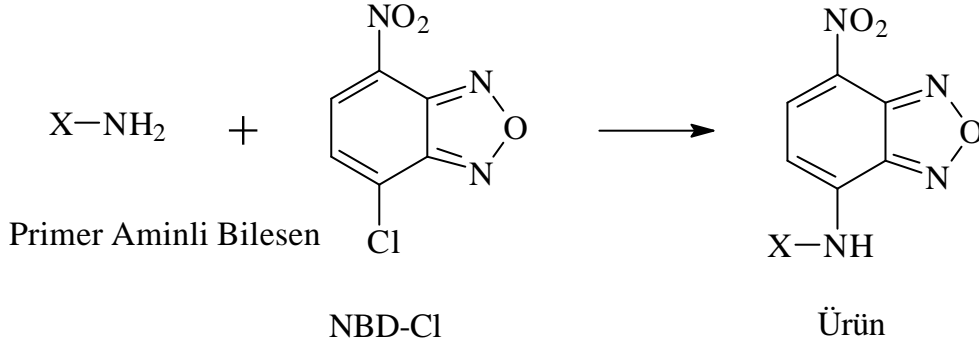
Song ve ark. (2005)'nin GABA'nin NBD-F ile türevlendirilmesi sonucu LC-MS ile yaptıkları çalışma temel alınarak incelenen *nörotransmitterler* arasından primer amin grubu taşıyan ve türevlenmeye uygun olanlar ile türevlendirme çalışmaları yapılmıştır.

### **Nörotransmitterlerin türevlendirilerek analizleri**

NBD-Cl primer amin grubu taşıyan bileşiklerle reaksiyona girerek oluşan ürüne floresan özellik kazandıran bir moleküldür. NBD-Cl ile türevlendirme genellikle bazik pH'larda 20 dk 65°C sıcaklıkta gerçekleşmektedir. Oluşan türevin ışığa karşı kararlılığının düşük olması nedeniyle türev işleminin karanlıkta gerçekleşmesi gerektiği ve türev sonrası oluşan türev bileşiminin de ışıktan korunması gerekliliği önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Song ve ark., 2005).

Tez çalışmasında türevlendirme işleminin uygulanmasındaki amaç, bileşiklere floresan özellik kazandırmak değildir. Türev işleminde temel amaç, C18 kolonda alıkonmayan polar bileşenlere apolar özellik kazandırarak kolon içerisinde alıkonmayı artırmaktır. Bununla birlikte, türevlenen molekülün büyüklüğünün ve MS sinyallerinin şiddetinin de arttığı rapor edilmektedir (Song ve ark., 2005).

NBD-Cl molekülünün primer amin grubu taşıyan bileşenler ile oluşturduğu türev **Sekil 20**'de gösterilmektedir. NBD-Cl bileşiminin bileşenlerdeki primer amin grubuna bağlanarak polar grubu kapattığı ve daha büyük bir molekül oluşturarak bileşenin apolar özelliğini arttırdığı görülmektedir.



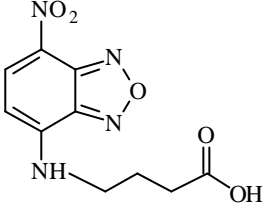
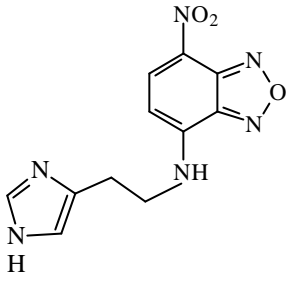
**Sekil 20. 4-Kloro-7-Nitro-2,1,3-Benzoksadiyazol Molekülü ve Primer Aminli Moleküller ile Reaksiyonu**

Türevlendirme işlemi, incelenen *nörotransmitter*'ler arasında primer amin grubu taşıyan L-GLU, GABA, histamin, dopamin ve norepinefrin bileşenlerine uygulanmıştır.

Daha sonra ayrıntılı olarak açıklanacak olan türev bileşenlerinin analizlerinden elde edilen sonuçlarda LC-MS ile histamin ve GABA için türev sinyalleri saptanabilmıştır.

**Çizelge 5**'te sinyalleri belirlenen GABA-NBD ve histaminin-NBD türev kütleleri ve türevlendirme işlemi sonucu oluşan ürünlerin açık kimyasal yapıları verilmektedir.

**Çizelge 5. ?-Amino Bütirik Asit ve Histaminin Türev Bileşenleri**

Olusan Türev	Türevin Formülü	Türevin Kütlesi
GABA-NBD		266
Histamin-NBD		274

***Türevlerin sıvı kromatografisi - kütle spektrometresi sinyallerinin belirlenmesi***

Seçilen *nörotransmitter*'ler arasında primer amin grubu taşıyan GABA, L-GLU, histamin, dopamin ve norepinefrin, NBD-Cl ile pH 9.0 borat tamponunda türevlendirilmiştir.

Yöntemler bölümünde belirtildiği gibi, LC-MS sinyallerinin ve oluşan türev kütlelerinin belirlenmesi çalışmalarında % 0.1 asetik asit içeren saf sudan oluşan A hareketli fazı ve % 0.1 asetik asit içeren ACN den ibaret B hareketli fazından oluşan ikili gradient hareketli faz sistemi kullanılmıştır.

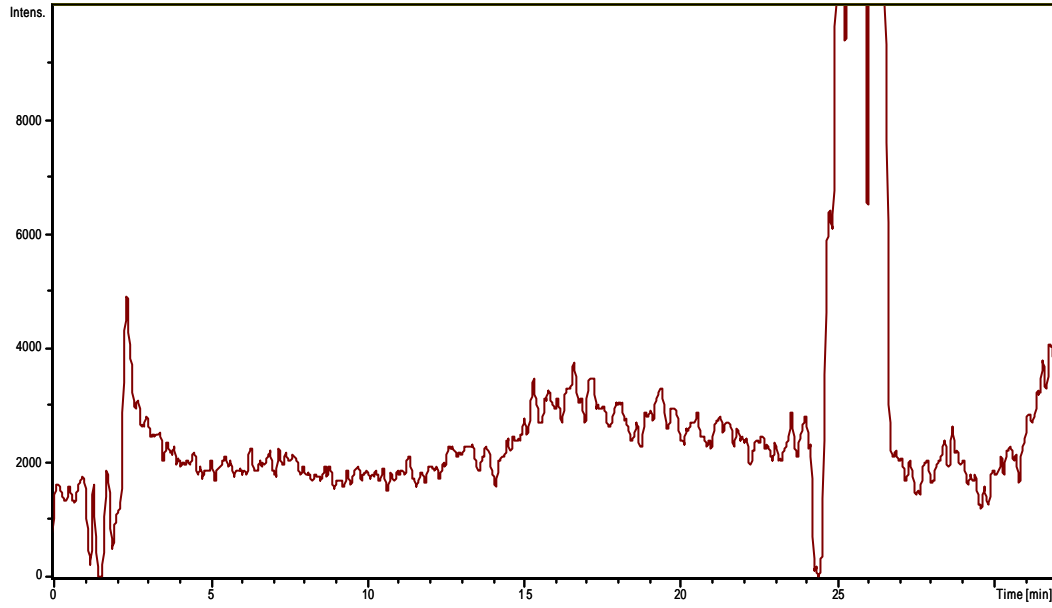
Gradient sistem 0-20 dk arası B hareketli fazı % 0'dan % 50'ye doğrusal olarak artırılmış, 20-25 dk arasında % 50 B hareketli fazı akitilmiş, 25-28 dk arasında B hareketli fazı % 0'a doğrusal olarak azaltılmış ve 28-35 dk arasında ise % 100 A hareketli fazı geçirilmiştir. Hareketli fazın akış hızı 0.2 mL.dk<sup>-1</sup> olarak uygulanmıştır. Geniş zamanlı bir gradient sistem oluşturulmasındaki amaç, türevlendirme sırasında türev ajanının oluşturduğu diğer bileşenler ile GABA ve Histamin türevlerinin girişim yapmasını engellemektir. Kolon olarak C18 (100x2.1 mm) Zorbax Aqua kolon kullanılmıştır. Örneklerin kolona enjeksiyonunda 10 µL hacim seçilmiştir. Bunun nedeni, 100x2.1 mm ebatlarında düşük iç hacimli kolon kullanıldığı için kolonun örnek ile asiri yüklenmesini önlemektir.

Türev bileşenlerinin sürekli akış yöntemi ile kütleleri ve parçalanma ürünleri belirlenmemiştir. Bunun nedeni, türev vasatı içerisinde türevlendirme işlemi sırasında oluşan diğer bileşenlerin, istenen bileşenin sinyalini baskılamaları olarak yorumlanmıştır. Bu yüzden oluşan türev bileşenlerinin kütle sinyalleri ve MS<sup>2</sup> parçalanmaları kromatografik ayırım aşamasında incelenmiştir.

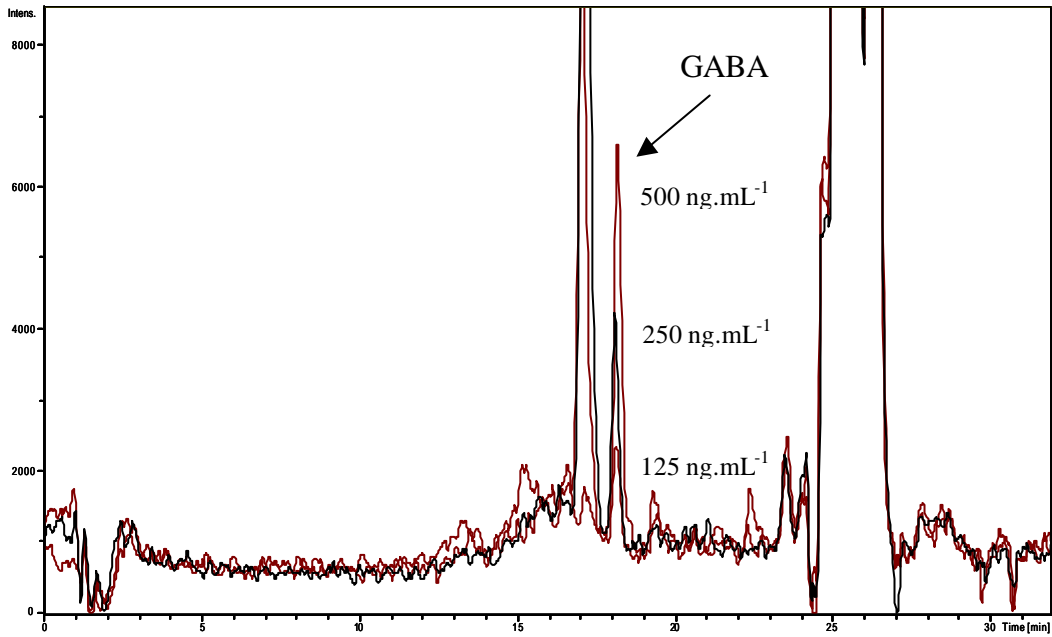
GABA ve histamin çözeltilerinin kromatogramlarında boş örneğe göre anlamlı bir farklılık görülmüştür. L-GLU, dopamin ve norepinefrinin kromatogramları boş

örneğin kromatogramından farklılaşmamıştır. Bunun nedeninin daha önce yapılan MS parçalanmaları çalışmalarından da tespit edildiği üzere bileşiklerin amin gruplarının kararlı olmaması ve türev işlemi sırasında kopması olduğu düşünülmektedir.

**Sekil 21**'deki kromatogramda Ringer çözeltisinin türevlendirilmesiyle hazırlanan (bos) örneğin kromatogramı sunulmaktadır. Kromatogramda herhangi bir baskın MS EIC 267 m/z sinyallerinden oluşan bir pik görülmektedir. **Sekil 22**'de ise 125, 250, 500 ng.mL<sup>-1</sup> derisimlerde hazırlanmış üç adet türevlenmiş GABA örneği için MS EIC 267 m/z sinyallerinde artan yükseklik ve alanlarda pikler görülmektedir.



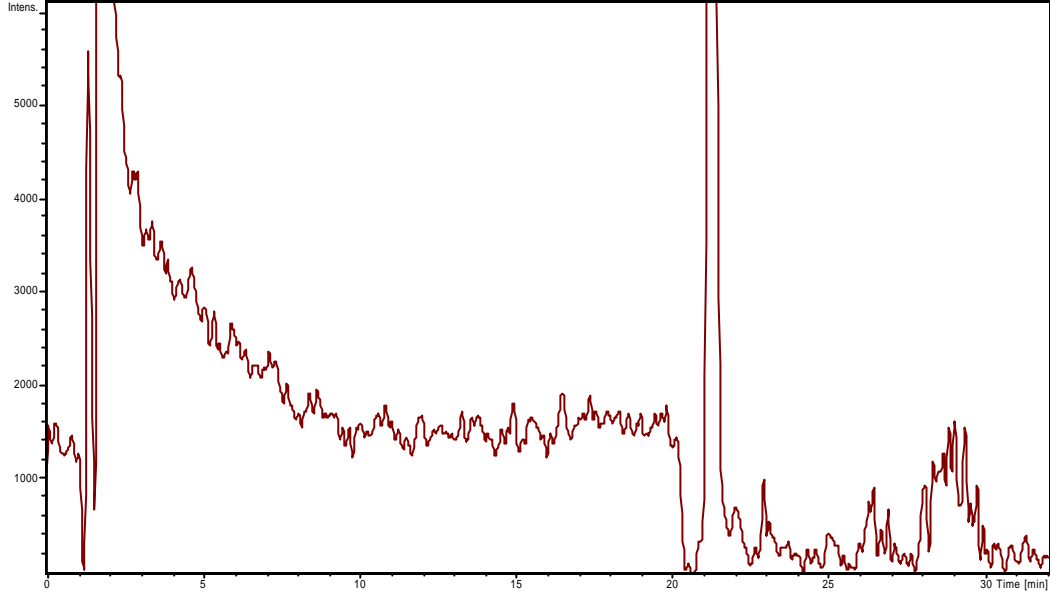
**Sekil 21. Türev İşlemi Uygulanmış Ringer Çözeltisinin 267 m/z Ana Kütle Kromatogramı**



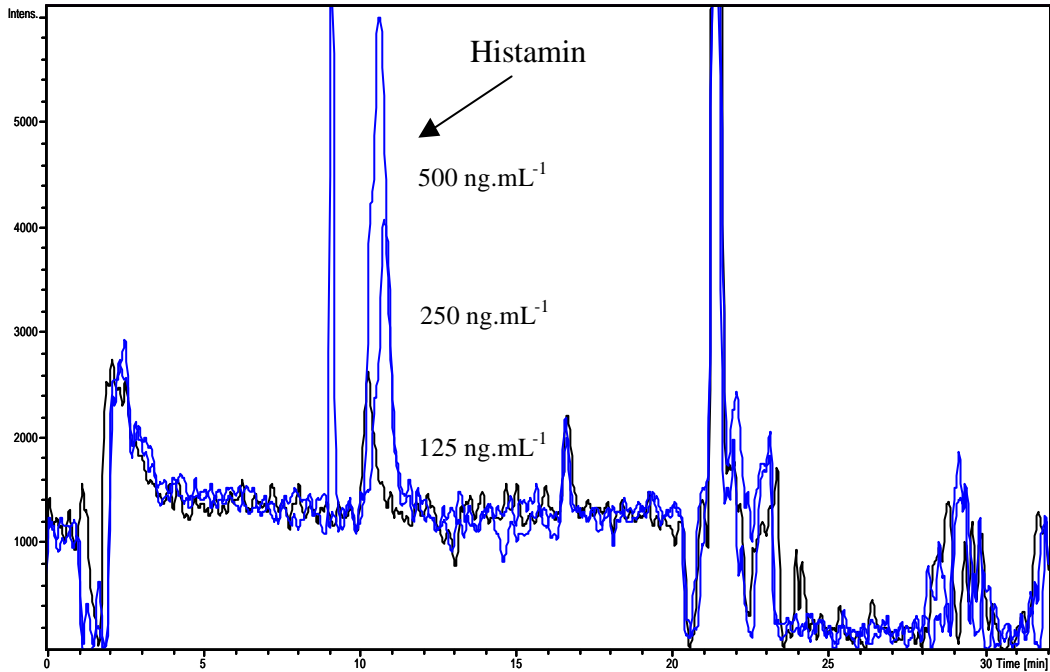
**Sekil 22. ?-Amino Bütirik Asitin Artan Derisimlerde 267 m/z Ana Kütle Kromatogramı**



**Sekil 23**'te kromatogramda Ringer çözeltisinin türevlendirilmesiyle hazırlanan (bos) örneğin kromatogramı sunulmaktadır. Kromatogramda herhangi bir baskın MS EIC 275 m/z sinyallerinden oluşan bir pik görülmektedir. **Sekil 24**'de ise 125, 250, 500 ng.mL<sup>-1</sup> derisimlerde hazırlanmış üç adet türevlenmiş histamin örneğinin MS EIC 275 m/z sinyallerinde artan yükseklik ve alanlarda pikler görülmektedir.



**Sekil 23. Türev İşlemi Uygulanmış Ringer Çözeltisinin 275 m/z Ana Kütle Kromatogramı**



**Sekil 24. Histaminin Artan Derisimlerde 275 m/z Ana Kütle Kromatogramı**

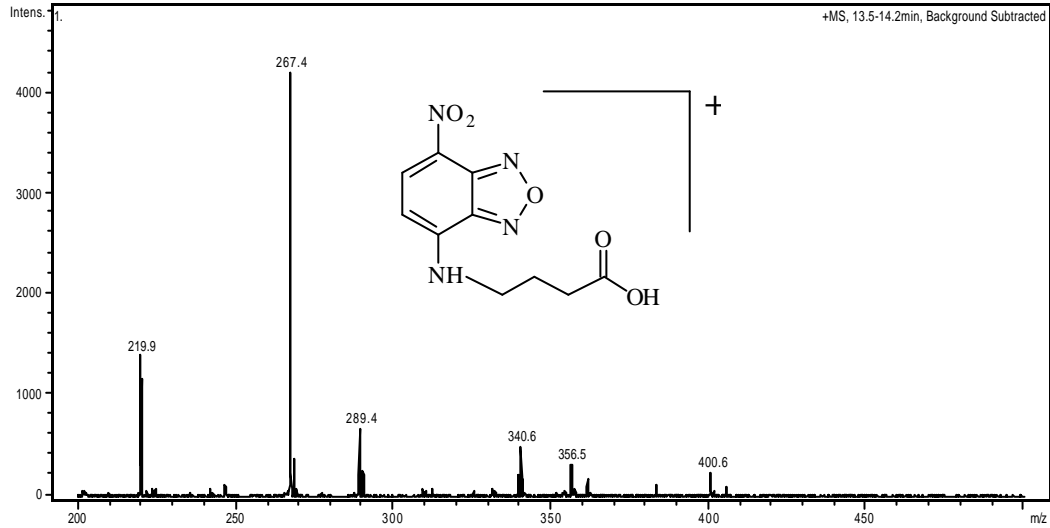
Bos çözeltilerin hazırlanmasında, GABA ve histaminin stok çözeltilerinden ilgili seyreltmelerin yapılmasında kullanılan Ringer çözeltisi kullanılmıştır. Bunun nedeni, analizi hedeflenen mikrodializ örneklerinin Ringer çözeltisi ile toplanacak olması ve analizin bu matriksten etkilenmediğinin gösterilmesidir.

LC-MS türev sinyalleri farklılaşan *nörotransmitter*'lerin, GABA ve histaminin, kolonda alıkonma zamanları, GABA için 17-18 dk, histamin için ise 11-12 dk olarak belirlenmiştir.

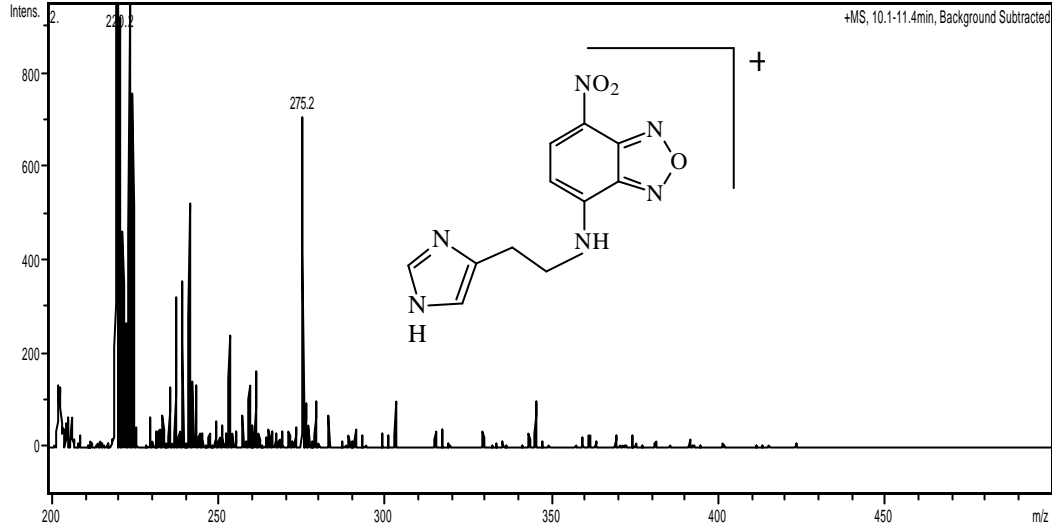
Belirlenen alıkonma zamanları kullanılarak, türevlenmiş GABA ve histamin bileşenlerinin MS ve MS<sup>2</sup> spektrumları elde edilmiştir.

Türev bileşenlerinin MS ve MS<sup>2</sup> spektrumları çalışmanın başında *nörotransmitter* parçalanmaları için yapılan incelemelerdeki gibi sürekli akis yöntemiyle denenmiş, fakat istenen sinyaller elde edilememiştir. Bunun nedeni türev ortamında kullanılan 100 mM borat ve 10 mM NBD-Cl bileşenlerinin türev bileşenlerinin sinyallerini baskılaması olarak yorumlanmıştır. Kromatografik olarak türev vasatında bulunan diğer bileşenlerden ayrılan GABA-NBD ve histamin-NBD türevleri kendilerine ait alıkonma zamanında ESI odacığına saf olarak girmişlerdir. Bu koşullarda ESI odacığında bileşenlerin iyonlaşmasını baskılayacak herhangi bir iyon kaynağı olmadığından artı iyonlaşarak, sürekli akis yönteminin aksine iyon tuzacı kütle analizörüne ulaşabilmişlerdir.

Alıkonma zamanları esas alınarak GABA ve histamin için elde edilen MS spektrumları ve iyonlaşan türev molekülleri **Sekil 25** ve **26**'da gösterilmektedir.



**Sekil 25. 4-amino bütirik asitin Kütle Spektrumu 267.4 m/z Ana Sinyali**



**Sekil 26. Histaminin Kütle Spektrumu 275.2 m/z Ana Sinyali**

Türevlendirme işlemi ile GABA ve histamin türevleri için başarılı sonuçlar elde edildiğine ve oluşan türevlerin LC-MS sinyallerinin saptanabildiğine karar verilmiştir.

#### *Türev ortamının pH'sinin taranması*

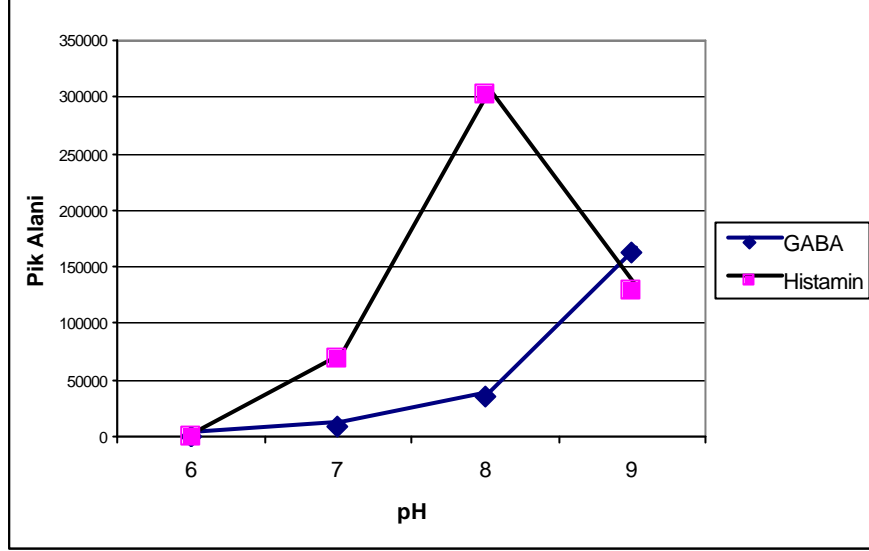
Daha önce belirtildiği gibi, NBD-Cl ile yapılan türevlendirme işleminde, türev ortamının pH'si ile türev oluşumu reaksiyonu değişebilir. Bu nedenle çalışmanın bu bölümünde, ortam pH'sinin oluşan türev sinyaline etkisi incelenerek türevlendirilecek bileşenlerin oluşumu için en uygun pH'nin belirlenmesi amaçlanmıştır.

100 mM derisiminde pH'ları 6, 7, 8, 9 olacak şekilde ayarlanmış tampon çözeltiler ile GABA-NBD ve histamin-NBD türevleri oluşturulmuştur. Oluşturulan türevler belirlenen kromatografik ve MS koşullarında analiz edilmiştir. Analiz sonuçları değerlendirilirken, GABA için MS EIC 267 m/z, histamin için MS EIC 275 m/z sinyallerinden elde edilen piklerin alanları kullanılmıştır. Ortamın pH'ına göre pik alan değişimleri **Sekil 27**'de gösterilmektedir.

**Sekil 27**'de sunulan grafikte pH 6'da GABA ve histamin bileşenlerinin NBD-Cl ile türevlenmediği görülmektedir. Histamin bileşeninin pH 8 fosfat tamponu ile yapılan türevlendirme işleminde en büyük türev sinyalini ürettiği, pH 9 borat tamponunun kullanıldığı türevlendirme ortamında türev sinyalinin azaldığı görülmektedir. Zhang ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada histaminin NBD-Cl ile türevlendirilmesinde pH 7-8'in daha uygun olduğunu belirtmektedir. **Sekil 27**'den elde edilen bilgiler bu bilgi ile uyumlu bulunmuştur.

GABA bileşeninin türev sinyali ise pH 9 borat tamponu ile tamponlanmış türev ortamında en büyük olduğu görülmektedir. Song ve ark. (2005)'nin yaptığı çalışma sonuçları bu bilgiyi doğrulamaktadır.

Çalışmanın geri kalanında GABA ve histamin türevlerinin ortak olarak en fazla LC-MS sinyalinin verdikleri 100 mM, pH 9 borat tamponunun kullanılmasına karar verilmiştir.



Sekil 27. Türev Ortamının pH'sinin Olusan Türev Bilesenlerin Pik Alanlarına Etkisi

### *Kromatogramları oluşturmak için uygun sinyallerin seçimi*

LC-MS ile yapılan miktar tayinlerinde, diğer nicel analitik kimya yöntemlerinde olduğu gibi, derisim ile analizi hedeflenen bileşenden elde edilen iyonların sinyalleri arasında bir ilişki kurulmaktadır. LC-MS çalışmalarında bileşenlerin ana kütle iyonları ya da parçalama işlemleriyle oluşturulan parça iyonları arasından seçim/seçimler yapılabilir. Yapılan bu seçimler elde edilen sinyalleri etkilemektedir. Dolayısıyla bu seçimler sonucunda aynı analize ait farklı kromatogramlar oluşturulabilir. Bu kromatogramlar arasından hedeflenen miktar tayinine en uygun olanının belirlenmesi gerekmektedir.

LC-MS analizlerinde kullanılan kütle analizörleri miktar tayini amacıyla seçilecek kromatogramlarda belirleyici olmaktadır.

Dört çubuklu ya da TOF kütle analizörleri iyonlaşan bileşenleri parçalama özelliklerinin olmamasından dolayı sadece ana kütle MS sinyalleri ya da iyonlaştırma odacığında oluşan bileşen parçaları ile kromatogram oluşturabilmektedirler.

Tandem ve iyon tuzagi kütle analizörleri istenen ana kütleleri diğer kütlelerden ayırıp parçalayabilmekte dolayısıyla diğer analizörlere göre daha fazla kromatogram seçeneği sunmaktadırlar.

LC-MS çalışmalarında analiz yönteminin hassasiyeti, LOQ değeri, bileşenlerin iyonlaşabilme özelliğine ve elde edilen sinyalin ne kadar seçici olduğuna bağlıdır. Düşük derisimlerdeki bileşenlerin analizinde ana kütle sinyallerinin kullanılması göreceli olarak çok seçici olmamaktadır. Analiz ortamında aynı kütle sinyalini farklı bileşenlerde verebilmektedir. Dolayısıyla kromatogramın gürültüsü

artmakta ve analizi hedeflenen bileşenin sinyali, gürültüyle karışabilmektedir. Bu durumda analizin hassasiyeti azalmakta ve LOQ derisimi yükselmektedir.

LC-MS analizlerinde ne kadar bileşene özgü sinyaller seçilirse yöntemin hassasiyeti o denli artmaktadır. Bileşene özgü daha seçici sinyallerle kromatogramlar oluşturmak *baseline* gürültüsünü azaltmakta ve LOQ derisimini düşürmektedir.

Genel olarak ana kütle sinyal siddetleri parçalanma ürünlerinin sinyal siddetlerinden daha büyüktür. Fakat kararlı parçalanma ürünleri kullanıldığında bileşenin sinyali azalsa da *baseline* gürültüsü yaklaşık 10 kat daha fazla azalmaktadır. Dolayısıyla bileşen sinyalinin azalmasına karşın S/N değeri artmakta ve bu da analiz hassasiyetini arttırmaktadır.

Bu açıklamalar doğrultusunda, bileşenlerin ana kütlelerinden elde edilen kararlı parçalanma sinyalleri, ana kütle sinyallerinden daha seçici olmaktadır (Hoffman ve Stroobant, 2001b).

Çalışmada kullanılan iyon tuzagi kütle analizörü ana kütle sinyalleri ya da parçalanma sinyalleri arasından uygun olan/olanlar arasında seçim yapma olanagi tanımaktadır.

Bu nedenlerden dolayı, çalışmanın bu aşamasında MS ana kütle sinyalleri belirlenmiş GABA ve histamin türevlerinin MS<sup>2</sup> parçalanmaları incelenecektir. Miktar tayinine geçilmeden önce incelenen sinyallerden en uygun olanları belirlenecektir. Uygun sinyaller belirlendikten sonra tüm analizlerde kromatogramlar seçilen kütle sinyalleri ile oluşturulacaktır.

#### *Türev bileşenlerinin kütle parçalanmalarının belirlenmesi*

GABA ve histaminin türev bileşenlerinin MS<sup>2</sup> parçalanması SRM çalışmalarıyla belirlenmiştir. Çalışmanın bu bölümünde 500 ng.mL<sup>-1</sup> derisimde GABA ve histamin karışım çözeltileri, NBD-Cl ile türevlendirilerek LC-MS analizleri gerçekleştirilmiştir. SRM çalışmasında bileşenlerin alikonma zamanları kullanılarak analiz içerisinde dört bölüm oluşturulmuştur.

Birinci bölüm olan 0-8 dk aralığında, kolondan çıkan sinyaller ile ilgilenilmediğinden bu süre boyunca kolondan gelen elüsyon ESI odacığına gönderilmemiştir. Bu işlemle ESI odacığının gereksiz kirlenmesi engellenmiştir.

İkinci bölüm olan 8-16 dk aralığı, histaminin kolondan çıktığı bölümü kapsamaktadır. Histaminin alikonma zamanı 10.5 dk olarak gözlenmiştir. Bu bölümde iyonların ESI odacığından kütle analizörüne kadar uçurulduğu cam kilcal ve iyon optikleri bölümlerine uygulanan tüm elektriksel parametreler 275 m/z'ye göre cihazın yazılımı tarafından ayarlanmıştır. Ayrıca ikinci bölümde SRM ana kütlesi olarak 275 m/z belirlenmiş ve 4 m/z'lik kütle piki genişliğinde bir kütle aralığı MS<sup>2</sup>'ye tabi tutulmuştur. 275 m/z kütlelerini parçalamak için 1.1 V parçalama enerjisi kullanılmıştır.

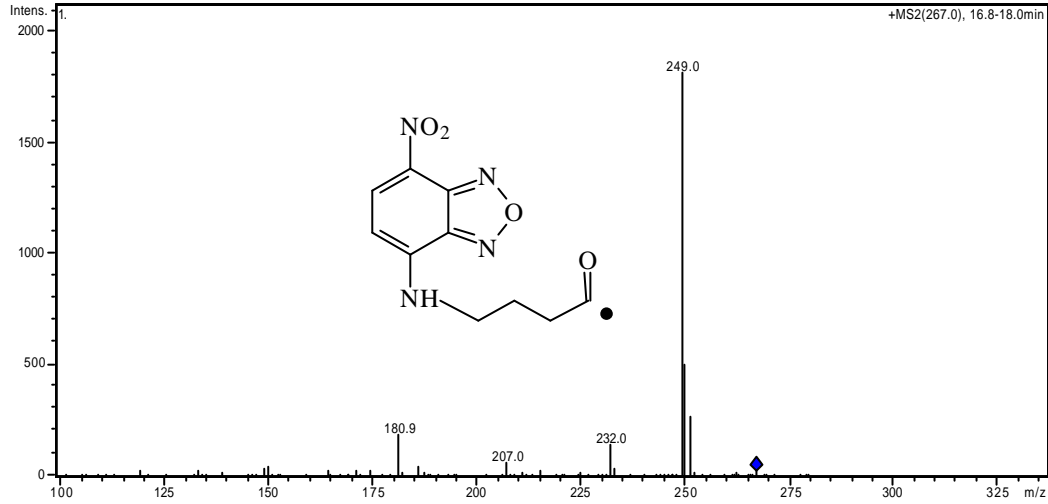
Kromatogramın üçüncü bölümü GABA'nın kolondan çıktığı bölüm olan 16-21 dk aralığını kapsamaktadır. GABA'nın alikonma zamanı 17.5 dk olarak elde edilmiştir. Bu bölümde iyonların ESI odacığından kütle analizörüne kadar uçurulduğu cam kilcal ve iyon optikleri bölümlerine uygulanan tüm elektriksel parametreler 267 m/z'ye göre cihazın yazılımı tarafından ayarlanmıştır. Üçüncü

bölümde SRM ana kütlesi olarak 267 m/z belirlenmiş ve 4 m/z'lik kütle piki genişliğinde bir kütle aralığı MS<sup>2</sup>'ye tabi tutulmuştur. 267 m/z kütlelerini parçalamak için 1.0 V parçalama enerjisi kullanılmıştır.

Dördüncü bölüm ise 21-35 dk arasındadır. Bu bölümde ilgilenilen sinyal olmadığından ESI odacığını kirletmemek için kolondan gelen elüsyon ESI odacığına gönderilmemiştir.

GABA türev bileşeninin MS<sup>2</sup> parçalanması için uygulanan 1.0 V parçalama enerjisi kararlı bir MS<sup>2</sup> kütle oluşturmuştur. Fakat histamin için uygulanan 1.0 V parçalama enerjisi ile kararlı bir MS<sup>2</sup> ve yüksek detektör sinyaline sahip parçalanma kütle oluşturulamamıştır. Histamin türevinin ana kütlelerinden (275 m/z) kararlı ve yüksek detektör sinyaline sahip MS<sup>2</sup> parçalanma kütle koparabilmek için parçalama enerjisi artırılmıştır. Uygulanan 1.1 V parçalama enerjisi ile kararlı fakat düşük detektör sinyaline sahip MS<sup>2</sup> parçalanma ürünleri elde edilebilmiştir.

GABA türev bileşiği için elde edilen MS<sup>2</sup> spektrumu **Sekil 28**'de sunulmaktadır.



**Sekil 28.** ?-Amino Bütirik Asit Türev Bilesinin Kütle Spektrumu 249 m/z Parçalanma Ürünü

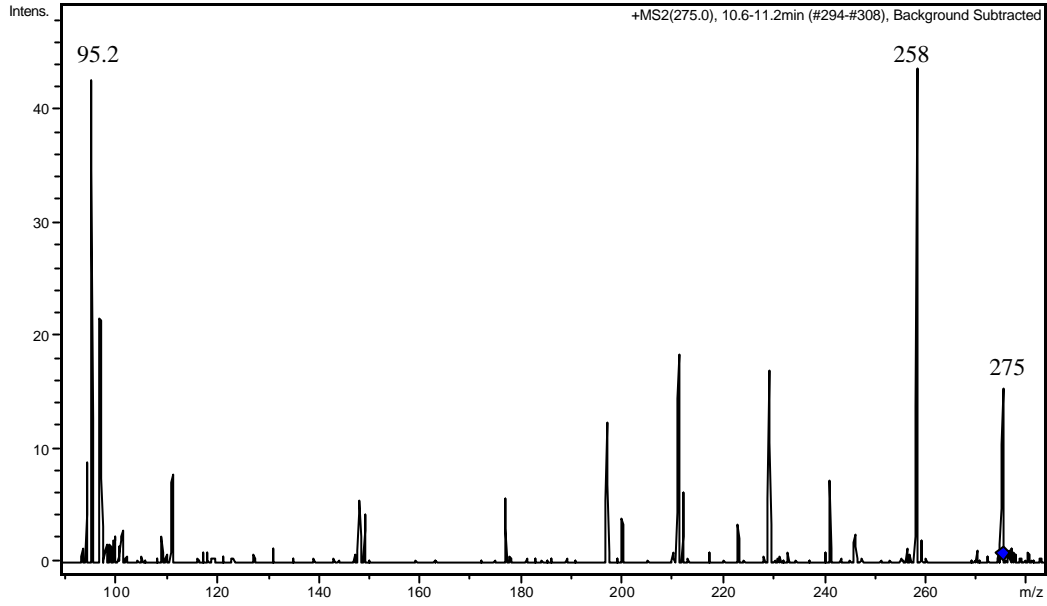
**Sekil 28**'de GABA türev bileşeninin 267 m/z MS kütlelerinden, 1.0 V parçalama enerjisi uygulandıktan sonra bir su molekülü koparılarak ve 267 - 18 = 249 m/z'lik MS<sup>2</sup> kütle sinyalinin elde edildiği görülmektedir. Elde edilen 249 m/z kütlelerinin kararlı ve yüksek detektör sinyali verdiği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada GABA türevinden elde edilen 249 m/z MS<sup>2</sup> parçalanması Song ve ark. (2005)'nin yaptığı çalışmada da belirtilmektedir.

Çalışmanın geri kalanında GABA türev bileşiği için 267 m/z'lik kütlelerinin parçalanmasıyla oluşturulan 249 m/z sinyali kullanılarak oluşturulan kromatogram değerlendirilmiştir.

267 m/z kütlelerinin izolasyonu, parçalanması ve 249 m/z MS<sup>2</sup> kütle sinyalinin görüntülenmesi sadece GABA'nın kolonu terk ettiği 16-22 dk aralığında gerçekleştirilmiştir.

Histamin türevi için elde edilen MS<sup>2</sup> spektrumu **Sekil 29**'da sunulmaktadır.



**Sekil 29. Histamin Türev Bilesiginin Kütle Spektrumu 95.2, 258 m/z Parçalanma Ürünleri ve Parçalanmayan 275 m/z'lik Ana Kütle Sinyali**

**Sekil 29**'daki histamin türev bilesiginin MS<sup>2</sup> kütle spektrumunda 95.2 m/z ve 258 m/z'lik parçalanma ürünlerinin detektör sinyallerinin düşük olduğu görülmektedir. Bu nedenle histamin için 275 m/z ana kütle sinyalinin kullanılmasına karar verilmiştir.

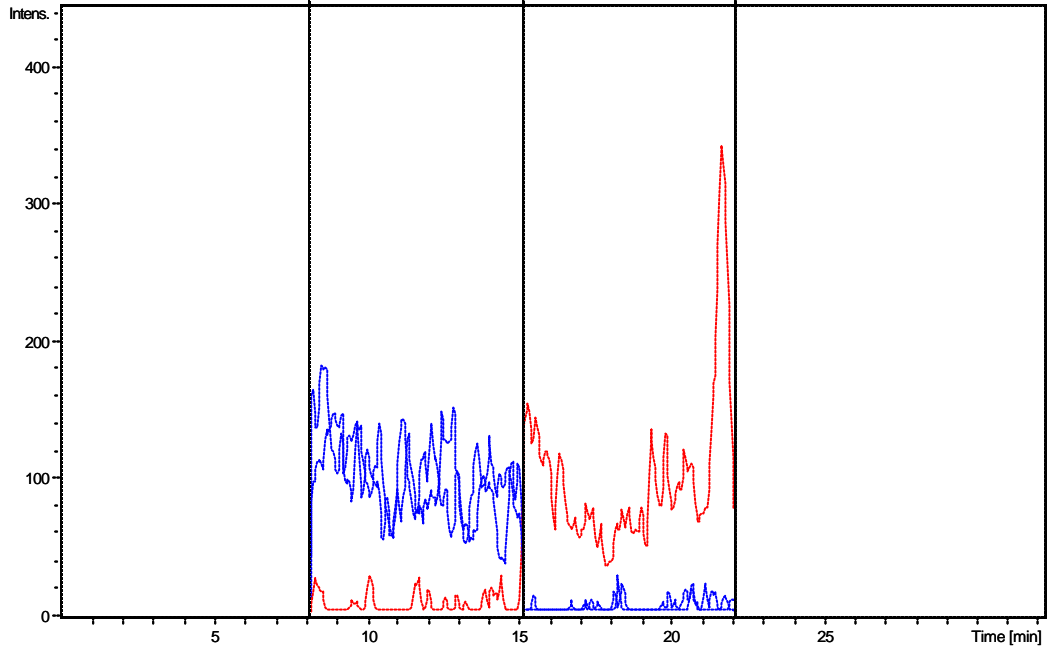
Çalışmanın geri kalanında histamin türevinin analizi için histaminin kolonu terk ettiği zaman aralığında MS<sup>2</sup> parçalanması uygulanmamıştır. Histaminin türev bilesiginin nitel analizi için 275 m/z MS sinyalleri kullanılarak 8-16 dk arasında oluşturulan kromatogram kullanılmıştır.

**Sekil 30** ve **Sekil 31**'de görülen dikey kesikli çizgiler analiz suresince uygulanan farklı MS parametrelerinin bölümlerini ifade etmektedir.

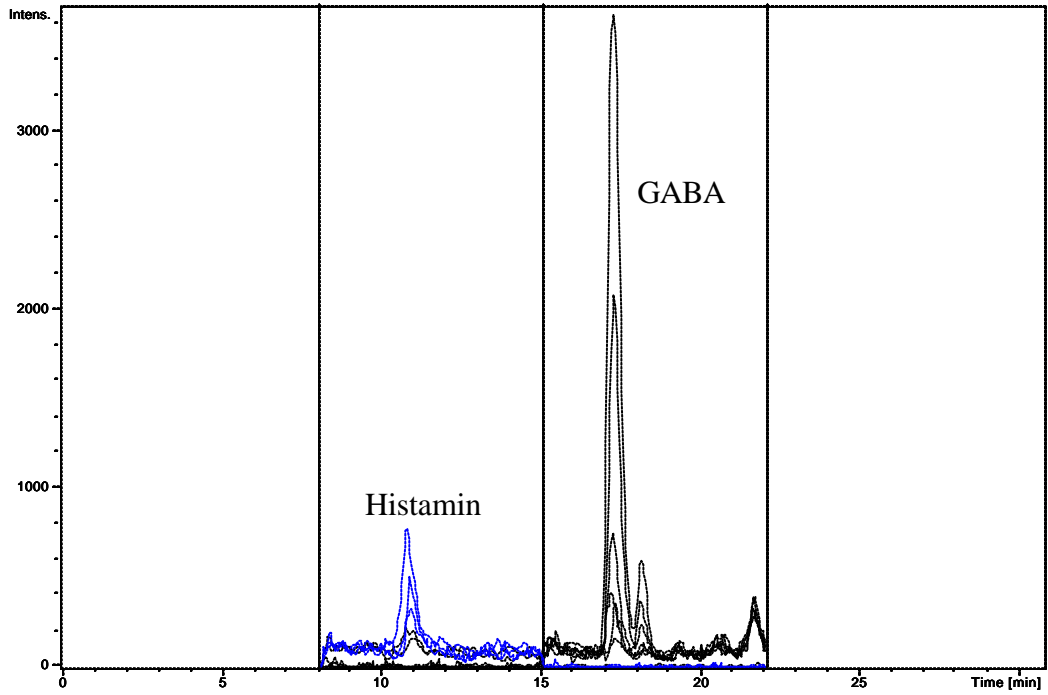
**Sekil 30**'da Ringer çözeltisinin türevlendirilmesiyle oluşan boş örneğin belirlenen sinyallerle oluşturulmuş kromatogramı sunulmaktadır.

**Sekil 31**'de GABA ve histamin türevlerinin artan derisimlerde belirlenen sinyallerde görüntülenen kromatogramı sunulmaktadır.

Oluşturulan kromatografik ve MS koşullarında GABA ve histaminin türev bileşenleri ile matrisin herhangi bir girişim yapmadığı **Sekil 30** ve **Sekil 31**'deki kromatogramlarda görülmektedir.



**Sekil 30. Kantitatif Analiz İçin Belirlenen Sinyaller ile Bos Ringer Kromatogrami**



**Sekil 31. Artan Derisimlerde Histamin ve ?-amino bütirik asit Türev Çözeltilerinin Kromatogrami**

**Sekil 31'**de histaminin kararlı ve yüksek detektör sinyalli parçalanma kütleli olmadığı için, histamin sinyalinin GABA sinyalleri ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu görülmektedir.



## ***Sivi kromatografisi-kütle spektrometrisi yönteminin validasyonu***

### ***Seçicilik***

**Sekil 30** ve **31**'de sunulan bos Ringer çözeltisi ve artan derisimde GABA ve histamin türevlerinin kromatogramlari, yöntemin GABA ve histamin türevleri için seçici olduğunu ve matriksten kaynaklanan bir girişim olmadığını göstermektedir.

### ***Dogrusallik***

Analiz yönteminin dogrusalliginin incelenmesinde GABA ve histaminin türev bileşenleri için derisime karsi, belirtilen sinyallerle oluşturulan kromatogramlardaki pik alanlari kullanilmistir.

GABA ve histamin yaklasik 5-1000 ng.mL<sup>-1</sup>'lik derisimlerde karisim halindeki çözeltileri hazirlanarak türevlendirilmistir. Oluşturulan türevler bekletilmeden belirtilen kromatografik kosullarda analiz edilmistir.

Analiz sonuçlari regresyon analizi ile incelendiginde GABA için 10-500 ng.mL<sup>-1</sup> derisim araliginin, histamin için ise 50-1000 ng.mL<sup>-1</sup> derisim araliginin dogrusal olduğu saptanmistir.

Yöntemin, GABA türevleri için, histamin türevlerinden 5 kat duyarli olmasının nedeni GABA pikinin degerlendirildiği kromatogramin MS<sup>2</sup> 249 m/z sinyali kullanilarak oluşturulmasıdır. Böylelikle *baseline* gürültüsü azaltılmış ve GABA için S/N oranı arttırılmıştır.

Histamin türevinden, yüksek detektör sinyali veren MS<sup>2</sup> parçalanma ürünü elde edilememesi nedeniyle göreceli olarak daha az duyarli olan EIC MS 275 m/z pik alanı kullanilmistir.

Bu nedenle dogrusallik çalışmasında yöntemin GABA için daha duyarli olduğu görülmüştür.

Dogrusallik çalışmalari için belirlenen dogrusal aralıkta GABA için 6 farklı derisimde, histamin için ise 5 farklı derisimdeki çözeltiler üç set halinde hazirlanmistir. Seyreltmeler yaklasik 1 mg.mL<sup>-1</sup>'lik GABA ve histaminin ana stok çözeltisinden Ringer çözeltisi ile yapılmistir. Her gün taze hazirlanan bu çözelti setleri gün içinde bekletilmeden analiz edilmistir.

Gün içinde yapılan analiz verileriyle gün içi dogrusallik istatistikleri hesaplanmistir. Günler arasi istatistik parametrelerinin hesaplanmasında gün içi deneylerde elde edilen veriler harmanlanarak kullanilmistir.

Bahsedilen istatistik işlemleri GraphPAD istatistiksel analiz yazilimi kullanilarak yapılmistir.

Dogrusallik çalışmasının istatistiksel sonuçlari **Çizelge 6**'da sunulmaktadır.

**Çizelge 6. Yöntemin Doğrusallık Parametreleri**

	GABA				Histamin			
	1. Gün (n=6)	2. Gün (n=6)	3. Gün (n=6)	Günler Arası (n=18)	1. Gün (n=5)	2. Gün (n=5)	3. Gün (n=5)	Günler Arası (n=15)
Eğim	154.4	158.5	179.2	164.0	14.57	13.93	13.82	14.58
Kesim	-1987	137.5	-1124	-991.4	1692	2913	3191	2230
r	0.9987	0.9987	0.9993	0.9946	0.9960	0.9974	0.9921	0.9905
SH Eğim	3.84	3.96	3.23	4.29	0.65	0.54	1.24	0.56
SH Kesim	949.0	977.1	797.4	1058.0	337.4	332.1	707.6	289.4
Eğimin ± %95 GA	10.70	10.95	8.95	9.10	1.805	1.86	2.96	1.18
Doğrusallık Derisimleri (ng.mL <sup>-1</sup> )	10.6, 26.5, 53.0, 106.0, 265.0, 530.0				55.25, 110.50, 276.25, 552.50, 1105.00			

**Çizelge 6**'da GABA ve histamin kalibrasyon doğrularının korelasyon katsayılarının geleneksel HPLC çalışmalarındakilere göre düşük olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin iyon tuzagi kütle analizöründen ve türev işlemleri esnasında türev bileşenlerinin derisimlerine yansıyan etkilerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Song ve ark. (2005), GABA'yi türevlendirerek yaptıkları çalışmada daha iyi korelasyon katsayılı doğrusal esitlikler elde ettiklerini belirtmektedir. Bunun nedeni, belirtilen çalışmada GABA'nin döteryum izotopunun (GABA-d<sub>2</sub>) IS olarak kullanılmış olmasıdır.

**Çizelge 6**da gün içi ve günler arası doğrusal esitliklerin eğimlerinin SH'sinin hem GABA hem de histamin için % 2'den fazla olmadığı görülmektedir.

**Çizelge 6**da sunulan doğrusallık ve doğrusallığın gün içi, günler arası tekrar edilebilirliği istatistikleri, GABA ve histamin türevlerinin belirlenen derisimlerde pik alanları ile derisim korelasyonlarının kararlı olduğunu göstermektedir.

#### *Tayin sınırı*

Gelistirilen analitik yöntemlerin ne kadar düşük derisimlerde ölçüm yapabildiği yöntemlerin LOQ değerleriyle ifade edilmektedir.

Çalışmada geleneksel LOQ belirleme işlemlerinden farklı olarak düşük derisimli çözeltilerin kalibrasyon doğrusu değerlerinden % 20 RSD sapma sınırı kullanılarak LOQ belirlenmiştir (Zhu ve ark., 2005).

GABA ve histamin yaklaşık 5-1000 ng.mL<sup>-1</sup> derisimlerde karışımları hazırlanmış ve türevlendirilmiştir. Türev çözeltilerinin analizleri sonucunda GABA türevi için en düşük derisimdeki çözeltilenin (10 ng.mL<sup>-1</sup>) sinyali kalibrasyon doğrusundan

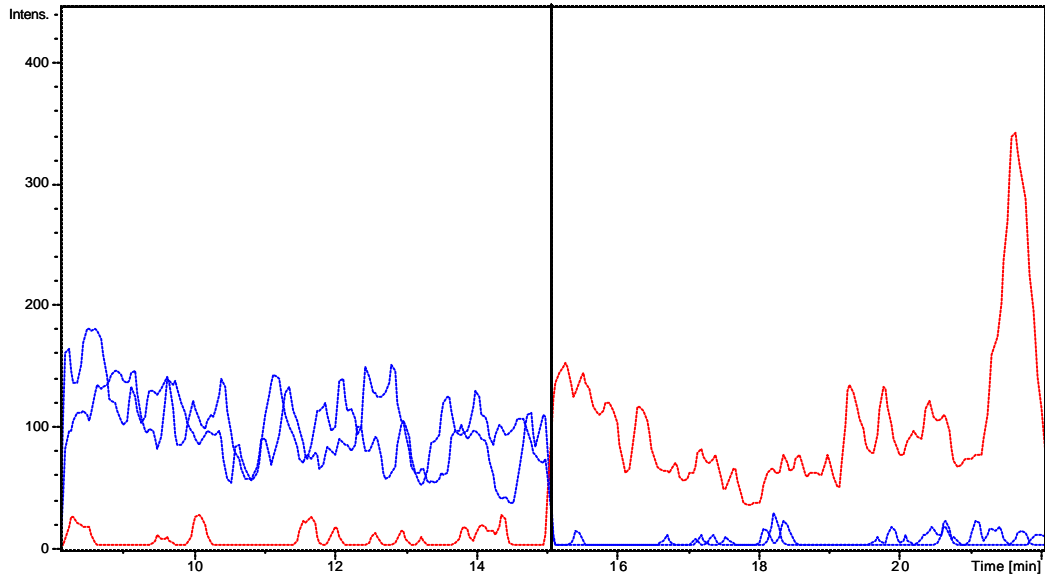
% 20 RSD'den az sapmıştır. Histamin için ise bu değer 50 ng.mL<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.

Taranan literatürlerde GABA için geliştirilen en duyarlı LC-MS yönteminin Song ve ark. (2005) tarafından yapıldığı ve bu yöntemin LOQ'sunun 5 ng.mL<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir. Song ve ark. (2005), yöntemlerinde duyarlılığı arttırmak için kilcal kolon LC kullanmışlar ve ön kolon örnek deristirme işlemi uygulamışlardır. Bu yöntemler uygulanmadığı için bizim çalışmamızda 5 ng.mL<sup>-1</sup> LOQ değerine inilememiştir. Fakat bizim çalışmamızda yer alan mikrodiyaliz tekniği ile herhangi bir ön deristirme yöntemi uygulamadan, geliştirilen analiz duyarlılığına uygun GABA derisiminde örnekler toplanabilmıştır.

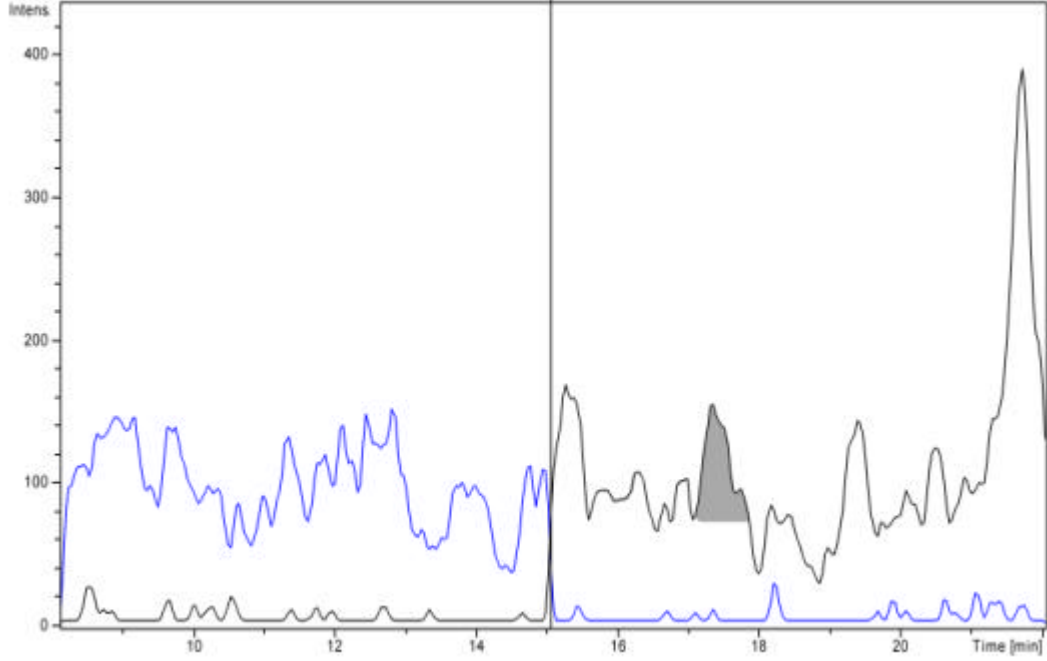
Gelistirilen yöntemin histamin için 50 ng.mL<sup>-1</sup> LOQ değeri, taranan kaynaklara göre oldukça yüksek bir değerdir. Bu nedenle histaminin az olduğu beyin bölgelerinden toplanan mikrodiyaliz örnekleri için analiz yönteminin duyarlılığı uygun değildir.

Histaminin NBD-Cl ile türevlendirilmesi sonucu oluşan bileşige SRM işleminin uygulanamaması nedeniyle türev bileşenin MS saptamaları için uygun olmadığı anlaşılmaktadır. Histamin analizi için Yoshitake ve ark. (2003), florometrik detektörlü HPLC çalışmasında yöntemin histamin türevine duyarlılığının fmol düzeylerinde olduğu belirtilmektedir. Bizim çalışmamızdan da anlaşılabileceği üzere MS yöntemleri histamin analizlerinde florometrik yöntemlerin duyarlılığına inememektedir.

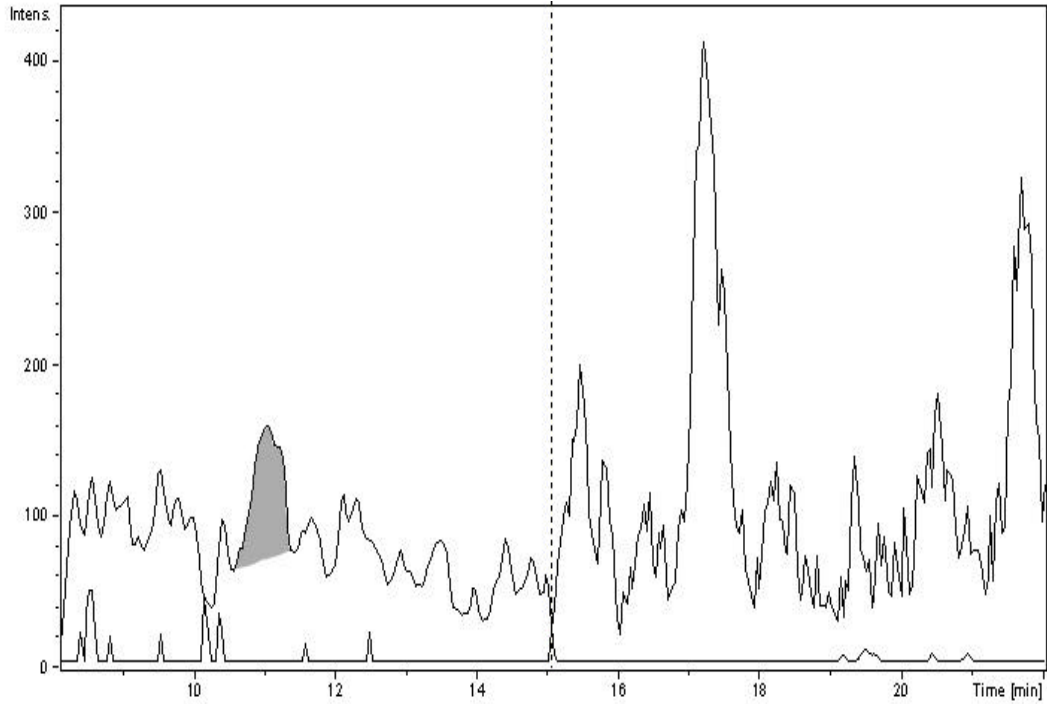
**Sekil 32**, bos Ringer çözeltisinin kromatogramında, histamin ve GABA türevlerinin sinyallerinin tespit edildiği alikonma zamanlarındaki, analiz gürültüsünü göstermektedir. **Sekil 33** ve **Sekil 34**'de sırasıyla GABA ve histaminin analiz yöntemindeki LOQ derisimlerinin kromatogramları sunulmuştur. Belirlenen LOQ derisimlerindeki sinyallerin, bos kromatogramdaki gürültü sinyallerinin üzerinde olduğu kromatogramlarda gösterilmektedir.



**Sekil 32. Bos Ringer Çözeltisinin Kromatogramı**



**Sekil 33. 10 ng.mL<sup>-1</sup> Derisimde ?-amino bütirik asit Çözeltilisinin Kromatogrami**



**Sekil 34. 50 ng.mL<sup>-1</sup> Derisimde Histamin Çözeltilisinin Kromatogrami**

**Sekil 33** ve **34**'te gri boyanmış pikler, GABA'nin 10 ng.mL<sup>-1</sup> LOQ sinyalini ve histaminin 50 ng.mL<sup>-1</sup> LOQ sinyalini göstermektedir.

*Kesinlik ve doğruluk*

Sunulan LC-MS yöntemi için kesinlik ve doğruluk incelemesi yaklaşık 50, 100 ve 250 ng.mL<sup>-1</sup> derisimlerde GABA ve histaminin karışım çözeltileri kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin her derisiminden 3'er set hazırlanmış ve her çözeltiden 5'er analiz gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan türev çözeltileri hazırlanmışları günde analiz edilmiştir.

İstatistiksel değerlendirme çözeltilerin gün içinde ve günler arasında birbirlerinden sapmaları ile hesaplanması yerine gerçek derisimden sapmaları dikkate alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 7**'de sunulmaktadır.

**Çizelge 7. Yöntemin Kesinlik ve Doğruluk Parametreleri**

	Gerçek Derisim (ng.mL <sup>-1</sup> )	Gün İçi Degerler (n=5)			Günler Arası (n=15)		
		Ölçülen Derisim	% BH	%BSS	Ölçülen Derisim	% BH	%BSS
GABA	53	54.8	1.70	2.40	55.2	2.07	2.94
	106	102.9	1.46	2.07	101.5	2.12	3.00
	265	258.8	1.16	1.65	260.4	0.87	1.23
Histamin	55.25	56.3	1.86	2.62	59.1	3.48	4.93
	110.5	113.1	1.63	2.30	115.8	2.40	3.39
	276.25	282.4	1.11	1.57	286.7	1.89	2.67

Analiz sinyallerinin gün içi gerçek degere karşı hesaplanan sapmalarının % 2 düzeyinde, günler arası sapmalarının da % 5 düzeyinde olduğu **Çizelge 7**'de görülmektedir. Bu değerler LC-MS çalışmalarının kesinlik ve doğruluğu için kabul edilebilir sınırlar içerisinde (Zhu ve ark., 2005).

Sunulan çalışmadaki doğruluk, kesinlik ve kesinlik değerleri IS kullanımıyla daha da iyileştirilebilir. Fakat LC-MS çalışmalarında IS olarak analizi hedeflenen bileşenlerin izotopları kullanılmaktadır ve bu izotop bileşenlerinin temin etmekteki zorluklar nedeniyle GABA ve histamin izotopları kullanılamamıştır. Geleneksel HPLC çalışmalarında kullanılan IS'lerin kullanılması bir anlam ifade etmediğinden IS kullanımı tercih edilmemiştir.

### Örneklerin Toplanması

Mikrodializ ile örneklerin toplanacağı bölgeler, GABA ve histamin ölçümlerinin önem arz ettiği *ventral anterior nucleus*, *lateral hypothalamus* ve *corpus striatum* olarak tespit edilmiştir. Her bir bölgeden örnek toplamak için ayrı bir denek sıçan kullanılmıştır

İlgili bölgelerin Paxinos ve Watson (1996), sıçan beyni stereotaksik atlası kullanılarak koordinatları bulunmuş ve *in vivo* işlemler sırasında her bir bölge için koordinat hesapları yapılmıştır.

*In vivo* işlemler sırasında atlastan elde edilen koordinatlar yardımıyla yapılan koordinat hesapları **Çizelge 8**'de verilmektedir.

**Çizelge 8. In Vivo Sıçan Deneylerinde Prob Koordinatlarının Hesapları**

n=3	<i>ventral hypothalamik nucleus</i>			<i>lateral hypothalamus</i>			<i>corpus striatum</i>		
	(mm)	DSK	AK	HK	DSK	AK	HK	DSK	AK
<i>Lambda</i>	38.8	+7.2	46.0	42.8	+7.2	50.0	40.2	+10.6	50.8
<i>Bregma</i>	47.2	-1.8	45.4	51.1	-1.8	49.3	47.7	+1.6	49.3
BLOK			45.7			49.6			50.0
Yansal	39.0	-2.0	37.0	38.5	-2.0	36.5	37.9	-2.6	35.3
Derinlik	46.4	-6.7	39.7	43.3	-8.6	34.7	42.5	-5.2	37.3

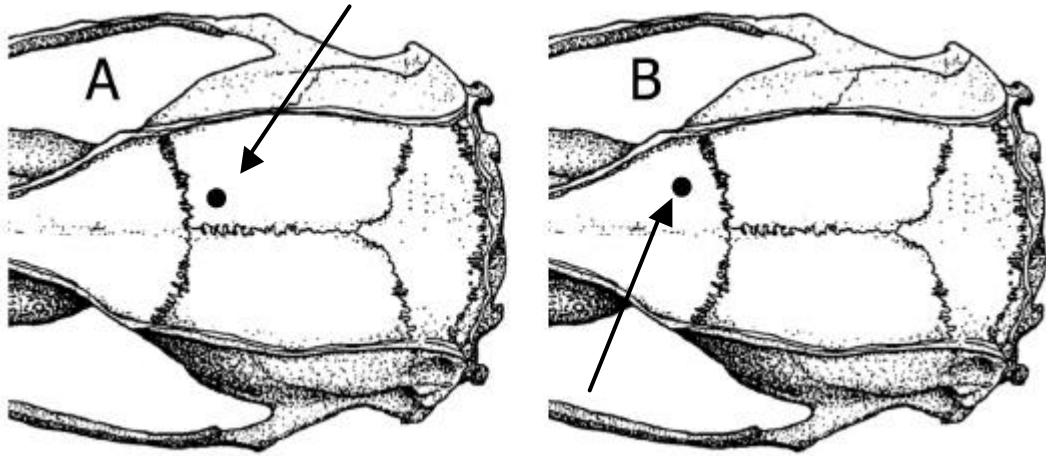
DSK: Deneklerden ölçülen stereotaksik koordinatlar

AK: Atlardan elde edilen koordinatlar

HK: Hesaplanan koordinatlar

BLOK: ilgili bölgenin *bregma* ve *lambda*'ya uzaklığının ortalaması

İlgili bölgelerin kafatası üzerinden **Çizelge 8**'deki hesaplamalar kullanılarak belirlenen noktalar **Sekil 35**'de gösterilmektedir.



**Sekil 35. (A) Probun *Ventral Anterior Nucleus* ve *Lateral Hypothalamus*'a Yerleştirilmesi İçin Kafatasına Açılan Deligin Konumu (B) Probun *Corpus Striatum*'a Yerleştirilmesi İçin Açılan Deligin Konumu**

### **Kullanılan Mikrodializ Probunda Geri Kazanım**

**Çizelge 9**'da yapılan analizler sonucu hesaplanan, probda geri kazanım değerleri gösterilmektedir.

**Çizelge 9. Prob Geri Kazanımı**

GABA			Histamin		
PD ng.mL <sup>-1</sup>	DD (n=2)	% PGK	PD ng.mL <sup>-1</sup>	DD (n=2)	% PGK
53	20.97	39.57	55.25	NA	NA
106	31.44	29.66	110.5	NA	NA
265	79.70	30.07	276.25	83.40	30.19
Ortalama % PGK ± SH		33.1 ± 3.24	Ortalama % PGK ± SH		30.19 ± 0.98

PD: probun örnek topladığı standart çözelti derisimi

DD: toplanan diyalizatlarda ölçülen derisim

PGK: probun geri kazanım değeri

NA: Gözlenemeyen değer

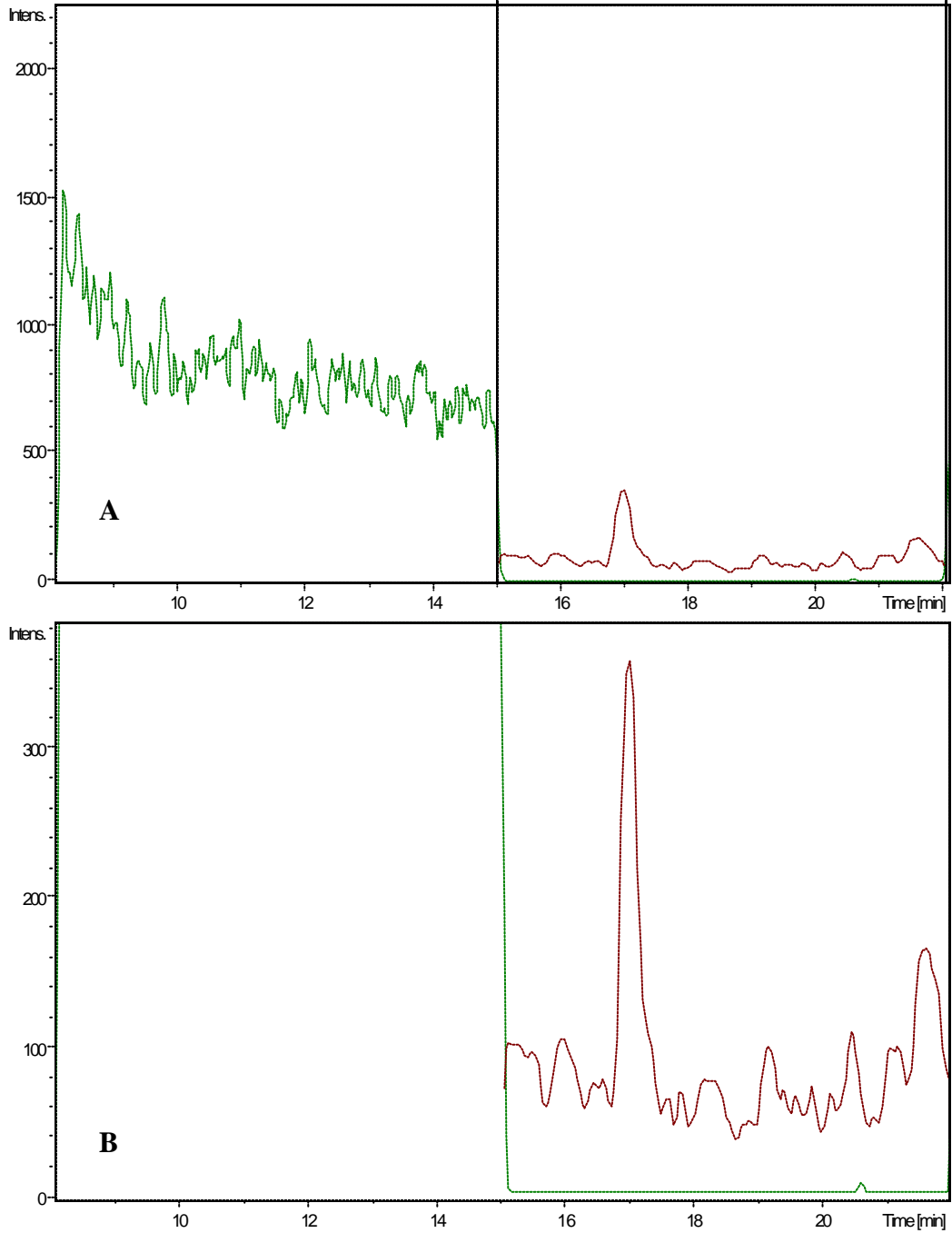
Geri kazanım çalışmasında, kaynaklarda belirtilen histamin ve GABA'nın beyin dokusundaki derisimlerine yakın derisimlerde çözeltiler kullanılmıştır. Histamin için 55.25 ng.mL<sup>-1</sup> ve 110.5 ng.mL<sup>-1</sup> derisimlerdeki çözeltilerden geri kazanım değerleri hesaplanamamıştır. Toplanan diyalizatlardaki histamin derisimlerinin 50 ng.mL<sup>-1</sup> LOQ değerinden düşük olması nedeniyle, geri kazanım değerlerinin hesaplanamadığı düşünülmektedir.

Bulunan probdan geri kazanım değerleri kullanılarak diyalizat örneklerinde analiz edilen bileşenlerin, beyin dokusundaki gerçek derisimleri hesaplanmıştır.

### **Örneklerin Analizi**

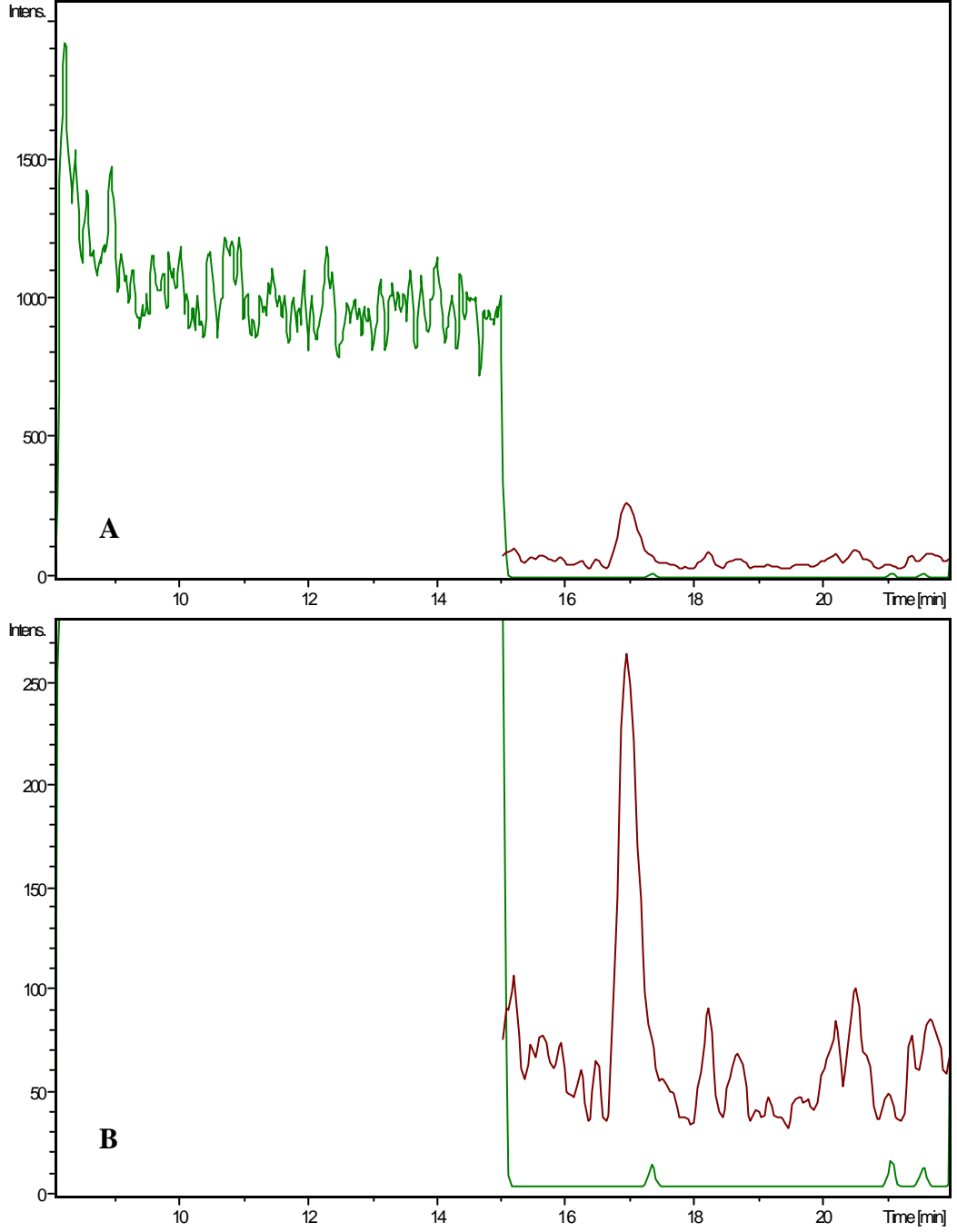
Örnekler her bir bölge için birer siçan kullanılarak toplanmıştır. Türev işlemleri yapıldıktan sonra belirtilen koşullarda analiz edilmişlerdir. *Ventral anterior nucleus, corpus striatum* ve *lateral hypothalamus*'tan toplanan örneklerin kromatogramları **Sekil 36- 38**'de gösterilmektedir.

Örneklerin kromatogramlarında GABA sinyali net bir şekilde görülmektedir. Histamin bileşiminin sinyali toplanan örneklerin analizi sonucunda gözlenmemiştir. Bu da örneklerin toplandığı bölgelerdeki histamin derisiminin sunulan analiz yönteminin duyarlılığının çok altında olduğunu göstermektedir.

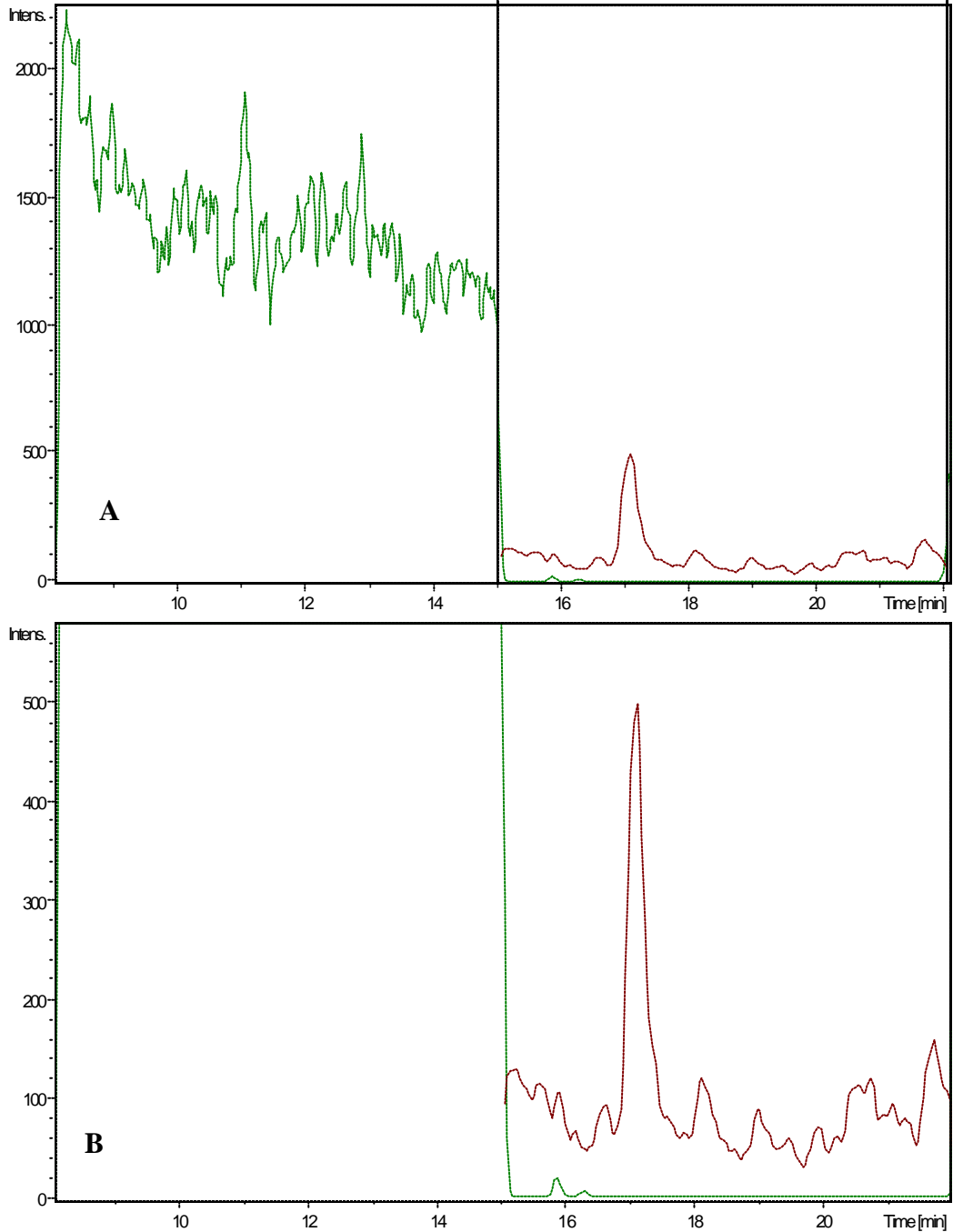


**Sekil 36. (A) *Ventral Anterior Nucleus*'tan Toplanan Diyalizatin Kromatogrami (B)  $\gamma$ -Amino Bütirik Asit Sinyalinin Büyütülmüş Görüntüsü**





**Sekil 37. (A) *Corpus striatum*'dan Toplanan Diyalizatin Kromatogrami (B)  $\gamma$ -Amino Bütirik Asit Sinyalinin Büyütülmüş Görüntüsü**



**Sekil 38. (A) *Lateral hypothalamus*'tan Toplanan Diyalizatin Kromatogrami (B)  $\alpha$ -Amino Bütirik Asit Sinyalinin Büyütülmüş Görüntüsü**

Toplanan örneklerden hesaplanan GABA derisimleri, örneklerin toplandığı beyin bölgelerine göre **Çizelge 10**'da verilmektedir.

**Çizelge 10. Bölgelere Göre ?-Amino Bütirik Asit Derisimi**

n=2	<i>ventral anterior nucleus</i>	<i>lateral hypothalamus</i>	<i>corpus striatum</i>
Örnekte ölçülen derisim (ng.mL <sup>-1</sup> ) ± SH	40.80 ± 0.22	50.12 ± 6.13	31.43 ± 0.17
Düzeltilmiş derisim (ng.mL <sup>-1</sup> ) ± SH	123.25± 0.67	151.41± 18.53	94.96± 0.53



## SONUÇ ve ÖNERİLER

Biyolojik örneklerde yapılan *nörotransmitter* analizlerinde maddelerin ayrılması, tespisi ve tayini için duyarlı ve güvenilir bir yöntem olarak LC-MS essiz bir yöntemdir. Mikrodiyaliz tekniği ise biyolojik ortamda yapılan örneklemelelerde uzun ve yorucu ekstraksiyon işlemleri gerektirmeyen, seçici ve spesifik bir şekilde elde edilmiş numunelerin doğrudan analizine olanak sağlayan mükemmel bir tekniktir. *Nörotransmitter*lerin tayini için ülkemizde bu iki tekniğin ilk defa birlikte kullanılması ile analizinin gösterildiği bir yöntem geliştirilmiştir.

Bu çalışma ile sunulan LC-MS yöntemi, kaynaklarda rastlanan LC-MS yöntemlerden farklı olarak nörotransmitterlerden oluşturulan iyonların tespisi ve tayini için iyon tuzagi kütle analizörü kullanılması ile yöntem açısından, diğer taraftan siçan beyinde *lateral hypothalamus*, *ventral anterior nucleus* ve *corpus striatum*'daki mikrodiyaliz örnekleme ile elde edilen GABA ve düzeyleri hakkında ilk bilgileri sağlaması bakımından orjinallik taşımaktadır.

Bu çalışmanın başlangıcında mikrodiyaliz örneklerinde sekiz adet *nörotransmitter*'in LC-MS (iyon tuzagi) yöntemi ile ayrılması, tespisi ve tayini hedeflenmiş olmasına karşın, önceki bölümde söz edilen analitik koşullar nedeniyle GABA ve histamin için yöntemin kullanılabilirliği gösterilmiştir.

% 0.1 asetik asit içeren su-ACN gradient hareketli faz sisteminde C18 kolon kullanılarak NBD-Cl ile türevlendirilerek GABA ve histamin için ayırım, teşhis ve tayin koşulları belirlenmiştir. Histamin ve GABA için sırasıyla, 10.5 ve 17.5 dakikalarda elde edilen alikotma zamanları ile kromatografik ayırma başarıyla sağlanmıştır. Yöntemin doğrusalılığı, doğruluğu, kesinliği, saptama ve tayin sınırları belirlenerek validasyonu gösterilmiştir. Geliştirilen yöntem özellikle GABA miktar tayini için kaynaklarda rastlanan kapiler kolonların kullanıldığı yöntemler dışında LC-MS yöntemleri içinde en duyarlı yöntemdir.

Siçan beyininin *lateral hypothalamus*, *ventral anterior nucleus* ve *corpus striatum* bölgelerinde mikrodiyaliz tekniği ile alınan örneklerde geliştirilen yöntem ile GABA ölçülerek bazal düzeyler belirlenmiştir. Bu örneklerde GABA'nin bazal düzeyleri, *lateral hypothalamus* için  $123.25 \pm 0.67$ , *ventral anterior nucleus* için  $151.41 \pm 18.53$  ve *corpus striatum* için  $94.96 \pm 0.53$  ng.mL<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.

Histamin için ise bölgelerden alınan örneklerdeki derisimi yöntemin LOQ'sunun altında olduğu için ölçüm yapılamamıştır.

*Nörotransmitter*lerin fizyolojik, farmakolojik ve patolojik etkilerinin belirlenmesini amaçlayan çalışmalarda, geliştirilen LC-MS yönteminin duyarlı ve güvenilir bir şekilde GABA düzeylerinin ölçümüne olanak sağlayacağı söylenebilir.



## KAYNAKLAR

Alberts, G., Lameris, T., van den Meiracker, A.H., Man in't Veld, A.J., Boomsma, F., Sensitive and specific method for the simultaneous determination of natural and synthetic catecholamines and 3,4-dihydroxyphenylglycol in microdialysis samples, *J. Chromatogr. B.*, 730, 213-219 (1999).

Bergquist, J., Sciubisz, A., Kaczor, A., Silberring, J., Catecholamines and methods for their identification and quantitation, biological tissues and fluids, *J. Neurosci. Meth.*, 113, 1-13 (2002).

Bianchi, L., Della Corte, L., Tipton, K.F., Simultaneous determination of basal and evoked output levels of aspartate, glutamate, taurine and 4-aminobutyric acid during microdialysis and from superfused brain slices, *J. Chromatogr. B.*, 726, 285-290 (1999).

Borycz, J., Vohra, M., Tokarczyk, G., Meinertzhagen, I.A., The determination of histamine in the *Drosophila* head, *J. Neurosci. Meth.*, 101, 141-148 (2000).

Brown, R.E., Stevens, D.R., Haas, H.L., The physiology of brain histamine, *Prog. Neurobiol.*, 63, 637-672 (2001).

Bruce, C., Taylor, W.H., Radio-enzymatic determination of histamine: interference by fluoride and possible activation of histamine methyl transferase, *Clin. Chim. Acta.*, 276, 157-162 (1998).

Busto, O., Miracle, M., Guasch, J., Borrull, F., Determination of biogenic amines in wines by high-performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization, *J. Chromatogr. A.*, 757, 311-318 (1997).

Cao, G.-M., Hoshino, T., Stability of catecholamines, indolamines and related metabolites in the process of sample preparation with ultrasonication and an analysis by high-performance liquid chromatography, *Anal. Sci.*, 14, 835-838 (1998).

Chen, N.N.H., Lai, Y.J., Wyan, H.T.P., Effects of different perfusion medium on the extracellular basal concentration of dopamine in striatum and medial prefrontal cortex: a zero-net flux microdialysis study, *Neurosci. Lett.*, 225, 197-200 (1997).

Chi, J.D., Odontiadis, J., Franklin, M., Simultaneous determination of catecholamines in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.*, 731, 361-367 (1999).

Clarke, G., O'Mahony, S., Malone, G., Dinan, T.G., An isocratic high performance liquid chromatography method for the determination of GABA and glutamate in discrete regions of the rodent brain, *J. Neurosci. Meth.*, 160, 223-230 (2007).

Dong, Y., Wang, L., Shangguan, D., Zhao, R., Liu, G., Improved method for the routine determination of acetylcholine and choline in brain microdialysate using a horseradish peroxidase column as the immobilized enzyme reactor, *J. Chromatogr. B.*, 788, 193-198 (2003).

Festa, E.D., Russo, S.J., Gazi, F.M., Niyomchai, T., Kemen, L.M., Lin, S.-N., Foltz, R., Jenab, S., Quinones-Jenab, V., Sex differences in cocaine-induced behavioral responses, pharmacokinetics, and monoamine levels, *Neuropharmacology.*, 46, 672-687 (2004).

Fujino, K., Yoshitake, T., Kehr, J., Nohta, H., Yamaguchi, M., Simultaneous determination of 5-hydroxyindoles and catechols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine, *J. Chromatogr. A.*, 1012, 169-177 (2003).

Guan, C.L., Ouyang, J., Li, Q.L., Liu, B.H., Baeyens, W.R.G., Simultaneous determination of catecholamines by ion chromatography with direct conductivity detection, *Talanta*, 50, 197-1203 (2000).

Hoffman E., Stroobant V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester, 196-197, (2001a).

Hoffman E., Stroobant V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester, 1-20, (2001b).

**http-1.** The Nobel Prize in Chemistry 2002, [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2002/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/) (14.08.2007)

**http-2** Microdialysis, <http://www.cop.ufl.edu/safezone/pat/pha6416/ppt-files/05Microdialysis-schmidt.pdf> (14.08.2007)



**http-3** History of Microdialysis, <http://www.aurora-borealis.nl/Microdialysis.htm> (10.08.2007)

**http-4** Microdialysis Probes, <http://www.microdialysis.se/probes.htm> (10.08.2007)

Hu, X.J., Wang, F.H., Stenfors, C., Örgen, S.O., Kehr, J., Effects of the 5-HT<sub>1B</sub> receptor antagonist NAS-181 on extracellular levels of acetylcholine, glutamate and GABA in the frontal cortex and ventral hippocampus of awake rats: A microdialysis study, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 17, 580-586 (2007).

Huang, T., Yang, L., Gitzeni, J., Kissinger, P.T., Vreeke, M., Heler, A., Detection of basal acetylcholine in rat brain microdialysate, *J. Chromatogr. B.*, 670 (2), 323-327 (1995).

Jenkins, T.A., Latimer, M.P., Alderson, H.L., Winn, P., Determination of acetylcholine and dopamine content in thalamus and striatum after excitotoxic lesions of the pedunclopontine tegmental nucleus in rats, *Neurosci. Lett.*, 322, 45-48 (2002).

Kehr, J., Determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid in microdialysis samples by microbore column liquid chromatography and fluorescence detection, *J. Chromatogr. B.*, 708, 49-54 (1998a).

Kehr, J., Dechent, P., Kato, T., Örgen, S.O., Simultaneous determination of acetylcholine, choline and physostigmine in microdialysis samples from rat hippocampus by microbore liquid chromatography/electrochemistry on peroxidase redox polymer coated electrodes, *J. Neurosci. Methods*, 83, 143-150 (1998b).

Kehr, J., Hu, X.-J., Yoshitake, T., Scheller, D., Determination of the dopamine agonist rotigotine in microdialysates from the rat brain by microbore column liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B.*, 845, 109-113 (2007).

Kuhawar, M.Y., Rajper, A.D., Liquid chromatographic determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid in cerebrospinal fluid using 2-hydroxynaphthaldehyde as derivatizing reagent, *J. Chromatogr. B.*, 788, 413-418 (2003).

Lange E.C.M., Boer A.G.B., Breimer D.D., Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier, *Brain. Res. Rev.*, 25, 27-49 (1997).

Lange E.C.M., Boer A.G., Breimer D.D., Microdialysis for pharmacokinetic analysis of drug transport to the brain, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 36, 211-227 (1999).

Le Quellec A., Dupin S., Genissel P., Saivin S., Marchand B., Houin G., Microdialysis Probes Calibration: Gradient and tissue dependent changes in no net flux and reverse dialysis methods, *J. Pharmacol. Toxicol Methods.*, 33, 11-16 (1995).

Ma, D., Zhang, J., Sugahara, K., Ageta, T., Nakayama, K., Kodama, H., Simultaneous determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid and glutamic acid in the brain of 3-mercaptpropionic acid-treated rats using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.*, 726, 285-290 (1999).

Manini, P., Andreoli, R., Cavazzini, S., Bergamaschi, E., Mutti, A., Niessen, W.M.A., Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of acidic monoamine metabolites, *J. Chromatogr. B.*, 744, 423-431 (2000).

McNay, E.C., Gold, P.E., Extracellular concentrations in the rat hippocampus measured by Zero-Net-Flux: Effects of microdialysis flow rate, strain and age, *J. Neurochem.*, 72 (2), 785-790 (1999).

Oguri, S., Yoneya, Y., Assay and biological relevance of endogenous histamine and its metabolites: application of microseparation techniques, *J. Chromatogr. B.*, 781, 165-179 (2002).

Osborne, P.G., Hu, Y., Covey, D.N., Barnes, B.N., Katz, Z., Drew, K.L., Determination of striatal extracellular  $\gamma$ -aminobutyric acid in non-hibernating and hibernating Arctic ground squirrels using quantitative microdialysis, *Brain Res.*, 839, 1-6 (1999).

Patel, B.A., Arundell, M., Parker, K.H., Yeoman, M.S., O'Hare, D., Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B.*, 818, 269-276 (2005).

Paxinos G., Watson C., *The Rat Brain Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, USA, 1996.

Peterson, Z.D., Collins, D.C., Bowerbank, C.R., Lee, M.L., Graves, S.W., Determination of catecholamines and metanephrines in urine by capillary electrophoresis-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.*, 776, 221-229 (2002).

Raggi, M.A., Sabbioni, C., Casamenti, G., Gerra, G., Calonghi, N., Masotti, L., Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B.*, 730, 201-211 (1999).

Rinne, S., Holm, A., Lundanes, E., Greibrokk, T., Limitations of porous graphitic carbon as stationary phase material in the determination of catecholamines, *J. Chromatogr. A.*, 1119, 285-293 (2006).

Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W.A., Hill, H.M., Hulse, J.D., McGilveray, I.J., McKay, G., Miller, K.J., Patnaik, R.N., Powel M.L., Tonelli, A., Viswanathan, C.T., Yacobi, A., Bioanalytical method validation-A revisit with decade of progress, *Pharm. Res.*, 17 (12), 1551-1557 (2000).

Sirén, H., Mielonen, M., Herlevi, M., Capillary electrophoresis in the determination of anionic catecholamine metabolites from patients' urine, *J. Chromatogr. A.*, 1032, 289-297, (2004).

Song, Y., Shenwu, M., Dhossche, D.M., Liu, Y.-M., A capillary liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the quantification of  $\gamma$ -aminobutyric acid in human plasma and cerebrospinal fluid, *J. Chromatogr. B.*, 814, 295-302 (2005).

Struys, E.A., Guérand, W.S., ten Brick, H.J., Jakobs, C., Combined method for the determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid and  $\beta$ -alanine in cerebrospinal fluid by stable isotope dilution mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.*, 732, 245-249 (1999).

Törnkvist, A., Sjöberg, P.J.R., Markides, K.E., Berquist, J., Analysis of catecholamines and related substances using porous graphitic carbon as separation media in liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.*, 801, 323-329 (2004).

Tsai, T.-H., Separation methods used in the determination of choline and acetylcholine, *J.Chromatogr. B*, 747, 111-122 (2002).

Tsoupras, G., LC/MS<sup>n</sup> (ion trap)&LC/MSD (quadrupole) Sistemi ve Uygulamaları Çalıştay Kitabı, SEM Laboratuvar Cihazları Paz. San. Ltd. Sti., İstanbul, 2005.

Tunçel, N., Sener, E., Cerit, C., Karasu, U., Gürer, F., Sahintürk, V., Bayçu, C., Ak, D., Filiz, Z., Brain mast cells and therapeutic potential of vasoactive intestinal peptide in a parkinson's disease model in rats: brain microdialysis, behavior and microscopy, *Peptides*, 26 (5), 827-836 (2005).

Unceta, N., Rodriguez, E., Gomez de Balugera, Z., Sampedro, C., Goicolea, M.A., Barrondo, S., Sallés, J., Barrio, R.J., Determination of catecholamines and their metabolites in human plasma using liquid chromatography with coulometric multi-electrode cell-design detection, *Anal.Chim.Acta.*, 444, 211-221 (2001).

Virag, L., Whittington, R.A., Highly sensitive chromatographic assay for dopamine determination during in vivo cerebral microdialysis in the rat, *J. Chromatogr. B.*, 772, 267-272 (2002).

Von Vietinghoff, V., Gäbel, G., Aschenbach, J.R., High-performance liquid chromatographic method for the determination of histamine and 1-methylhistamine in biological buffers, *J. Chromatogr. B.*, 844, 335-339 (2006).

Wise, D., Barkhimer, T.V., Brault, P.A., Kirchhoff, J.R., Messer Jr, W.S., Hudson, R.A., Internal Standard method for the measurement of choline and acetylcholine by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B*, 775, 49-56 (2002).

Yamaguchi, M., Yoshitake, T., Fujino, K., Kawano, K., Kehr, J., Ishida, J., Determination of norepinefrine in microdialysis samples by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine, *Anal. Biochem.*, 270, 296-302 (1999).

Yoshitake, T., Yamaguchi, M., Nohta, H., Ichinose, F., Yoshida, H., Yoshitake, S., Fuxe, K., Kehr, J., Determination of histamine in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography following intramolecular excimer-forming derivatization with pyrene-labeling reagent, *J. Neurosci. Meth.*, 127, 11-17 (2003).

Yoshitake, T., Yoshitake, S., Fujino, K., Nohta, H., Yamaguchi, M., Kehr, J., High sensitive liquid chromatographic method for the determination of neuronal release of serotonin, noradrenaline and dopamine monitored by microdialysis in the rat prefrontal cortex, *J. Neurosci. Meth.*, 140, 163-168 (2004a).

Yoshitake, T., Kehr, J., Yoshitake, S., Fujino, K., Nohta, H., Yamaguchi, M., Determination of serotonin, noradrenaline, dopamine and their metabolites in rat brain extracts and microdialysis samples by column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine, *J. Chromatogr. B.*, 804, 177-183 (2004b).

Zacharis, C.K., Theodoridis, G.A., Voulgaropoulos, A.N., On-line coupling of sequential injection with liquid chromatography for the automated derivatization and determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid in human biological fluids, *J. Chromatogr. B.*, 808, 169-175 (2004).

Zhang, G., Bown, A.W., The rapid determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid, *Phytochemistry.*, 44 (6), 1007-1009 (1997).

Zhang, L.-Y., Tang, X.-C., Sun, M.-X., Simultaneous determination histamine and polyamines by capillary zone electrophoresis with 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatization and fluorescence detection, *J. Chromatogr. B.*, 820, 211-219 (2005).

Zhang, M.-Y., Beyer, C.E., Measurement of neurotransmitters from extracellular fluid in brain by in vivo microdialysis and chromatography-mass spectrometry, *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 40, 492-499 (2006).

Zhu Y., Chiang H., Wulster-Radcliffe M., Hilt R., Wong P., Kissenger C.B., Kissenger P.T., Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for determination of carbamazepine and its main metabolite in rat plasma utilizing an automated blood sampling system, *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 38, 119-125 (2005).