

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**ORGANİK ASİDÜRİLERİN TANISINDA KAPİLER ELEKTROFOREZ  
TEMASIZ İLETKENLİK DEDEKTÖRÜ UYGULAMALARI: KEMOMETRİK  
DENEY TASARIMI İLE METOT OPTİMİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**Sirun ÖZÇELİK**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Kimya Programı**

**EYLÜL 2021**



**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**ORGANİK ASİDÜRİLERİN TANISINDA KAPİLER ELEKTROFOREZ  
TEMASSIZ İLETKENLİK DEDEKTÖRÜ UYGULAMALARI: KEMOMETRİK  
DENEY TASARIMI İLE METOT OPTİMİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**Sirun ÖZÇELİK  
(509142020)**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Kimya Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN**

**EYLÜL 2021**



İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 509142020 numaralı Doktora Öğrencisi Sirun ÖZÇELİK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “ORGANİK ASİDÜRİLERİN TANISINDA KAPİLER ELEKTROFOREZ TEMASSIZ İLETKENLİK DEDEKTÖRÜ UYGULAMALARI: KEMOMETRİK DENEY TASARIMI İLE METOT OPTİMİZASYONU” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :** **Prof. Dr. Fatma Bedia BERKER** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Prof. Dr. Güzin ALPDOĞAN** .....  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Dr. Öğr. Üyesi Ferah ÇALIŞIR** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Dr. Öğr. Üyesi Şerif CANSEVER** .....  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

**Teslim Tarihi** : 25 Temmuz 2021  
**Savunma Tarihi** : 27 Eylül 2021





*Aileme ve dostlarıma,*



## ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince benden yardımını ve desteğini esirgemeyen, tez çalışmamda akademik bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN'e,

Deneyimleri ve bilgileriyle çalışmalarına desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER'e,

Çalışmam süresince kalıtsal metabolizma hastalıkları hakkında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, katkılarını sunan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Şerif CANSEVER ve Doç. Dr. Ertuğrul KIYKIM'a,

Koşulsuz ve sınırsız desteğiyle her zaman yanımda olan dostum, kız kardeşim Dr. Zeynep KALAYCIOĞLU'na,

Yürüdüğüm yolda güvenle adımlar atmamı sağlayan, varlıklarıyla beni şanslı hissettiren canım annem ve babam, ablam, eniştem, anneannem, yeğenlerim ve kuzenlerime,

Tezimi tamamlama süresince manevi desteğini sunmuş, güç ve cesaret vermiş çok sevgili dostlarım Melis Kanat, Liana Benli, Nadin Demir, Melissa Özahakyan, Jenya İçliyürek, Karin İç, Aren Haşar, Dilan Kap, Özden Dedeoğlu ve adını buraya yazamadığım tüm dost ve arkadaşlarıma,

Desteklerinden dolayı İTÜ BAP Birimi'ne (TDK-2018-41370),

Çok ama çok teşekkür ederim..

Temmuz 2021

Sirun Özçelik  
(Yüksek Kimyager)



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                      |      |
|------------------------------------------------------|------|
| ÖNSÖZ .....                                          | vii  |
| İÇİNDEKİLER .....                                    | ix   |
| KISALTMALAR .....                                    | xiii |
| ÇİZELGE LİSTESİ.....                                 | xv   |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                   | xvii |
| ÖZET .....                                           | xix  |
| SUMMARY .....                                        | xxi  |
| 1. GİRİŞ.....                                        | 1    |
| 2. KAPİLER ELEKTROFOREZ.....                         | 5    |
| 2.1 Elektroforezin Tarihsel Gelişimi .....           | 5    |
| 2.2 Kapiler Elektroforezin Prensipleri.....          | 5    |
| 2.3 Elektroforetik Ayırma Prensipleri .....          | 6    |
| 2.3.1 Elektroforetik mobilite.....                   | 6    |
| 2.4 Elektroosmotik Akış.....                         | 7    |
| 2.4.1 Elektroosmotik akışı etkileyen faktörler.....  | 9    |
| 2.4.2 Analitlerin elektroforetik mobiliteleri.....   | 10   |
| 2.5 Kapiler Elektroforez Cihaz Bileşenleri.....      | 10   |
| 2.5.1 Kapiler kolon.....                             | 11   |
| 2.5.2 Enjeksiyon yöntemleri.....                     | 11   |
| 2.5.2.1 Hidrodinamik.....                            | 11   |
| 2.5.2.2 Elektrokinetik.....                          | 11   |
| 2.5.2.2 Örnek sıkıştırma.....                        | 11   |
| 2.5.3 Elektrot.....                                  | 12   |
| 2.5.4 Voltaj kaynağı.....                            | 12   |
| 2.5.5 Dedeksiyon çeşitleri.....                      | 13   |
| 2.5.5.1 İletkenlik dedektörü.....                    | 13   |
| 2.6 Kapiler Elektroforez Çeşitleri.....              | 15   |
| 2.6.1 Kapiler zon elektroforez (CZE) .....           | 15   |
| 2.6.2 Kapiler jel elektroforez (CGE).....            | 15   |
| 2.6.3 Kapiler izotakoforez (CTP) .....               | 15   |
| 2.6.4 Kapiler izoelektronik odaklama (CIEF) .....    | 15   |
| 2.6.5 Kapiler elektrokromatografi (CEC).....         | 16   |
| 2.6.6 Misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) ..... | 16   |
| 3. DENEYSEL TASARIM VE OPTİMİZASYON.....             | 17   |
| 3.1 Yanıt Yüzey Metodu .....                         | 18   |
| 3.1.1 Tarama tasarımları .....                       | 18   |
| 3.1.2 Merkezi kompozit tasarım (CCD) .....           | 20   |
| 3.1.3 Box-Behnken tasarımı (BBD).....                | 22   |
| 4. METABOLİK HASTALIKLAR .....                       | 25   |
| 4.1 Malonik Asidüri .....                            | 25   |

|                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.1 Tanı .....                                                                                        | 27        |
| 4.1.2 Tedavi.....                                                                                       | 28        |
| 4.2 Metilmalonik Asidüri .....                                                                          | 29        |
| 4.2.1 Tanı .....                                                                                        | 30        |
| 4.2.2 Tedavi.....                                                                                       | 31        |
| 4.3 Etilmalonik Asidüri .....                                                                           | 32        |
| 4.3.1 Tanı .....                                                                                        | 33        |
| 4.3.2 Tanı .....                                                                                        | 33        |
| 4.4 Mevalonik Asidüri.....                                                                              | 34        |
| 4.4.1 Tanı .....                                                                                        | 35        |
| 4.4.2 Tedavi.....                                                                                       | 36        |
| 4.5 Sialik Asidüri.....                                                                                 | 36        |
| 4.5.1 Tanı .....                                                                                        | 38        |
| 4.5.2 Tedavi.....                                                                                       | 38        |
| <b>5. DENEYSEL KISIM .....</b>                                                                          | <b>39</b> |
| 5.1 Malzeme ve Yöntemler .....                                                                          | 39        |
| 5.1.1 Kimyasallar .....                                                                                 | 39        |
| 5.1.2 Standart çözeltilerin ve idrar örneklerinin hazırlanması .....                                    | 39        |
| 5.1.3 Cihazlar ve çalışma şartları .....                                                                | 40        |
| <b>6. SONUÇLAR .....</b>                                                                                | <b>41</b> |
| 6.1 İdrarda Etilmalonik Asit Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi .....                                    | 41        |
| 6.1.1 Box-Behnken tasarımı ile optimizasyon .....                                                       | 42        |
| 6.1.2 Metot validasyonu .....                                                                           | 44        |
| 6.1.2.1 Kalibrasyon .....                                                                               | 44        |
| 6.1.2.2 Matriks etkisi.....                                                                             | 44        |
| 6.1.2.3 LOD ve LOQ.....                                                                                 | 44        |
| 6.1.2.4 Kesinlik ve geri kazanım.....                                                                   | 45        |
| 6.1.3 Yöntemin hasta idrarında EMA tayinine uygulanması .....                                           | 45        |
| 6.2 İdrarda Malonik, Metilmalonik ve Etilmalonik Asit Eşzamanlı Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi ..... | 46        |
| 6.2.1 Box-Behnken tasarımı ile optimizasyon .....                                                       | 47        |
| 6.2.2 Metot validasyonu .....                                                                           | 50        |
| 6.2.2.1 Kalibrasyon .....                                                                               | 50        |
| 6.2.2.2 Matriks etkisi.....                                                                             | 51        |
| 6.2.2.3 LOD ve LOQ.....                                                                                 | 51        |
| 6.2.2.4 Kesinlik ve geri kazanım.....                                                                   | 51        |
| 6.2.3 Yöntemin hasta idrarlarında MMA ve EMA tayinine uygulanması .....                                 | 52        |
| 6.3 İdrarda Sialik ve Mevalonik Asit Eşzamanlı Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi .....                  | 53        |
| 6.3.1 Deneysel tasarım .....                                                                            | 53        |
| 6.3.1.1 Tarama tasarımı ile örnek sıkıştırma yöntemi için etkili faktörlerin bulunması.....             | 54        |
| 6.3.1.2 Box-Behnken tasarımı ile optimizasyon .....                                                     | 55        |
| 6.3.2 Metot validasyonu .....                                                                           | 57        |
| 6.3.2.1 Kalibrasyon .....                                                                               | 57        |
| 6.3.2.2 Matriks etkisi.....                                                                             | 58        |
| 6.3.2.3 LOD ve LOQ.....                                                                                 | 58        |
| 6.3.2.4 Kesinlik ve geri kazanım.....                                                                   | 58        |
| 6.3.3 Yöntemin hasta idrarlarında SA tayinine uygulanması .....                                         | 59        |
| 6.4 Tartışma ve Yorum.....                                                                              | 60        |

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| <b>KAYNAKLAR .....</b> | <b>63</b> |
| <b>EKLER .....</b>     | <b>73</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>   | <b>85</b> |





## KISALTMALAR

|                       |                                                                                       |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ACE</b>            | : Anjiotensin Konverting Enzim                                                        |
| <b>BBD</b>            | : Box-Behnken Tasarımı                                                                |
| <b>BGE</b>            | : Background Electrolyte                                                              |
| <b>CCD</b>            | : Merkez Kompozit Dizaynı                                                             |
| <b>C<sup>4</sup>D</b> | : Temassız İletkenlik Dedektörü                                                       |
| <b>CE</b>             | : Kapiler Elektroforez                                                                |
| <b>CE-AD</b>          | : Kapiler Elektroforez-Amperometrik Dedeksiyon                                        |
| <b>CEC</b>            | : Kapiler Elektrokromatografi                                                         |
| <b>CGE</b>            | : Kapiler Jel Elektroforez                                                            |
| <b>CIEF</b>           | : Kapiler İzoelektrik Odaklama                                                        |
| <b>CITP</b>           | : Kapiler İzotakoforez                                                                |
| <b>CZE</b>            | : Kapiler Zon Elektroforez                                                            |
| <b>EMA</b>            | : Etilmalonik Asit                                                                    |
| <b>EOA</b>            | : Elektroosmotik Akış                                                                 |
| <b>GC-MS</b>          | : Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi                                             |
| <b>HILIC</b>          | : Hidrofilik etkileşim kromatografisi (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) |
| <b>HPLC-ITMS</b>      | : High Performance Liquid Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry                   |
| <b>IMD</b>            | : Inherited Metabolic Diseases                                                        |
| <b>ISSD</b>           | : Infantile free sialic acid storage disease                                          |
| <b>LC-MS/MS</b>       | : Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi                       |
| <b>LOD</b>            | : Tayin Sınırı (Limit of Detection)                                                   |
| <b>LOQ</b>            | : Ölçüm Sınırı (Limit of Quantification)                                              |
| <b>LIF</b>            | : Lazer İndüklenmiş Florosans Dedektör                                                |
| <b>MA</b>             | : Malonik Asit                                                                        |
| <b>MEKC</b>           | : Misel Elektrokinetik Kromatografi                                                   |
| <b>MLYCD</b>          | : Malonil-KoA Dekarboksilaz                                                           |
| <b>MLYCDD</b>         | : Malonil-KoA Dekarboksilaz Eksikliği                                                 |
| <b>MMA</b>            | : Metilmalonik Asit                                                                   |
| <b>MVA</b>            | : Mevalonik Asit                                                                      |
| <b>RSD</b>            | : Bağlı Standart Sapma (Relative Standard Deviation)                                  |
| <b>SA</b>             | : Sialik Asit                                                                         |
| <b>UV</b>             | : Ultraviyole                                                                         |



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

|              |                                                                                                                          |    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.1  | : Örnek faktör ve seviyeler. ....                                                                                        | 19 |
| Çizelge 3.2  | : Tam Faktöriyel tasarım tablosu. ....                                                                                   | 20 |
| Çizelge 3.3  | : Merkezi kompozit tasarım tablosu. ....                                                                                 | 21 |
| Çizelge 3.4  | : Box-Behnken tasarım tablosu. ....                                                                                      | 23 |
| Çizelge 4.1  | : Sağlıklı bireylerin idrarında malonik asit seviyeleri. ....                                                            | 28 |
| Çizelge 4.2  | : Metilmalonik asidüri fenotiplerinde ve enzimatik alt tiplerinde sağlıklı birey idrarındaki MMA konsantrasyonları. .... | 31 |
| Çizelge 4.3  | : Sağlıklı bireylerin idrarında etilmalonik asit seviyeleri. ....                                                        | 33 |
| Çizelge 4.4  | : Sağlıklı bireylerin idrarında mevalonik asit seviyeleri. ....                                                          | 36 |
| Çizelge 4.5  | : Sağlıklı bireylerin idrarında sialik asit seviyeleri. ....                                                             | 38 |
| Çizelge 5.1  | : Silika kapiler kolonların iç çapı, toplam ve etkin uzunlukları. ....                                                   | 40 |
| Çizelge 6.1  | : Çalışmada kullanılan faktörler ve seviyeleri. ....                                                                     | 42 |
| Çizelge 6.2  | : Regresyon parametreleri, LOD ve LOQ değerleri. ....                                                                    | 44 |
| Çizelge 6.3  | : İdrarda EMA için geri kazanım ve kesinlik. ....                                                                        | 45 |
| Çizelge 6.4  | : Çalışmada kullanılan faktörler ve seviyeleri. ....                                                                     | 48 |
| Çizelge 6.5  | : Su ve idrar ortamındaki doğrusal çalışma alanı. ....                                                                   | 50 |
| Çizelge 6.6  | : LOD ve LOQ değerleri. ....                                                                                             | 51 |
| Çizelge 6.7  | : Metodun kesinlik değerleri. ....                                                                                       | 51 |
| Çizelge 6.8  | : Geri kazanım değerleri (n=3). ....                                                                                     | 52 |
| Çizelge 6.9  | : Çalışmada kullanılan faktörler ve seviyeleri. ....                                                                     | 54 |
| Çizelge 6.10 | : Kısmi faktöriyel analiz sonuçları. ....                                                                                | 55 |
| Çizelge 6.11 | : Çalışmada kullanılan faktörler ve seviyeleri. ....                                                                     | 55 |
| Çizelge 6.12 | : Su ve idrar ortamındaki doğrusal çalışma alanı.. ....                                                                  | 58 |
| Çizelge 6.13 | : LOD ve LOQ değerleri. ....                                                                                             | 58 |
| Çizelge 6.14 | : Metodun kesinlik değerleri. ....                                                                                       | 59 |
| Çizelge 6.15 | : Geri kazanım değerleri (n=3). ....                                                                                     | 59 |
| Çizelge A.1  | : Ayırma gücü için varyans analizi sonuçları.. ....                                                                      | 74 |
| Çizelge A.2  | : Pik yüksekliği için varyans analizi sonuçları. ....                                                                    | 74 |
| Çizelge B.1  | : R <sub>1</sub> (Ayırma gücü 1) için varyans analizi sonuçları. ....                                                    | 77 |
| Çizelge B.2  | : R <sub>2</sub> (Ayırma gücü 2) için varyans analizi sonuçları. ....                                                    | 77 |
| Çizelge B.3  | : Ortalama pik yüksekliği için varyans analizi sonuçları. ....                                                           | 78 |
| Çizelge C.1  | : Optimizasyon için tasarlanan deney ile seçilen faktörlerin kodlu ve gerçek değerleri. ....                             | 81 |
| Çizelge C.2  | : R <sub>1</sub> (pik yüksekliği) için varyans analizi sonuçları. ....                                                   | 81 |



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

|            |                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1  | : Kapiler elektroforez cihazı şematik gösterimi. ....                                                                                                                                                  | 6  |
| Şekil 2.2  | : Elektroosmotik akış oluşumu. ....                                                                                                                                                                    | 8  |
| Şekil 2.3  | : a) Elektroosmotik akış dedektör cevabı.<br>b) Parabolik akış dedektör cevabı. ....                                                                                                                   | 9  |
| Şekil 2.4  | : Elektroosmotik akış varlığında analitlerin geçişi ve görünür<br>mobiliteleri.....                                                                                                                    | 10 |
| Şekil 2.5  | : Basitleştirilmiş şematik devre gösterimi. ....                                                                                                                                                       | 14 |
| Şekil 3.1  | : Küp şeklinden elde edilen Box-Behnken tasarım noktaları. ....                                                                                                                                        | 22 |
| Şekil 4.1  | : Malonil-KoA yolağı. ....                                                                                                                                                                             | 27 |
| Şekil 4.2  | : Malonik asit molekül yapısı. ....                                                                                                                                                                    | 28 |
| Şekil 4.3  | : Metilmalonik asidüride metilmalonil-KoA mutaz eksikliğini gösteren<br>metabolik yol. ....                                                                                                            | 29 |
| Şekil 4.4  | : Metilmalonik asit molekül yapısı. ....                                                                                                                                                               | 30 |
| Şekil 4.5  | : Etilmalonik asidürinin metabolik yolları. ....                                                                                                                                                       | 32 |
| Şekil 4.6  | : Etilmalonik asit molekül yapısı. ....                                                                                                                                                                | 33 |
| Şekil 4.7  | : Mevalonik asit fosforilasyonu. ....                                                                                                                                                                  | 35 |
| Şekil 4.8  | : Mevalonik asit molekül yapısı. ....                                                                                                                                                                  | 35 |
| Şekil 4.9  | : Sialik asidin metabolizma yolu. ....                                                                                                                                                                 | 37 |
| Şekil 4.10 | : Sialik asit molekül yapısı. ....                                                                                                                                                                     | 38 |
| Şekil 6.1  | : Optimum ayırma koşulları: 50 mmol/L MES, 0,13 mmol/L CTAB ve<br>pH=6,5. A: Sağlıklı insan idrarı B: 5 mg/L EMA eklenmiş sağlıklı insan<br>idrarı C: 20 mg/L EMA eklenmiş sağlıklı insan idrarı. .... | 43 |
| Şekil 6.2  | : Hasta idrarındaki EMA için elektroferogram. ....                                                                                                                                                     | 43 |
| Şekil 6.3  | : Farklı iç çapa sahip silika kapiler kolonların ayırma gücü üzerindeki<br>etkisi. ....                                                                                                                | 46 |
| Şekil 6.4  | : Farklı kapiler kolonlarda 10 mg/L konsantrasyondaki asitlerin<br>elektroferogramları.1: MA 2:MMA 3:EMA A: 25 µm B: 50 µm. ....                                                                       | 47 |
| Şekil 6.5  | : A: Sağlıklı insan idrarı B: 10 mg/L MA (1) ,MMA (2) ve EMA(3)<br>eklenmiş sağlıklı insan idrarı. Optimum ayırma koşulları: 45 mmol/L<br>MES, $t_{inj}=0,5$ dk ve pH=6,5. ....                        | 49 |
| Şekil 6.6  | : A: Metilmalonik asidüri hasta idrarı B: 10 mg/L MMA (2) standardı<br>eklenmiş metilmalonik asidüri hasta idrarı. Optimum ayırma koşulları:<br>45 mmol/L MES, $t_{inj}=0,5$ dk ve pH=6,5. ....        | 49 |
| Şekil 6.7  | : A: Etilmalonik asidüri hasta idrarı B: 10 mg/L EMA (3) standardı<br>eklenmiş metilmalonik asidüri hasta idrarı. Optimum ayırma koşulları:<br>45 mmol/L MES, $t_{inj}=0,5$ dk ve pH=6,5. ....         | 50 |
| Şekil 6.8  | : A: Sağlıklı insan idrarı B: 5 mg/L standart asit eklenmiş sağlıklı insan<br>idrarı 1: Mevalonik Asit 2: Sialik asit. Optimum ayırma koşulları: 10<br>mmol/L MA, 0,1 mmol/L CTAB ve pH=6,5. ....      | 56 |
| Şekil 6.9  | : Sağlıklı insan idrarına ait elektroferogram. Optimum ayırma koşulları:<br>10 mmol/L MA, 0,1 mmol/L CTAB ve pH=6,5. ....                                                                              | 57 |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 6.10</b> : İki farklı hasta idrarında SA için elektroferogramlar. ....                                      | 57 |
| <b>Şekil A.1</b> : Ayırma gücü için yüzey grafikleri. ....                                                           | 75 |
| <b>Şekil A.2</b> : Pik yüksekliği için yüzey grafikleri. ....                                                        | 75 |
| <b>Şekil A.3</b> : Optimum tampon koşulları. $R_1$ : ayırma gücü, $R_2$ : pik yüksekliği. ....                       | 76 |
| <b>Şekil B.1</b> : $R_1$ (Ayırma gücü 1) için yüzey grafikleri. ....                                                 | 78 |
| <b>Şekil B.2</b> : $R_2$ (Ayırma gücü2) için yüzey grafikleri. ....                                                  | 79 |
| <b>Şekil B.3</b> : $h_{ort}$ (ortalama pik yüksekliği) için yüzey grafikleri. ....                                   | 79 |
| <b>Şekil B.4</b> : Optimum tampon koşulları. $R_1$ ve $R_2$ : ayırma gücü, $h_{ort}$ : ortalama pik yüksekliği. .... | 80 |
| <b>Şekil C.1</b> : $R_1$ (pik yüksekliği) için yüzey grafikleri. ....                                                | 82 |
| <b>Şekil C.2</b> : Örnek sıkıştırma yöntemi için optimum şartlar $R_1$ (pik yüksekliği). ....                        | 82 |
| <b>Şekil C.3</b> : Optimum tampon koşullarında pik yüksekliği ( $R_1$ ) ve ayırma gücü ( $R_2$ ) değerleri. ....     | 83 |



# **ORGANİK ASİDÜRİLERİN TANISINDA KAPİLER ELEKTROFOREZ TEMASSIZ İLETKENLİK DEDEKTÖRÜ UYGULAMALARI: KEMOMETRİK DENEY TASARIMI İLE METOT OPTİMİZASYONU**

## **ÖZET**

Organik asidüri, bir gendeki mutasyon sonucu karbonhidrat, aminoasit ve yağ asidi oksidasyonunun metabolik yollarındaki işlev bozuklukları ile oluşan, vücut sıvılarında ve özellikle de idrarda yüksek oranda asit birikimine yol açan kalıtsal metabolik bir hastalıktır. Hastalık teşhisinde basamaklardan biri de idrarda biriken asidin miktarının tayin edilmesidir. Organik asidüri gibi metabolik hastalıklarda çoğunlukla yenidoğanlarda ölümcül olduğundan erken teşhis hayati bir öneme sahiptir. Bu nedenle uzun ön işlemler gerektirmeyen, hızlı ve güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Kapiler elektroforez (CE) yüksek etkinliği ile küçük iyonlardan kompleks organik bileşiklere kadar çok kapsamlı bir ayırma yelpazesine sahip güçlü bir analitik tekniktir. Analizler kısa sürede ve düşük miktarda numune ile gerçekleştirilebilmektedir. CE ile birleştirilmiş temassız iletkenlik dedektörü ( $C^4D$ ) son yıllarda oldukça fazla ilgi gören bir tekniktir. Temassız iletkenlik dedektörü hassasiyeti yüksek, yapımı kolay olan ve ucuz bir cihazdır.

Kemometrik deneysel tasarım çok fazla değişkenin söz konusu olduğu analitik çalışmalarda az sayıda deney ile kimyasal verilerin işlenmesini sağlar. Değişkenlerin, deneysel sonuçları tek tek ve birlikte nasıl etkilediğini matematiksel formüller vasıtasıyla açıklar ve üç boyutlu analizler sunar.

Üç bölümden oluşan bu tez çalışmasında amaç farklı organik asidürilerin idrardaki teşhisi için hızlı ve duyarlı bir analitik yöntemi literatüre kazandırmaktır. Küçük organik asitler aromatik grup içermez ve UV dedeksiyon ile tespit edilemezler. İndirekt UV ile dedeksiyonda hassasiyet düşmekte, floresans ile dedeksiyonda ise uzun ön türevlendirme işlemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Temassız iletkenlik dedektörü (CE- $C^4D$ ) ile küçük organik asitler direkt olarak belirlenebilmektedir. Bu amaçla hassas ve hızlı uygulanabilen kapiler elektroforez ile birleştirilmiş temassız iletkenlik dedektörü (CE- $C^4D$ ) metotları geliştirilmiş ve bu yöntemler gerçek idrar örneklerine uygulanmıştır. Metot optimizasyonu kemometrik deneysel tasarım kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ilk basamağında etilmalonik asidürinin teşhisi için idrarda etilmalonik asidin miktarı tayin edilmiş, yöntem etilmalonik asidürili hasta idrarında da uygulanmıştır. İkinci bölümde ise malonik, metilmalonik ve etilmalonik asidin eş zamanlı tayini için analitik bir metot geliştirilmiştir. Asidürisi bulunan hasta idrarlarına yöntem başarı ile uygulanmıştır. Tez çalışmasının son bölümünde ise geliştirilen elektroforetik yöntem idrarda sialik ve mevalonik asidüri tanısı için kullanılabilecektir.



# **CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH CONTACTLESS CONDUCTIVITY DETECTION APPLICATIONS FOR DETERMINATION OF ORGANIC ACIDURIAS: METHOD OPTIMIZATION USING CHEMOMETRIC EXPERIMENTAL DESIGN**

## **SUMMARY**

Inherited metabolic diseases (IMD) were first described by Sir Archibald Garrod in 1908. IMD are inborn errors of metabolism and caused by genetic mutation in DNA. This mutation gives rise to defects in production or activity of an enzyme. Organic acidurias are one of the most important classes of inherited metabolic disorders. Organic aciduria is caused by genetic mutation which leads defect in intermediary metabolic pathways such as amino acids, carbohydrate and fatty acid oxidation. This mutation occurs in a single gene (monogenic) and is passed on through generations. Transmission is mostly autosomal recessive. These diseases can affect approximately 1:1,000 to 1:2,500 of newborns. These are rare but life-threatening disorders characterized by abnormal accumulation of acids in body fluids. Determination of the related acid in urine is an important step for definitive diagnosis of disease.

The clinical findings of the diseases in question also vary. The emergence of similar findings with different diseases or the presence of different findings in people with the same disease make diagnosis difficult and sometimes delayed. Most organic acidurias become clinically evident during the neonatal period or early infancy, but there are also milder forms that do not appear until adolescence or adulthood or require medical attention. When it is not detected in newborn, it often goes undiagnosed until symptoms appear. Development delay, cardiomyopathy, abnormal genitalia, hypotonia, brain abnormalities, recurrent vomiting, lethargy, seizures, neurological dysfunction, muscle weakness, liver disease, diarrhea, recurrent petechiae are some of the symptoms for characterization. Even if there is no treatment to avoid or survive permanent neurological effects it is important to diagnose the disease. The incidence of organic acidurias is high in population with high risk of consanguineous marriage and among seriously ill children. Due to the high number of consanguineous marriages in Turkey, the incidence of these diseases is higher than in the world. Early diagnosis and accurate determination in newborn patients has a vital importance as it's affecting newborns.

Analysis of metabolites in body fluids is one of the most common analyzes in clinical biochemical laboratories. Although many of the most common metabolites can be routinely determined by classical methods, the development of new methods and methods is demanded.

One of the important applications of new techniques is metabolite screening for the detection of hereditary diseases. Analysis of diagnostic metabolites found in urine allows for the identification of diseases in clinical studies. Analysis of organic acids in urine is of great importance in diagnosing organic aciduria. Because in these diseases, more than 100 organic acids are excreted in the urine. The methods used in the

diagnosis of organic acidurias are GC-MS, GC-MS/MS and LC-MS/MS. These methods include both expensive devices that are not available in every laboratory, and preliminary derivatization steps that require long time and processes. In addition to the rapid diagnosis of such diseases; It is important to develop fast, reliable and economical alternative analysis methods.

Accurate determination of acids in urine of patient has a vital importance to diagnose inborn metabolic errors. Capillary electrophoresis (CE) a newly implemented analytical technique for clinical analysis, which is identified to be highly effective. CE method has advantages such as high separation efficiency, excellent resolution, short analysis time and electrolyte and sample consumption. Due to its higher resolving power, CE is especially suitable in the analysis of complex natural matrices. As compared to chromatographic columns, fused silica capillaries increase the efficiency in terms of cost, being washed between each run easily as well as being free of irreversible contamination of the matrix. Therefore, by capillary electrophoresis, biological fluids give an opportunity to be used directly requiring no or simple additional pretreatment step.

Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection ( $C^4D$ ) is an alternative technique that has received lots of attention in recent years. It has high sensitivity, easy to construct and inexpensive. Species that do not contain aromatic groups and have poor absorption can usually be detected by indirect UV detection. But the method is less sensitive compared to  $C^4D$  and has limited linear range.  $C^4D$  is a suitable detection technique for charged species.

This study consists of three parts. In the first part of the thesis the aim was to develop a method for detection of ethylmalonic acid in urine. Concentration of ethylmalonic acid in urine is used for diagnosis of ethylmalonic aciduria.  $C^4D$  in CE it is necessary to use a buffer solution of low conductivity in order to obtain good sensitivity and to minimize the electrophoretic current. According to previous studies MES-Tris buffer system was chosen as background electrolyte. pH was adjusted with Tris in order to prevent increase in ionic strength of buffer solution. Negatively charged species such as anions of low molecular mass organic acids have high electrophoretic mobilities and long analysis times. Therefore, electroosmotic flow (EOF) is reversed to leads to short analysis times. For this purpose, an EOF modifier such as CTAB was added in the buffer in order to reverse the EOF.

In order to optimization of electrophoretic conditions chemometric experimental design was used. The chemometric experimental design enables the processing of chemical data with a small number of experiments in analytical studies where too many variables are involved. The Box-Behnken experimental design, developed by Box and Behnken in 1980, is a useful method for developing second-order response surface models. The CE- $C^4D$  method for the determination of ethylmalonic acid in urine was optimized by using the Box-Behnken design (BBD) with three variables: buffer concentration, surfactant concentration, and buffer pH. The effects of three experimental variables were investigated on the resolution and height of peak as experimental responses.

The optimum conditions were predicated by using a second-order polynomial model fitted to the results obtained by using BBD. Optimum separation conditions were obtained as 50 mM MES-Tris, 0.13 mM CTAB and pH 6.5. Under these conditions, acid was separates between 3-4 min with good peak shape. The analytical parameters of method were evaluated such as linearity, precision, detection limit (LOD) and

quantification limit (LOQ). Method's intra- and interday precision was <5% relative standard deviations. The linear regressions of the calibration curves indicated good linearity ( $R^2 > 0.99$ ). LOD (S/N = 3) and LOQ (S/N = 10) values for EMA were about 0.139 mg/L and 0.466 mg/L respectively. The proposed method was successfully applied to determine EMA in urine samples, with very simple preparation procedure of the real samples. The sample of patient urine was provided by the Division of Nutrition and Metabolism in the Department of Pediatrics, Cerrahpaşa Medical Faculty, Istanbul University-Cerrahpaşa. EMA concentration of this urine determined as  $245 \pm 3$  mg/L.

The second part of this study a CE-C<sup>4</sup>D method for the determination of MA, MMA and EMA in urine samples is developed. A three-level Box-Behnken Experimental Design of response surface methodology was used to optimize conditions of determination of malonic acid biomarkers with CE. Chemometric experimental designs are more advantageous than conventional experiments. Fewer experiments are needed for determine optimum conditions. This method provides savings in terms of time and the amount of material. Effective factors were buffer concentration, buffer pH and injection time. Resolution and height of peak were chosen as responses to optimize. Optimum separation conditions were calculated and obtained as 45 mM MES, 0.5 min injection time and pH 6.5. Good linearity was indicated by The linear regressions of the calibration curves ( $R^2 > 0.99$ ). LOD (S/N = 3) values for MA, MMA and EMA were about 0.222 mg/L, 0.228 mg/L and 0.431 mg/L respectively. LOQ (S/N = 10) values for MA, MMA and EMA were about 0.741 mg/L, 0.761 mg/L and 1.436 mg/L respectively. The method was successfully applied to determine acids in urine samples. MMA and EMA concentrations are found in patients who have methylmalonic aciduria as  $4158 \pm 15$  mg/L and  $339 \pm 5$  mg/L respectively. EMA concentration was  $251 \pm 4$  mg/L in patient's urine who has ethylmalonic aciduria.

In the last part of the study was to develop a CE-C<sup>4</sup>D method for simultaneous determination of sialic and mevalonic acid in urine. Fractional factorial design (FFD) was used to screen the experimental factors and for identifying the most significant factors. Then Box-Behnken design is used to estimate the optimum electrophoretic conditions. Sample stacking method was applied by injection of large volume of samples. Buffer concentration, buffer pH, surfactant concentration, injection time and pressure were chosen as parameters for FFD. Buffer concentration, injection time and pressure were calculated as effective parameters and BBD was applied. Optimum buffer conditions were 10 mM MA, 0.1 mM CTAB, pH= 6.5, 113 mbar injection pressure ve 33 sec injection time. The linear regressions of the calibration curves indicated good linearity ( $R^2 > 0.99$ ). LOD (S/N = 3) values for SA and MVA were about 0.223 mg/L and 0.145 mg/L respectively. LOQ (S/N = 10) values for SA and MVA were about 0.743 mg/L and 0.483 mg/L respectively. The method was also successfully applied to determine acids in urine samples. SA acid concentration was found as  $1861 \pm 22$  mg/L and  $472 \pm 6$  mg/L in two patients.

In this study, a rapid, reliable and simple CE-C<sup>4</sup>D method for the determination of organic acids in urine samples was developed. There is not any pretreatment step as samples were only diluted with water before injections. The method can be applied for clinical analysis of MA, MMA, EMA, MVA and SA in patients.



## 1. GİRİŞ

Vücuttaki bazı biyokimyasal yollardaki işlev bozukluklarından meydana gelmekte olan kalıtsal metkabolizma hastalıkları ilk kez 1908'de Sir Archibald Garrod tarafından tanımlanmıştır. İşlev bozuklukları ardında yatan sebep ise bu yollarda görevli protein ve enzimleri sentezleyen genlerdeki mutasyondur. Bu mutasyon tek gende (monogenik) meydana gelir ve nesiller boyunca aktarılır. Aktarımda çoğunlukla otozomal resesif geçiş söz konusudur. Bu hastalıklar yeni doğanların yaklaşık 1:1.000 ila 1:2.500 'ni etkileyebilir. Genellikle nadir görülen bu hastalıklara, akraba evliliğinin yüksek olduğu ülkemizde rastlanma oranı da fazladır.

Organik asidüriler kalıtsal metabolizma hastalıklarının oldukça önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Bu sınıfta yer alan hastalıklar genellikle karbonhidrat, yağ asidi oksidasyonu ve amino asit ara metabolik yollarındaki kusurlardan kaynaklanmaktadır. Organik asidüriler nedeniyle vücut sıvılarında yüksek oranda organik asit birikimi meydana gelmekte, asit-baz dengesi bozulmakta ve hücre içi biyokimyasal yollar etkilenmektedir [1-5].

Söz konusu olan hastalıkların klinik bulguları da çeşitlilik göstermektedir. Farklı hastalıklarla benzer bulguların ortaya çıkması veya aynı hastalığa sahip kişilerde farklı bulgulara rastlanması tanı koymayı zorlaştırmakta ve bazen de geciktirmektedir. Organik asidürilerin çoğu, yenidoğan döneminde veya erken bebeklik döneminde klinik olarak belirgin hale gelir, ancak ergenlik veya yetişkinliğe kadar ortaya çıkmayan veya tıbbi müdahaleye gerek olmayan daha hafif formlar da vardır. Kalıtsal bir metabolik bozukluk yeni doğanlarda tespit edilmezse, genellikle belirtiler ortaya çıkana kadar teşhis edilemez. Bu hastalıklar; hayati tehlike, zeka geriliği, fiziksel gelişimi etkileyen veya ömür boyu süren etkiler gibi sorunlara neden olurlar. Bu nedenle bu hastalıklar için erken tanı önemlidir. Tedavisi olmasa bile özgün tanının konulması, kalıcı nörolojik etkilerden kurtulmasını ve çoğu zaman hayatta kalabilmesini, ayrıca ailelerin sonraki çocuklar konusunda bilgi sahibi olmalarını sağlamaktadır [1-3, 6].

Vücut sıvılarındaki metabolitlerin analizi, klinik biyokimyasal laboratuvarlarda en çok yapılan analizlerdendir. En yaygın metabolitlerden birçoğu rutin olarak klasik metotlarla belirlenebilmesine rağmen, yeni yöntem ve metotların geliştirilmesi talep edilmektedir. Yeni tekniklerin önemli uygulamalarından biri de kalıtsal hastalıkların tayini için yapılan metabolit taramasıdır. İdrarda bulunan teşhis edici metabolitlerin analizi, klinik çalışmalarda hastalıkların tanımlanmasına olanak sağlar [7]. Organik asitlerin idrardaki analizi, organik asidürilerin teşhis edilmesinde oldukça büyük bir öneme sahiptir. Çünkü söz konusu hastalıklarda idrarda 100'den fazla organik asit atılımı gerçekleşmektedir [4].

Organik asidürilerin tanısında kullanılan yöntemler GC-MS, GC-MS/MS ve LC-MS/MS'dir [8-11]. Bu yöntemler hem her laboratuvarında bulunmayan pahalı cihazlar, hem de uzun zaman ve işlemler gerektiren ön türevlendirme basamakları içermektedir. Bu tür hastalıkların hızlı teşhisi yanında; hızlı, güvenilir ve ekonomik alternatif analiz yöntemlerinin geliştirilmesi önemlidir.

Etkin bir analitik yöntem olan CE son yıllarda klinik analizlere de uygulanmaktadır [12-14]. Kapiler elektroforez (CE) yüksek ayırma gücü, yüksek etkinlik, kısa analiz süreleri, düşük miktarda elektrolit çözeltisi ve numune ile çalışılabilme gibi avantajlara sahip güçlü bir analitik ayırma ve analiz tekniğidir.  $Li^+$  iyonundan DNA'ya kadar çok geniş bir spektrumdaki türlerin ayrılması ve tayininde kullanılmaktadır. CE'de en çok kullanılan dedektör tipleri UV-absorbans ve floresanstır. UV-dedektör sadece bir kromofor grup içeren organik türler için uygundur. Floresans dedektör ise genellikle biyomoleküllerin hassas tayini için kullanılır. Bu yöntemde de türevlendirme işlemine gerek duyulmaktadır, fakat analitlerin çoğu bu tekniğe uygun değildir.

Son yıllarda, temassız iletkenlik dedektörü ( $C^4D$ ) elektroforetik yöntemler için alternatif bir teknik olarak kullanılmaya başlanmıştır.  $C^4D$ , basit ve yapımı kolay bir cihazdır. Aynı zamanda hassas ve ucuzdur.  $C^4D$  ile elde edilen dedeksiyon limitleri genellikle optik yöntemlerden daha iyidir [15-17]. Aromatik grup içermeyen ve zayıf absorpsiyona sahip türler UV-dedektör ile genellikle indirekt olarak tayin edilebilirler. Bu metot çok hassas değildir ve sınırlı lineer aralığa sahiptir.  $C^4D$  ise indirekt fotometrik dedeksiyondan daha hassas bir yöntem olarak rapor edilmiştir.  $C^4D$  yüklü türler için uygun bir dedeksiyon yöntemidir.

Literatürde, hastalık metabolitlerinin tayininde CE yöntemini kullanan çeşitli çalışmalar vardır [18,19]. Bu çalışmalar CE-UV ve CE-MS yöntemlerini içermektedir. CE diğer yöntemlere göre metabolik hastalıkların tanısında kullanılan hızlı, güvenilir ve ucuz bir analitik yöntemdir [18-20]. C<sup>4</sup>D, UV ve MS ile karşılaştırıldığında daha ucuz ve yapımı kolay bir dedektördür. Küçük organik asitlerin tayininde CE’de genellikle indirekt UV dedeksiyon yöntemi kullanılmaktadır [21-24]. İdrardaki metabolitlerin tayininde genellikle CE-UV ve CE-MS metotları kullanılmıştır [7,13,14,19,20,25]. Tüma ve ekibi, idrarda oluşan 29 organik asit için, C<sup>4</sup>D ve UV fotometrik dedeksiyon birleşiminden oluşan bir kapiler elektroforez analiz yöntemi geliştirilmiştir. Metot uygulaması gerçek idrar örneklerinde sadece metil malonik asit tayini için yapılmıştır [26]. MA, MMA ve EMA nın eşzamanlı tayini için sadece HILIC yöntemi bulunmaktadır [27]. Literatürde MVA’nın idrarda tayini için sadece CE-UV yöntemi ile yapılmış bir çalışma bulunmaktadır [28]. Sialik asidin biyolojik örneklerdeki tayini için rapor edilen elektroforetik yöntemlerde, sialik asitler CE-UV [29-31], CE-LIF [32], CE-MS/HPLC-ITMS [33], CZE-MS [34] ve CE-AD [35] teknikleri ile belirlenmişlerdir [36].

Metot optimizasyonu için kemometrik deney tasarımı seçilmiştir. Bu sayede seçilen değişkenlerin (faktörler) pik yüksekliği, göç süresi gibi yanıtlar üzerindeki etkileri klasik yöntemlere göre daha verimli ve düşük maliyetle ölçülebilmektedir.

Üç bölümden oluşan bu çalışmada farklı organik asitürilerin tanısı için hızlı, güvenilir ve kolay uygulanabilir metotlar geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın ilk bölümünde etilmalonik asidüri tanısı için idrarda etilmalonik asit tayin yöntemi geliştirilmiştir. İkinci bölümde ise yine nadir görülen asidürilerin eş zamanlı tanısının yapılabilmesi adına malonik, metilmalonik ve etilmalonik asitlerin idrardaki miktarları tayin edilmiştir. Üçüncü ve son bölümde ise idrarda sialik ve mevalonik asit analizleri için yöntem geliştirilmiştir. Tüm çalışmalar kemometrik deney tasarımı ile optimize edilmiş bu sayede birçok değişkenin eş zamanlı etkisi incelenmiş, zaman, maliyet ve madde kullanımı açısından tasarruf sağlanmıştır.

CE-C<sup>4</sup>D ile geliştirilen bu analiz yöntemleri, organik asitlerin vücut sıvılarındaki miktarlarının belirlenmesi dolayısıyla da kalıtsal hastalıkların tespiti amacıyla klinik çalışmalarda kullanılabilecektir.



## **2. KAPİLER ELEKTROFOREZ**

### **2.1 Elektroforezin Tarihsel Gelişimi**

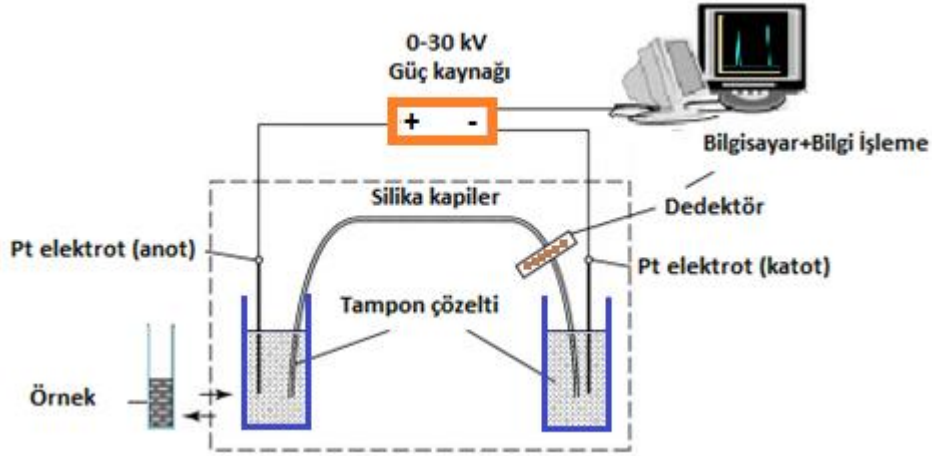
Elektroforez, elektriksel alan altında yüklü taneciklerin farklı hızlarda hareket etmesine dayalı bir ayırma tekniğidir. Taneciğin büyüklüğü ve yükü, göç hızını belirler.

Elektroforezin temel taşları 1900’lerde Kohlrausch çalışması tarafından atılmıştır [37]. Fakat elektroforezin bir ayırma tekniği olarak tanıtılması 1930’larda Tiselus’un insan serumu ayırımı üzerinde yaptığı çalışma ile olmuştur. Dar tüplerde yapılan elektroforetik ayırma çalışmaları ise 1950’de Haglund ve Tiselius tarafından gerçekleştirilmiştir [38]. Modern kapiler elektroforez ise, Jorgenson ve Lukacs tarafından aminoasit ve peptitlerin floresans detektörle ayrılması ile 1981 yılında tanımlanmıştır [38].

Bu ilk çalışmalardan ve ilk ticari cihazın 1988’de piyasaya sürülmesinden sonra, kapiler elektroforezin yüksek performanslı ayırma tekniği olarak güçlü ve kullanışlı bir analiz yöntemi olduğu kanıtlanmıştır [37,38].

### **2.2 Kapiler Elektroforezin Prensipleri**

Elektroforezin enstrümental versiyonu kapiler elektroforezdir. Modern kapiler elektroforez cihazı (CE) iki tampon kabı, bir kapiler, yüksek voltaj kaynağı ve bir detektörden oluşur (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1:** Kapiler elektroforez cihazı şematik gösterimi.

Kapiler elektroforez (CE) yüksek ayırma gücü, yüksek etkinlik, kısa analiz süreleri, düşük miktarda elektrolit çözeltisi ve numune ile çalışılabilme gibi avantajlara sahip güçlü bir analitik ayırma tekniğidir.  $\text{Li}^+$  iyonundan DNA'ya kadar çok geniş bir spektrumdaki türlerin ayrılması ve tayininde kullanılmaktadır.

## 2.3 Elektroforetik Ayırma Prensipleri

### 2.3.1 Elektroforetik mobilité

Bir elektrik alanında yüklü bir taneciğin taşınması santrifüj alandaki bir taneciğin sedimentasyon ile taşınmasına benzer. Yüğü  $q$  olan bir taneciğin elektrik alan kuvveti aşağıdaki eşitlikle verilebilir:

$$F_E = q \cdot E \quad (2.1)$$

Sedimentasyondaki gibi,  $v$  hızıyla hareket eden bir taneciğin sürtünme kuvveti ise;

$$F_S = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \quad (2.2)$$

$\eta$  = çözeltinin viskozitesi

$r$  = iyon yarı çapı

Sabit elektrik alan uygulandığında sürtünme ve elektrik alan kuvveti eşitlik (2.3)'teki gibi dengeye ulaşır. Böylece yüklü tanecikler sabit hızla hareket ederler.

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2.3)$$

Bir iyonun elektroforetik mobilitesi,  $\mu_e$ , birim elektriksel alandaki hız olarak verilir:

$$\mu_e = v / E \quad (2.4)$$

$v$  = İyonun hızı

$\mu_e$  = Elektroforetik mobilite (  $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  )

$E$  = Elektrik Alan ( $\text{Vcm}^{-1}$ )

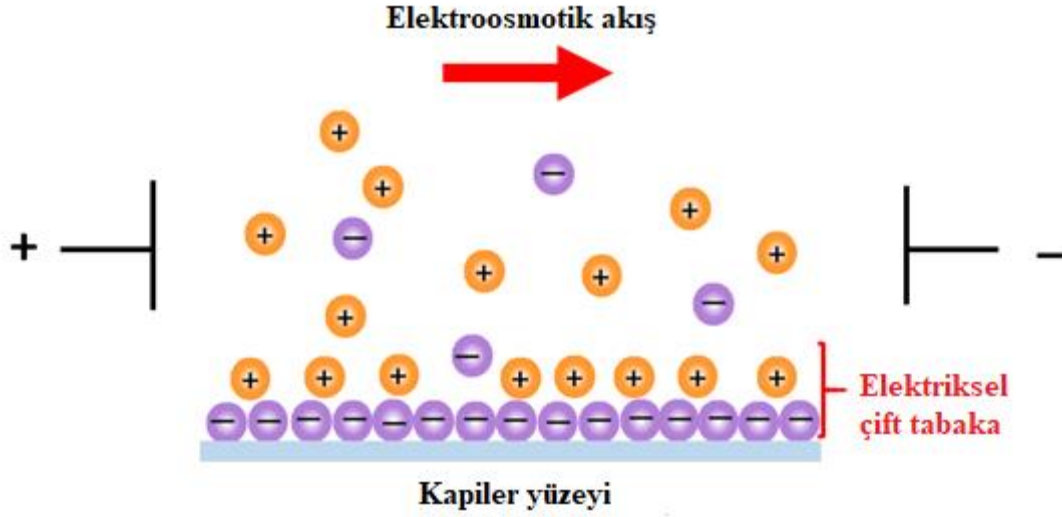
2.3 ve 2.4'teki eşitliklerin bileştirilmesi ve düzenlenmesi ile aşağıdaki eşitlik ortaya çıkar:

$$\mu_e = q / 6 \pi \eta r \quad (2.5)$$

Küçük boyuttaki iyonlar için yük ne kadar büyükse, mobilite büyük olurken; boyutu büyük olan iyonlar için yük ne kadar küçük ise, mobilite de o kadar küçük olur [39,40]. Mobilitayı bu faktörler dışında, sıcaklık ve elektroosmotik akış da etkiler.

#### 2.4 Elektroosmotik Akış

Silika kapilerin iç yüzeyindeki, iyonlaşabilen silanol ( $\text{Si-OH}$ ) grupları pH 3 üzerindeki değerlerde iyonlaşarak negatif yüklü silanoat ( $\text{SiO}^-$ ) gruplarını oluşturur ve böylece iç yüzey negatif yüklerle yüklenmiş olur. Bu şartlarda tampon çözeltideki pozitif yüklü iyonlar, kolon yüzeyindeki eksi yüklere doğru çekilerek burada bir çift tabaka oluştururlar. Kapiler duvarına yakın iç katman genelde statiktir ve iç Stren tabakası olarak adlandırılır. İkinci tabaka negatif yüklere daha uzakta olduğundan sıkıca tutulmaz, daha dağınıktır ve difüze tabaka adını alır. Tabaklar arasındaki potansiyel farkına zeta potansiyeli denir. Uygulanan elektrik alan altında, difüze tabakadaki katyonlar katoda doğru hareket eder ve kendileri ile birlikte çözeltideki molekülleri de sürükleyerek elektroosmotik akışı (EOA) oluştururlar [37,39,41].



**Şekil 2.2:** Elektroosmotik akış oluşumu.

Bir kapilerdeki tampon çözeltiye elektrik alan uygulandığında çözelti kapiler kolon boyunca akar. Bu akış elektroosmotik akış (EOA) olarak isimlendirilir. Elektroosmotik akış aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

$$\mu_{\text{EOA}} = \epsilon \zeta / 4 \pi \eta \quad (2.6)$$

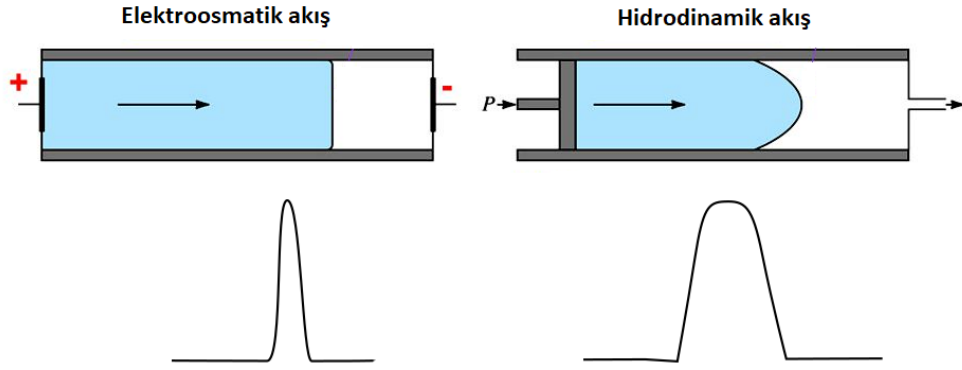
$\epsilon$ =tamponun dielektrik sabiti

$\eta$  = tamponun viskozitesi

$\zeta$  = zeta potansiyeli

Deneysel olarak EOA hızı nötral (aseton, mesitil oksit veya formamid) bir maddenin göç hızının ölçülmesi ile belirlenir. EOA elektrolit viskozitesi ile ters orantılı, dielektrik sabiti, uygulanan elektrik alan ve zeta-potansiyeli ile doğru orantılıdır [32].

Tüm çözelti molekülleri kapilerdeki kesitli pozisyonlarından bağımsız olarak, EOA tarafından sağlanan sabit bir hızda hareket ettiklerinden, EOA düz bir profile sahiptir. Bu aynı zamanda moleküllerin yüksek verimliliğe sahip dar bantlar oluşturmalarını sağlar. Bir tüp içinde basınç etkili akışla hareket eden moleküllerde ise (sıvı kromatografide olduğu gibi), tüpün merkezindeki maddelerin duvara yakın olanlara göre daha hızlı hareket ettiği ve sonuç olarak parabolik bir akışa ve geniş piklere yol açtığı görülür (Şekil 2.3) [37,42].



**Şekil 2.3 :** a) Elektroosmotik akış dedektör cevabı  
b) Parabolik akış dedektör cevabı.

#### 2.4.1 Elektroosmotik akışı etkileyen faktörler

EOA'nın hızı ve yönü kapilerin yüzey yüküne ve tampon parametrelerine bağlıdır. EOA'yı değiştirmek için organik çözücü ve modifiye edici maddeler (yüzey aktif madde, polimer v.b.) eklemenin yanında tamponun pH değeri ve iyonik şiddet de değiştirilir.

Tamponun pH değeri, elektrik alan, sıcaklık arttırıldığı zaman EOA artar. Tampona organik çözücü ilavesi, tamponun konsantrasyonu ve iyonik şiddetinin arttırılması ile de EOA azalır.

Kapiler duvarının kalıcı ya da geçici kaplanması ile de EOA değiştirilebilir. Kapiler kolon iç duvarının kovalent bağ yoluyla kalıcı olarak kaplanması için poliakrilamid, polietilenglikol veya polisakkaritler gibi uygun bir madde kullanılır [37,43]. Kapiler kolonun kaplandığı polimerik maddenin hidrofilik ve hidrofobik olmasına göre elektroosmotik akış hızı yavaşlayabilir, yok olabilir veya tersine çevrilebilir [43].

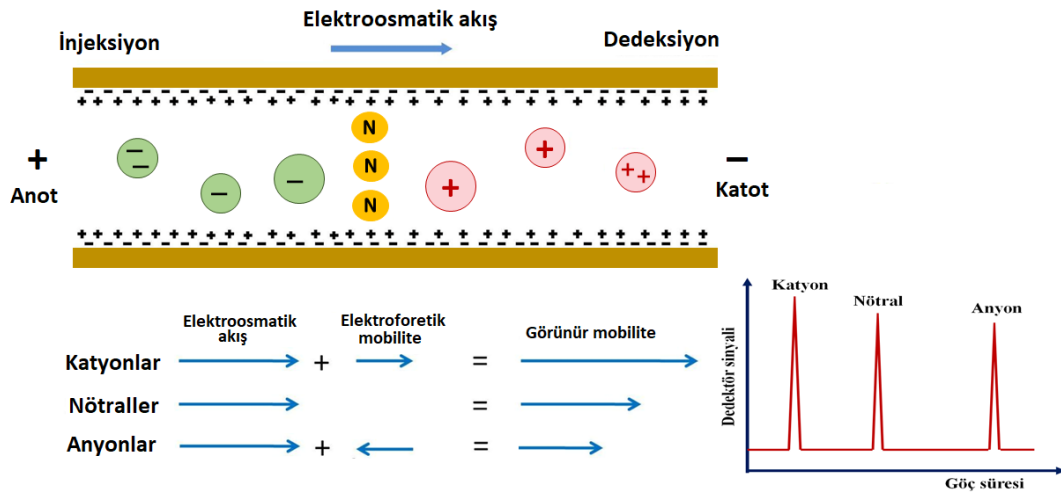
Tampon çözeltisine modifiye edici bir madde eklenerek dinamik kaplama yapılması ile daha kolay bir şekilde kapiler duvarının modifikasyonu sağlanabilir. Anyonik veya katyonik yüzey aktif maddelerin eklenmesiyle EOA hızı artırılabilir veya azaltılabilir. Anyonik yüzey aktif maddeler EOA'yı artırır. Katyonik yüzey aktif maddeler ise EOA'yı azaltır ve ters çevirirler. Aynı zamanda nötral hidrofilik polimerler kapiler duvarına adsorbe olur, kapiler yüzeyi yükünü koruyarak ve viskoziteyi artırarak EOA azalmasını sağlarlar [37,43,44].

## 2.4.2 Analitlerin elektroforetik mobiliteleri

Analitin görünen elektroforetik mobilitesi ( $\mu_g$ ), hem elektroforetik mobiliteye hem de elektroosmotik akışa bağlıdır [42]. Elektroforetik mobilité, iyonik türlerin tümüyle iyonik halde ve sonsuz seyreltilikte sahip oldukları büyüklüktür. Gerçek koşullarda, bu değér etkin elektroforetik mobilité ( $\mu_e$ ), olarak isimlendirilir.  $\mu_e$  ortam pH' ına ve tampon bileşimine bağlıdır [41,45]:

$$\mu_g = \mu_e + \mu_{eo} \quad (2.7)$$

EOA'ın katoda yönlendiğı silika kapilerde, etkin hızları EOA akış ile aynı yönde olan katyonlar dedektöre en önce ulaşır. Ardından nötral moleküller EOA akış ile hareket ederek gelir. Son olarak, EOA ile ters yönde hareket ettiklerinden, anyonlar gelir (Şekil 2.4). Genellikle EOA'nın etkisi ile katyonik, nötral ve anyonik analitler tek bir analizde birbirlerinden ayrılabilirler.



Şekil 2.4: Elektroosmotik akış varlığında analitlerin geçişi ve görünür mobiliteleri.

## 2.5 Kapiler Elektroferez Cihaz Bileşenleri

CE tampon kabı, örnek kabı, bir kapiler, yüksek voltaj kaynağına bağlı iki elektrot, bir dedektör ve veri toplama cihazı içermektedir (Şekil 2.1). Elektroforetik ayırmaları gerçekleştirmek için kapiler uygun bir tamponla doldurulur ve iki ayrı tampon kabına daldırılır. Genellikle anodik uçtaki tampon kabının geçici olarak değiştirilmesi ile örnek kapilere hidrodinamik ya da elektrokinetik olarak verilir. Kapilere yüksek voltaj uygulandığı zaman analitler mobilitelerine göre göç etmeye başlarlar.

### 2.5.1 Kapiler kolon

Kapiler elektroforezde erimiş  $\text{SiO}_2$ 'den oluşan silika kapiler, cam veya plastik kapiler kolon kullanılır. İç çapı 25-100  $\mu\text{m}$ ; dış çapı ise 150-520  $\mu\text{m}$  arasında değişen silika kapiler kolon kullanılabilir. Kapiler iç çapı ve kapiler uzunluğu ayırma etkinliğinde ve göç zamanlarında değişikliklere sebep olabilir. Kapiler kolon ilk kullanımdan önce 1 M NaOH daha sonra ise su ve analizde kullanılacak tampon çözelti ile yıkanır. Bu yıkama işlemi ile kapiler kolon duvarındaki silanol grupları iyonlaşarak kapiler iç yüzeyi dengeye gelir. Yapılan bu işleme kapilerin şartlandırılması denir [46,47].

### 2.5.2 Enjeksiyon yöntemleri

#### 2.5.2.1 Hidrodinamik

En çok kullanılan enjeksiyon çeşidi hidrodinamik enjeksiyondur. Örnek basınç ile kapilere alınır. Bunun için

- Örnek kısmına kontrollü basınç uygulanabilir
- Dedektör kısmına vakum uygulanabilir
- Örnek kabı yükseltip seviye farkı yaratılarak sifon etkisiyle örnek alınabilir [48].

#### 2.5.2.2 Elektrokinetik

Elektrokinetik enjeksiyon elektrotun kısa bir süre örnek kabına alınarak kontrollü ve çalışma voltajından daha düşük bir voltaj uygulanması ile gerçekleştirilir. Enjeksiyon için uygulanan voltaj çalışma voltajından daha düşüktür. Kapiler jel elektroforezde kullanılabilir. Enjeksiyon süresi ve uygulanan voltajın değiştirilmesiyle kapilere alınan örnek miktarı kontrol edilebilir [48].

#### 2.5.2.3 Örnek sıkıştırma

CE de, örnek sıkıştırma teknikleri dedeksiyon hassasiyetini arttırmak için kullanılmaktadır. Örnek sıkıştırma yönteminin temeli numune bölgesi ile çalışma tamponu arasındaki elektrik alan farklılıklarına dayanır. Bu elektrik alan farkı ile çözeltiler arasında iletkenlik farkı meydana gelir [49,50].

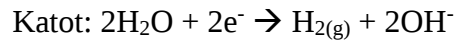
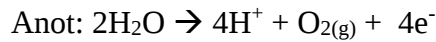
Numune matrisinin iletkenliği çalışma tamponunkinden önemli ölçüde düşük olduğuunda numune bölgesi sıkıştırılır. Düşük iyonik güce sahip numunelerde, ařırđ pik genişlemesi olmadan numune hacmi çok daha büyük olabilir.

Sıkıştırma yönteminde hidrodinamik veya elektrokinetik enjeksiyon kullanılabilir [41,51]. Elektrokinetik sıkıştırmanın dezavantajđ, eklenen numune iyonlarının miktarının büyük ölçüde gerçek numune iletkenliğine bağlı olmasıdır. Bu iletkenlik kontrol edilemediği zaman sonuçlar güvenilmez olmaktadır. Bu nedenle hidrodinamik sıkıştırma yöntemleri daha sık uygulanmaktadır. Bu yöntemde, zaman kontrollü bir basınç farkđ ile düşük iletkenliğe sahip bir numune çözeltisinden uzun bir bölge halinde kapilere verilir. İletkenlik farkđ nedeniyle, analit bölgesi, elektrik alan uygulandıktan sonra ayırmanın ilk aşamasında sıkıştırılarak keskin pikler elde edilir.

Numunenin iletkenliği beklenildiği kadar düşük olamadđında, ayırma gücü bu durumdan etkilenir, ancak pik alanları hala güvenilirdir. Ayırma etkinliği bozulmadan sıkıştırma işlemi numune iletkenliğinin st sınırına bağlıdır. Bununla birlikte, başka sınırlamalar da vardır. Öncelikle numune bölgesindeki Joule ısınması dikkate alınmalıdır. Numune matrisinin iletkenliği tamponunkinden çok daha düşük ve numune bölgesi de kısa olduğuunda ısı oluşumu önemlidir ve bu durum sıkıştırma işlemini etkiler. Bu kısımda bahsedilen, örnek sıkıştırma yöntemi uygulama kolaylığı ve geniş kullanım alanđ ile en çok uygulama alanına sahip örnek sıkıştırma yöntemidir [41,52].

### 2.5.3 Elektrot

Elektrot olarak platin elektrotlar tercih edilir. Elektrotlarda suyun ayrışma reaksiyonları gerçekleşir. Anotta ve katotta oluşan reaksiyonlar sırası ile aşağdaki gibidir:



### 2.5.4 Voltaj kaynağı

Kapiler elektroforezde çalışma voltajđ genel olarak en fazla 30 kV olmaktadır. Uygulanan voltaj artarsa elektroosmotik akış da artar. Analit g sürelerinin tekrarlanabilirliği için voltajđn sabit olması önemlidir [46,47].

### 2.5.5 Dedeksiyon çeşitleri

CE’de dedeksiyon genellikle optik yöntemlerle (absorpsiyon ve floresans) gerçekleştirilir. Elektrokimyasal dedektörler (iletkenlik, potansiyometrik ve amperometrik) optik cihazlardan ucuz, küçültülmesi kolay ve yapımı daha basittir. Temassız iletkenlik dedektörü, CE’de alternatif bir yöntem olarak oldukça büyük ilgi görmektedir. Seçicilik ve hassiyetle ilgili olarak elektrokimyasal dedektörlerin avantajları pek çok uygulama ile gösterilmiştir [53-55]. Temassız iletkenlik dedektörünün avantajı tüm küçük inorganik ve organik moleküllerin tespitinde kullanılabilir. Aynı zamanda 10 µm’den küçük iç çapa sahip kapiler kolonlarda ayırma yapmak için de uygundur. Dedeksiyon limiti genellikle mikromolar aralığında olmaktadır. Ayrıca kütle spektrometresi CE ile birleştirilerek yapısal karakterizasyon ve ayırma için de kullanılmaktadır [54].

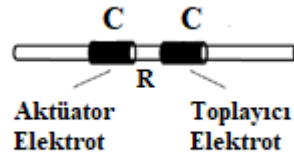
#### 2.5.5.1 İletkenlik dedektörü

Potansiyometrik ve amperometrik dedeksiyondan farklı olarak, bu yöntem elektrot yüzeyinde oluşan elektrokimyasal tepkimelere dayanmaz, iki elektrot arasındaki çözeltinin iletkenliğini ölçer. Geleneksel iletkenlik dedektöründe, elektrotlar sıvı ile doğrudan temas halindedir. Bu durum polarizasyon etkisi, elektrokimyasal erozyon ve elektrot kontaminasyonuna sebep olur. Bununla birlikte, ayırma kolonlarının iç çaplarıyla uyumlu boyutlarda hücreler üretilmesinde zorluk yaratmaktadır. Bu dezavantajlar geleneksel temaslı iletkenlik dedeksiyon tekniklerini sınırlandırmaktadır. Bahsedilen bu sorunların aşılması için temassız iletkenlik dedektörü geliştirilmiştir.

1998’de kapiler elektroforez için temassız iletkenlik dedektörü (C<sup>4</sup>D) iki bağımsız araştırma grubu olan Zeman ve ark. ile da Silva ve do Lago tarafından tanıtılmıştır [57,58]. Bu iki çalışmayı daha sonra cihazın kullanımını kolaylaştırmak, mevcut cihazlara kolaylıkla bağlayabilmek, hassasiyetini ve uygulamalarını arttırmak için birkaç yayın daha takip etmiştir[54].

Temassız iletkenlik dedektörü bir sinüs dalga üretici, bir akım-volaj dönüştürücü, bir doğrultucu (alternatif akımı doğru akıma çevirmek için) ve sinyalin genliğini belirlemek için gerekli bir devreden meydana gelir. Elektrotların sıvı ile direk teması gerekmez. Temassız iletkenlik dedektörünün temel prensibi, örnekleri değişken bir

kapasitörün parçası olarak kullanılmaktadır. Dedektör elektrotları, elektrik alanını ileten kapiler kolonlara bağlanır. Dedektör hücresi 2-30 mm uzunluğundaki boru şeklindeki iki elektrottan oluşur (Şekil 2.5). Bu elektrotlar aralarında 1-5 mm boşluk bulunacak şekilde kapiler etrafında yan yana yerleştirilmiştir. Genellikle iki elektrot arasındaki direkt kapasitif bağlantıdan ve istenmeyen arkaplan sinyallerinden kaçınmak için bir Faraday kafesi kullanılır. Harici elektrotlar kapiler içindeki elektrolit ile iki kapasitör oluşturur ve elektrotlar arasındaki boşlukta çözeltinin elektrik iletkenliği ölçülür [54,58].



**Şekil 2.5:** Basitleştirilmiş şematik devre gösterimi.

Geleneksel temassız iletkenlik hücresinin devresi çözelti direnci  $R$ 'ye bağlı çift katmanlı iki kapasitans,  $C$ 'nin düzenlenmesiyle temsil edilebilir. Böyle bir devreden geçen akım,  $I$ , aşağıdaki formülle hesaplanabilir:

$$I = \frac{V}{\sqrt{R^2 + \left(\frac{l}{2\pi fC}\right)^2}} \quad (2.7)$$

Burada akımın uygulanan alternatif voltaja ( $V$ ) ve frekansa ( $f$ ) bağlı olduğu görülmektedir. Düşük frekanslarda, akım sınırlandırılır. Yüksek frekanslarda ise akım sadece çözelti direnci ile belirlenir. Pratikte, 100 kHz'ten yüksek frekanslar uygulanır ve 300kHz optimum değer olarak kabul edilir [58].

İkinci elektrot tarafından toplanan alternatif akım sinyali kaydedilebilir bir doğru akım sinyali elde etmek için değiştirilir. Analogdan dijitale çevrimde en iyi sonucun alınabilmesi için, ölçülen sinyali yükseltmeden önce arka plan sinyali elektronik olarak bastırılmalıdır ("offset" veya "sıfırlama"). Kapiler elektroforezde çalışma elektroliti (BGE) nedeniyle sinyal her durumda mevcuttur. Tamamen iyonlaşmış çoğu analit BGE çözeltisi içinde analiz edilir ve dedektör cevabı temelde analit ile BGE arasındaki molar iletkenlik farkından dolayı elde edilir. Bu sebeple hem negatif hem de pozitif pikler elde etmek mümkündür [54].

Temassız iletkenlik dedektörleri eşzamanlı ölçümler için diğer dedektörlerle birleştirilebilir. Çalışmalar, UV-absorpsiyon dedeksiyonu ile C<sup>4</sup>D'ün birleştirilerek UV-absorplayan ve absorplamayan türlerin birlikte tayin edilebileceğini göstermiştir [54,58].

## **2.6 Kapiler Elektroforez Çeşitleri**

### **2.6.1 Kapiler zon elektroforez (CZE)**

Kapiler elektroforezin en çok kullanılan ve en temel basit formudur. Kapiler, tampon çözelti ile doldurulur. Örnek kapilere enjekte edildiğinde elektrik alan uygulanır ve çözeltiler kapilerde farklı zonlar oluşturarak hareket eder. Farklı hızlarda hareket eden bu zonların göç hızları da farklı olur ve bu sayede ayırım gerçekleşir. Hem anyonik hem de katyonik türler yük-boyut oranlarına göre aynı anda ayrılabilir. Fakat nötral türler birbirlerinden ayrılamaz [37,42].

### **2.6.2 Kapiler jel elektroforez (CGE)**

Bu teknikte genellikle büyük biyomoleküller molekül büyüklüklerine göre ayrılırlar. Bu ayırım, moleküllerin uygun bir polimer matris içinen geçirilmesi ile sağlanır. Büyük olan moleküller jelden daha yavaş geçer. CZE ile karşılaştırıldığında, CGE'de metrede 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> plaka sayısı ile ayırmacılığı daha fazladır [42].

### **2.6.3 Kapiler izotakofrez (CITP)**

CITP'de örnek, mobilitesi farklı iki tampon arasına enjekte edilir. Voltaj uygulandığında, iki farklı tampon arasında analitlerin konsantrasyonları ile orantılı boylarda zonlar oluşur [37].

### **2.6.4 Kapiler izoelektronik odaklama (CIEF)**

Protein ve peptid gibi türlerin farklı izoelektrik noktalarının (pI) olmasına göre ayırımları gerçekleştirilir. Kapiler, içerisinde bir pH gradienti oluşturacak şekilde çözelti ve amfiprotik tür karışımı ile doldurulur ve her analit kendi pI değerinde odaklanır. pI değerleri arasında 0,005 ve daha az fark olan proteinlerin ayrılmasında dahi kullanılabilen bir tekniktir [37,42].

### **2.6.5 Kapiler elektrokromatografi (CEC)**

CEC, elektroforez ve HPLC yöntemlerinin birleşiminden oluşan hibrit bir tekniktir. CEC’de hareketli faz, mikro kolon boyunca basınç yerine elektrik alan sayesinde EOA ile birlikte akar. CEC, CE’den ayırımın sıvı ve katı faz arasındaki kromatografik dağılımla gerçekleşmesi ile keskin bir şekilde ayrılır [58,59].

### **2.6.6 Misel elektrokinetik kromatografi (MEKC)**

MEKC, kapiler zon elektroforez ve kromatografinin birleşmesinden oluşan bir tekniktir. Nötral ve yüklü analitlerin eşzamanlı olarak ayrılmasını sağlayan tek elektroforetik yöntemidir. Burada analitlerin miseller (sabit faz) ve tampon çözelti (hareketli faz) arasında farklı dağılımları ile ayırım sağlanır. Tampona yüzey aktif madde ilavesi ile ( genellikle sodyum dodesil sülfat SDS) yüklü miseller oluşturulur ve nötral türlerin ayrılması sağlanır. Analitler, polaritelerine bağlı olarak, miseller ve sulu faz olan tampon çözelti arasında dağılır ve böylece farklı hızda göç ederler. Bu metod genellikle peptid ve proteinlerin ayırımında kullanılır [58,59].

### 3. DENEYSEL TASARIM VE OPTİMİZASYON

Kemometri, kimyasal bir sürecin matematiksel veya istatistiksel olarak çalışılması şeklinde açıklanabilen disiplinler arası bir alandır. Kemometri sadece enstrümantal ve büyük veri analizlerinin yorumlanmasında değil aynı zamanda deneysel tasarımdan sinyal işlenmesine, kalite kontrol ve kantitatif yapı-etki analizlerinin geliştirilmesine kadar bir çok alanda kullanılır. Kemometride, az sayıda deney ile daha fazla bilgi edinilmesi mümkün olmaktadır [60].

Deneysel tasarım 1920'lerde Sir Ronald Fisher tarafından Rothamsted Tarımsal Alan Araştırması Merkezi, Londra'da geliştirilmiştir. İlk deneyler çeşitli gübrelerin farklı araziler üzerindeki etkilerinin incelenmesi ile ilgili olmuştur. Mahsüllerin son durumu sadece gübreye bağlı olmadığından Fisher, deneysel tasarımı gübre etkisini diğer faktörlerin etkisinden ayırabilmek için kullanmıştır. O yıllardan beri deneysel tasarım biyoloji ve tarım alanlarında oldukça geniş yer bulmuş ve uygulanmıştır [61]. Deneysel tasarım, süreci etkileyen faktörler ve sürecin çıktıları arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan sistematik ve etkili bir metoddur. Bu yöntem temelde sebep-sonuç ilişkilerinin araştırılmasını amaçlayan ve yöntem geliştirmede iyileşme sağlayan güçlü bir araçtır [62,63].

CE'de yöntem geliştirme için kullanılan bağımlı değişkenlerden biri de pik yüksekliğidir. Bağımlı değişken üzerinde etkisi olan bağımsız değişkenler ise çalışma voltajı, injeksiyon basıncı ve süresi, tampon bileşeni konsantrasyonu ve pH gibi parametrelerdir. Deneysel tasarım olmadan bu şartların optimize edilmesi adına her seferinde bir değişken sabit tutulmalıdır. Bu yöntemle yapılan metot geliştirmede çok fazla deney gerçekleştirilmesi gerekir. Bu durum fazla yorucu ve zaman alıcıdır.

Yukarıda bahsedilen dezavantajlar deneysel tasarım ile yok edilebilir. Deneysel tasarımda iki ya da daha fazla bağımsız değişken aynı anda analiz edilebilir, değişkenler arası etkileşimler incelenebilir. Böylece deney sayısı en aza indirilir ve yanıtın öngörülebilmesi için matematiksel bir model geliştirilir. Varyans analizi yanıtı belirgin bir şekilde etkileyen faktörlerin belirlenebilmesi için kullanılabilir. Deneysel

tasarım çalışmadan elde edilen bilgiyi maksimize ederken kullanılan zaman ve maliyeti minimize eder.

Deneyisel tasarımın ana prensipleri randomizasyon (rastgeleleştirme), replikasyon ve bloklama'dır.

Randomizasyonun amacı kontrol edilemeyen tüm yabancı varyasyon kaynaklarını ortadan kaldırmaktır. Deneyin uygun bir şekilde rasgeleleştirilmesiyle faktörlerin seviyelerinin gürültü etkilerinden eşit bir şekilde etkilenmesini sağlamaktır. Replikasyon ise deneyin tümünün veya bir kısmının tekrarlanması anlamına gelir. Replikasyon kullanıcı, cihaz vb. hatalarının azaltılmasını, daha kesin sonuçlar elde edilmesini sağlar. Bloklama ise gürültü faktörlerinden kaynaklanan dışsal değişikliklerin etkilerini ortadan kaldırmak ve böylece deneyisel tasarımın verimliliğini artırmak için yapılır. Burada yapılan işlem benzer veya homojen olan deneyisel çalışmaları bloklar veya gruplar halinde düzenlemektir [61].

### **3.1 Yanıt Yüzey Metodu**

Yanıt yüzey metodu, deneyisel tasarım için kullanılan matematiksel ve istatistiksel tekniktir. Amaç, çeşitli faktörlerden (bağımsız değişkenler) etkilenen yanıtı (bağımlı değişken) optimize etmektir. Faktörler farklı değerlerde test edilebilir, bu değerlere de faktör seviyeleri adı verilir.

Bu metotta ilk olarak yanıtı etkileyen en önemli faktörler bulunur. Bunun için tarama tasarımları kullanılır. Tarama tasarımları tam faktöriyel tasarım (FFD) ve kısmi faktöriyel tasarım olarak ikiye ayrılabilir. FFD'de sonuçların analizi için faktör seviyelerinin tüm kombinasyonları test edilir. Diğer taraftan kısmi faktöriyel tasarımda seviyelerin sadece seçilmiş bir alt kümesi kullanılır [22]. Yanıtı etkileyen önemli faktörlerin tespitinin ardından bu faktörlerin optimum değerlerine ulaşmak için merkezi kompozit tasarım (CCD) ve Box Behnken tasarımları (BBD) kullanılır. Bu tasarımlardan elde edilen ikinci derecede model denklemlerden yanıt yüzey grafikleri ve kontur grafikleri elde edilir [64].

#### **3.1.1 Tarama tasarımları**

En çok kullanılan tarama tasarımlarından biri tam faktöriyel tasarımdır. Faktörlerin yanıtı ortak etkilerinin de incelenmesini sağlar. Bir tam faktöriyel tasarım deneyi

bütün faktörler için olası tüm seviye kombinasyonlarını içerir. k sayısında faktör içeren iki seviyeli bir çalışma için gereken tüm deneylerin sayısı,  $2^k$  ile hesaplanır. 2 seviyeli tasarımlarda -1 düşük seviye +1 ise yüksek seviye olacak şekilde kodlama yapılır. Örneğin, 2 faktörlü bir tasarım için  $2^2 = 4$  deney yapılır. Faktör sayısı fazla ise deney sayısı da çok fazla olacağından deney sayısının azaltılabilmesi için kısmi faktöriyel tasarım kullanılabilir. Örneğin, 7 faktörlü bir tasarım için deney sayısı 128'dir.

Tam faktöriyel tasarım özellikle deneysel çalışmanın ilk safhalarında, özellikle de faktör sayısının 4'e eşit veya 4'ten az olması durumunda kullanışlı olmaktadır. İki seviyeli faktörler için yapılan varsayımlardan biri de yanıtın seçilen faktör aralığında doğrusal olduğudur.

Kısmi faktöriyel tasarım, minimum sayıda deneyle ana etkileri ve istenen faktör etkileşimi etkilerinin incelenmesine olanak tanır. Bu tasarımlar genel olarak  $2^{(k-p)}$  ile ifade edilir. Burada k, faktör sayısı  $1/2^p$  ise fraksiyonu temsil etmektedir. Örneğin,  $2^{(5-2)}$ ,  $2^5$ 'in  $1/4$ 'inci fraksiyonudur. Bu durumda, 5 faktör iki seviyeli olarak 32 yerine 8 deney ile çalışılabilecektir. Deney sayısı azaldığından faktörlerin bazı ikili etkileşimleri incelenmeyecektir.

Faktör sayısının 6'dan fazla olduğu durumlarda ise Placket Burman (PBD) tasarımı kullanılabilir. Bu tasarımda ise faktörler arası etkileşim incelenmez, sadece her bir faktörün sonuç üzerindeki etkisi ayrı ayrı incelenir [61,65] .

Deneysel çalışma için etkili olan faktörlerin belirlenmesinden sonra tasarım aşamasına geçilir. Seçilen faktörlerin minimum ve maksimum (kodlu değerler -1 ve +1) değerleri belirlenir. Daha sonra ise kodlanmış seviyeler kullanılarak bir tasarım tablosu meydana getirilir. Kodlanmış değerler yerine faktör seviyelerinin gerçek değerleri koyularak, faktörlerin farklı kombinasyonları ile deneysel çalışmanın gerçekleşmesi sağlanır. Elde edilen sonuçlar matematiksel bir model haline dönüştürülerek yorumlanır. Aşağıdaki sili ve Çizelge 3.2'de 3 faktörlü bir tarama tasarımı için örnek tablolar oluşturulmuştur.

**Çizelge 3.1: Örnek faktör ve seviyeler.**

| Faktörler | Düşük Seviye<br>(-1) | Yüksek Seviye<br>(+1) |
|-----------|----------------------|-----------------------|
| $X_1$     | a                    | b                     |
| $X_2$     | c                    | d                     |
| $X_3$     | e                    | f                     |

a,b,c,d,e,f faktörlerin gerçek değerlerini temsil etmektedir.

**Çizelge 3.2:** Tam Faktöriyel tasarım tablosu.

| Deney Sayısı | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> |
|--------------|----------------|----------------|----------------|
| 1            | -1             | -1             | -1             |
| 2            | +1             | -1             | -1             |
| 3            | -1             | +1             | -1             |
| 4            | +1             | +1             | -1             |
| 5            | -1             | -1             | +1             |
| 6            | +1             | -1             | +1             |
| 7            | -1             | +1             | +1             |
| 8            | +1             | +1             | +1             |

Tarama tasarımları ile faktörlerin etkileri ve hangi faktörlerin yanıt üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu araştırılır. Optimum değerlerin belirlenmesi ise tarama tasarımları ile yapılmaz.

### 3.1.2 Merkezi kompozit tasarım (CCD)

Genellikle merkezi kompozit tasarım olarak anılan, Box-Wilson merkezi kompozit tasarımı, tam faktöriyel veya kısmi faktöriyel tasarım noktalarının yanı sıra modelin eğriliğini belirleyen star (yıldız) noktalarıyla artırılmış merkez noktalarını içerir. Faktörlerin yanıtı olan etkilerinin daha kesin bir biçimde belirlenebilmesi adına merkezi kompozit tasarımda faktör değerleri test edilen faktör seviyelerinden daha küçük veya daha büyüktür. Örneğin iki faktörlü bir tasarımda her faktörün 5 seviyesi bulunur. Bu sayede tasarım daha kesin modeller sunabilir.

Merkezi kompozit tasarımda deney sayısının (N) belirlenebilmesi için kullanılan formül şöyledir:

$$N = 2^k + 2k + 1 \quad (3.1)$$

$$2^k = \text{faktöriyel noktalar}$$

$$2k = \text{star noktalar}$$

$$1 = \text{merkezi noktalar}$$

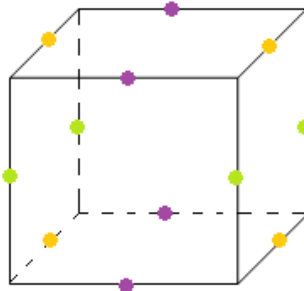
Tasarım alanının merkezinden faktöriyel noktalara olan uzaklık  $\pm 1$  birim ise, tasarım alanının merkezinden yıldız noktalara olan uzaklık  $|\alpha| > 1$ 'dir.  $\alpha$ 'nın kesin değeri tasarımdan beklenen belirli özelliklere ve ilgili faktörlerin sayısına bağlıdır.  $\alpha$  değerinin hesaplanabilmesi için  $\pm \sqrt[4]{2^k}$  formülü kullanılır. Yıldız noktalar her zaman faktörlerin iki katı kadar olur. Yıldız noktalar tasarımdaki faktörler için yeni uç noktaları (maksimum ve minimum) temsil eder. +1 ve -1 faktörlerin seviyelerini, minimum ve maksimum değerlerini gösterir. Merkezi kompozit tasarım dairesel simetriye sahip olan bir tasarımdır. Merkezi nokta orda değerdir ve seviyesi 0 olarak verilir. Bu seviye faktörlerin maksimum ve minimum seviyelerinin ortalamasıdır. Merkezi noktalar 4-6 kez tekrarlanarak deneysel hataların bulunması amaçlanır. Çizelge 3.3'te  $k=2$  için örnek bir merkezi kompozit tasarım tablosu verilmiştir [64-69].

**Çizelge 3.3:** Merkezi kompozit tasarım tablosu.

| Deney No | Faktörlerin Kodlu Değerleri |                    |
|----------|-----------------------------|--------------------|
|          | $X_1$                       | $X_2$              |
| 1        | -1                          | -1                 |
| 2        | -1                          | 1                  |
| 3        | 1                           | -1                 |
| 4        | 1                           | 1                  |
| 5        | $-\alpha (-1,414)$          | 0                  |
| 6        | $\alpha (1,414)$            | 0                  |
| 7        | 0                           | $-\alpha (-1,414)$ |
| 8        | 0                           | $\alpha (-1,414)$  |
| 9        | 0                           | 0                  |
| 10       | 0                           | 0                  |
| 11       | 0                           | 0                  |
| 12       | 0                           | 0                  |
| 13       | 0                           | 0                  |

### 3.1.3 Box-Behnken tasarımı (BBD)

Box-Behnken tasarımı 1980 yılında Box ve Behnken tarafından geliştirilmiş olup ikinci derece yüzey yanıt modellerinin oluşturulabilmesi için kullanışlı bir araçtır. Sadece üç seviyeli olarak gerçekleştirilebilir. Box-Behnken tasarımı faktöriyel veya kısmi faktöriyel tasarımlarını içermediğinden bağımsız ikinci dereceden bir tasarım olma özelliği taşımaktadır. Bu tasarımda işlem kombinasyonları, işlem alanının kenarlarının orta noktalarında ve merkezdedir [23,28]. Bu tasarımın geometrisi işlem alanı içinde bir küp önerir. Genel olarak, Box-Behnken tasarımının yaklaşımı, ikinci dereceden bir yanıt yüzey elde etmek ve ikinci dereceden polinom modeli oluşturmak için kullanılmaktadır. Tasarım tekrarlanan merkez noktalarında (üç deney) ve ilgili bölgeyi tanımlayan kübün her bir kenarının orta noktasında yer alan bölgelerden (oniki deney) meydana gelir (Şekil 3.1) [70].



**Şekil 3.1:** Küp şeklinden elde edilen Box-Behnken tasarım noktaları.

Toplam deney sayısı (N) aşağıdaki formül ile hesaplanabilir:

$$N = k^2 + k + mn \quad (3.1)$$

$k$  = faktör sayısı

$mn$  = merkezi nokta deney tekrar sayısı

Çizelge 3.4'te örnek bir Box-Behnken tasarım tablosu verilmiştir. Bu tasarım merkezi noktanın üç kez tekrar edilmesini de içeren 15 deneyden oluşmaktadır. Tasarım ayrıca her biri iki faktörlü tam faktöriyel tasarımı temsil eden dört deneyli üç bloğa ayrılabilir. Bu tasarımda her bir faktör üç seviye içerir. Bu seviyeler maksimum (+1), minimum (-1) ve orta değer (0) dir [71].

**Çizelge 3.4:** Box-Behnken tasarım tablosu.

| Deney Sayısı | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> |
|--------------|----------------|----------------|----------------|
| 1            | -1             | -1             | 0              |
| 2            | +1             | -1             | 0              |
| 3            | -1             | +1             | 0              |
| 4            | +1             | +1             | 0              |
| 5            | -1             | 0              | -1             |
| 6            | +1             | 0              | -1             |
| 7            | -1             | 0              | +1             |
| 8            | +1             | 0              | +1             |
| 9            | 0              | -1             | -1             |
| 10           | 0              | +1             | -1             |
| 11           | 0              | -1             | +1             |
| 12           | 0              | +1             | +1             |
| 13           | 0              | 0              | 0              |
| 14           | 0              | 0              | 0              |
| 15           | 0              | 0              | 0              |

Toplamda onbeş deney gerçekleştirilir. Sonuç olarak şu eşitlik elde edilir:

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_3x_3+b_4x_1^2+b_5x_2^2+b_6x_3^2+b_7x_1x_2+b_8x_1x_3+b_9x_2x_3+E \quad (3.2)$$

Burada y yanıtı ifade eder.  $b_0$ - $b_9$  regresyon katsayıları,  $x_1$ ,  $x_2$  ve  $x_3$  faktörleri, E ise hata terimini gösterir. Box-Behnken tasarımı eşit aralıklı faktör seviyeleri verir ve bu seviyeler +1, 0 ve -1 olarak kodlanır. Regresyon denklemindeki katsayıların pozitif işaretli olması faktörler arasındaki sinerjetik etkiyi gösterirken, negatif işaret faktörler arasındaki ters sinerjetik etkiyi göstermektedir [72].

Box-Behnken deneysel tasarımı, nispeten az tasarım noktası ve deney ile kapsamlı bir veri kümesi sunmaktadır. Ayrıca bu tasarım, her bir faktör için beş yerine üç seviye kullanması ile diğer tasarımlarla karşılaştırıldığında hem deneysel hem de ekonomik olarak daha fazla avantaja sahiptir [70].

Bu tez çalışmasının ilk bölümünde idrarda etilmalonik asit tayini için üç faktör olarak seçilen tampon konsantrasyonu, tampon pH'sı ve yüzey aktif madde konsantrasyonunun optimum şartlarını belirlemek ve faktörler arası etkileşimlerin etkilerini belirlemek için Box-Behnken tasarımı kullanılmıştır. İkinci bölümde ise malonik asit, metilmalonik asit ve etilmalonik asitlerin idrarda eşzamanlı tayini için

yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla pik yükseklikleri ve ayırım gücü üzerinde tampon konsantrasyonu, tampon pH'sı ve enjeksiyon süresinin etkilerinin incelenmesi için Box-Behnken tasarımı kullanılmıştır. Optimum ayırma koşulları bu tasarım sonucunda belirlenmiştir. Çalışmanın üçüncü ve son bölümünde ise idrarda mevalonik ve sialik asit tayini için yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla önce etkili faktörlerin belirlenmesi için tarama tasarımı kullanılmıştır. Tarama tasarımı sonucu tampon konsantrasyonu, enjeksiyon süresi ve enjeksiyon basıncı değerleri etkili faktörler olarak belirlenmiştir. Ardından yine Box-Behnken tasarımı ile etkili üç faktörün optimum koşulları hesaplanmıştır.



#### 4. METABOLİK HASTALIKLAR

Organik asidüriler veya organik asidemiler (OA'lar), amino asitlerin, karbonhidratların veya lipidlerin katabolizmasında yer alan çeşitli hücresel metabolik yollardan birinde gerekli olan bir enzim veya taşıma proteininin eksikliğinden kaynaklanan kalıtsal metabolik hastalıklardır. [73,74]. Organik asitler bu yollarda fizyolojik ara ürünler olarak ortaya çıktıklarından, hastalarda enzim/protein eksikliği vücutta organik asitlerin büyük miktarda birikimine neden olur; bu fazla metabolitler idrarla atılır. Bu nedenle, bu hastalarda, üriner organik asit profili, bu metabolik hastalık sınıfı için biyomarker olarak tanımlanmış organik asitlerin yüksek atılımını ortaya çıkarır. Bu hastalıklar, ağır hasta çocuklar [73,75] arasında en sık görülen kalıtsal metabolik hastalıklar olarak kabul edilir ve yüksek riskli toplumlarda [74,76] en yaygın doğumsal metabolik hastalık gruplarını oluşturur. Amino asit metabolizmasını, lipid metabolizmasını, pürin ve pirimidin metabolizmasını, üre döngüsünü, Krebs döngüsünü ve yağ asidi oksidasyonunu etkileyen 65'ten fazla organik asidüri tanımlanmıştır. Bunların çoğu otozomal resesif bozukluklardır. Organik asit metabolizmasının doğuştan gelen hatalarının oranı toplam olarak, canlı doğumda 1:3000'e yakındır [77]. Önemli organik asidüriler arasında propiyonik asidüri, metilmalonik asidüri, izovalerik asidüri, akçaağaç şurubu idrar hastalığı (MSUD), glutarik asidüri tip I ve çoklu karboksilaz eksikliği bulunur.

##### 4.1 Malonik Asidüri

Malonil-KoA dekarboksilaz eksikliği 16q23.3 kromozomunda bulunan MLYCD genindeki mutasyon sebebiyle meydana gelir. Nadir görülen otozomal resesif kalıtsal bir yağ asidi metabolizması bozukluğudur. Bahsedilen klinik bulguların büyük çoğunluğunu taşıyan hasta sayısının her yıl arttığı bildirilmiştir. Hastanın beyin omurilik sıvısında da yüksek seviyelerde tespit edilen malonik asit, malonil-KoA dekarboksilaz enzim eksikliğini (MCD) göstermektedir [27,78,79].

Karakteristik fenotipi değişkendir fakat erken çocuklukta gelişim geriliği, nöbetler, hipotoni, ishal, kusma, metabolik asidüri, hipoglisemi, ketozis, genital bölgede

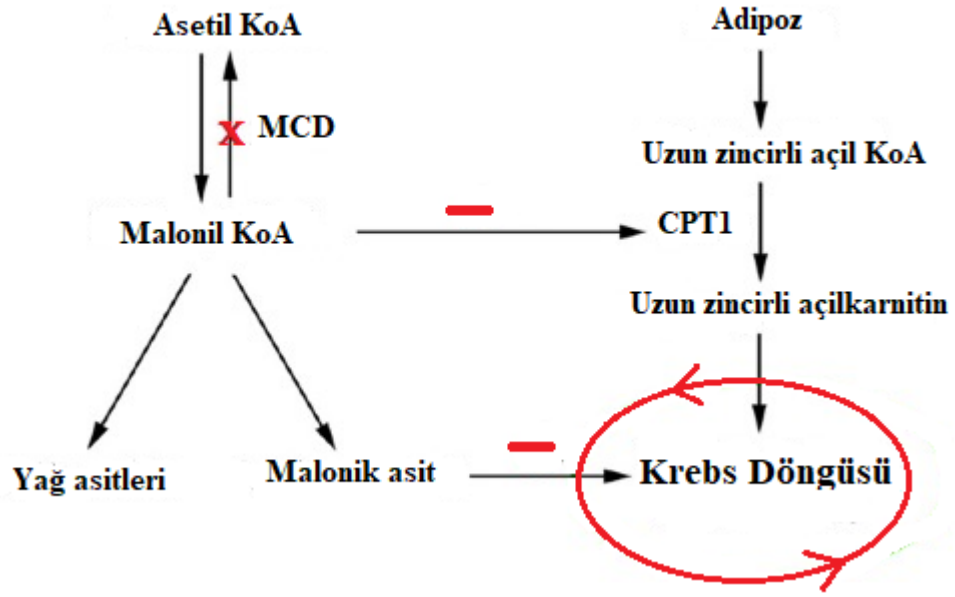
anormallik, böbrek displazisi, idrarda anormal bileşikler, laktik asidüri ve hipertrofik kardiyomiyopati görülebilir. Gelişim geriliği en çok göze çarpanıdır. Kardiyomiyopati ölümlerin başlıca nedenidir. Bazı hastalarda kortikal gelişimde malformasyon ve beyaz cevher tutulumu ile karakterize beyin anormallikleri bildirilmiştir. Yenidoğan taramasında belirlenmemişse, birçok vaka kötü prognozla ilişkili şiddetli metabolik asidoz ve hipoglisemi ile karakterize metabolik dekompanseasyon ile kendini gösterir. Gelişmiş yenidoğan taraması ile daha erken teşhis edilerek tedaviye erken başlamak ve böylece hipoglisemi, bilişsel bozukluk ve kardiyomiyopatinin önlenmesi mümkün olabilmektedir [26,78].

Malonil-KoA dekarboksilaz en fazla kalp kası, ardından iskelet kası, beyin, ince bağırsak, karaciğer, pankreas ve böbrekte görülür. MLYCD için substrat olan malonil-KoA, yağ asidi sentezi ve oksidasyonunda şu iki fonksiyonu sayesinde anahtar rolü oynar:

- 1) Yağ asidi biosentezinde ara madde (asetil-KoA karboksilaz ile malonil-KoA oluşumu yağ asidi biyosentezinin ilk adımıdır)
- 2) Karnitin palmitoil transferaz1 (CPT1) inhibisyonu yoluyla yağ asidi oksidasyonu düzenleyicisi

CPT1'in 3 izoformu vardır: CPT1A karaciğerde, CPT1B ağırlıklı olarak kalp/kas dokusunda bulunur, CPT1C son zamanlarda beyinde bulunmuştur. Malonil-KoA bu izoformları farklı şekillerde inhibe eder. CPT1B (ağırlıklı olarak yağ asitleri sentezinin ihmal edilebilir olduğu kas dokularında bulunur) malonil-KoA konsantrasyonuna karşı 100 kat daha fazla hassastır. Bu bulgular, iskelet ve kalp kası üzerinde malonil-KoA'nın sentetik rolünden ziyade baskın olarak düzenleyici olduğunu ileri sürmektedir. MLYCD aktivitesinin kaybına bağlı malonil-KoA konsantrasyonundaki hafif değişimler, kalp ve kastaki substrat tüketimi ve enerji üretimi üzerinde derin etkiler yaratabilir ve ayrıca MLYCDD'li bireylerde görülen mitokondriyal yağ asidi oksidasyon bozukluklarının fenotipik benzerliklerini açıklayabilir [78].

Şekil 4.1'de malonil-KoA yolağı ile yağ asidi metabolizması ve Krebs çemberine etkisi görülmektedir [80].



**Şekil 4.1:** Malonil-KoA yolağı.

Hücresel malonil-KoA seviyeleri çeşitli enzimlerle kontrol edilir. Malonil-KoA asetil-KoA karboksilaz tarafından üretilir; yağ asidi sentaz, elongaz ve malonil-KoA dekarboksilaz tarafından harcanır. Malonil-KoA'nın fonksiyonel önemi, bu enzimlerin modülatörlerinin terapötik uygulamalara sahip olabileceğini göstermektedir. Memelilerde malonil-KoA dekarboksilaz aktivitesi sitoplazma, mitokondri ve peroksizomlarda görülür ve bu farklı izoformlar tek bir gen tarafından yönetilir [81].

#### 4.1.1 Tanı

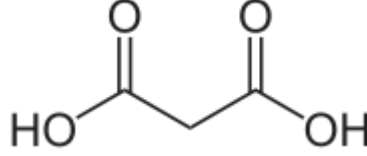
Malonik asidürinin erken tanısı hastalık ve ölüme yol açan kardiyomiyopatinin önlenmesi için önemlidir. Malonik asidüri tanısı kandaki açıl karnitin profillerindeki yüksek malonilkarnitin (C3DC) seviyelerine dayanmaktadır. İdrar organik asit analizlerinde ise yüksek malonik aside rastlanmaktadır [42].

Bazı hastalarda, özellikle hastalığın başında, buna metilmalonik asitteki hafif yükselmeler de eşlik eder. Bu ise, ACSF3 genindeki mutasyonlar sonucu oluşan kombine malonik ve metilmalonik asidüriye benzer. Bu hastalıkta da idrarda bu iki asit seviyesinin artışı görülür [78,82]

Erken çocuklukta işaretleri görülmeye başlar. Diğer belirtiler katoasidoz (kanın aşırı asidik olması), distoni (istemsiz kas gelişimi), hipotoni, gelişim geriliği, yetersiz kilo,

hipoglisemi, koma ve mikrosefalidir. Diğer hastalar ise yetişkinliğe kadar belirti göstermeyebilir. Bu bireyler genellikle nöbet, hafıza kaybı, düşünme kapasitesinde düşüş gibi nörolojik problemlere veya psikiyatrik hastalıklara sahip olmaktadır.

Malonik asit, (propandioik asit) molekül ağırlığı  $M_A = 104,0615$  g/mol olan  $pK_{a1} = 2,83$   $pK_{a2} = 5,69$  değerlerine sahip bir dikarboksilik asittir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2:** Malonik asit moleküler yapısı.

Sağlıklı insan idrarındaki normal malonik asit seviyeleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1:** Sağlıklı bireylerin idrarında malonik asit seviyeleri.

| Dönem       | Malonik asit<br>(mmol/mol kreatinin) |
|-------------|--------------------------------------|
| Çocukluk    | 0,00-2,00                            |
| Yetişkinlik | 2,00-3,50                            |

#### 4.1.2 Tedavi

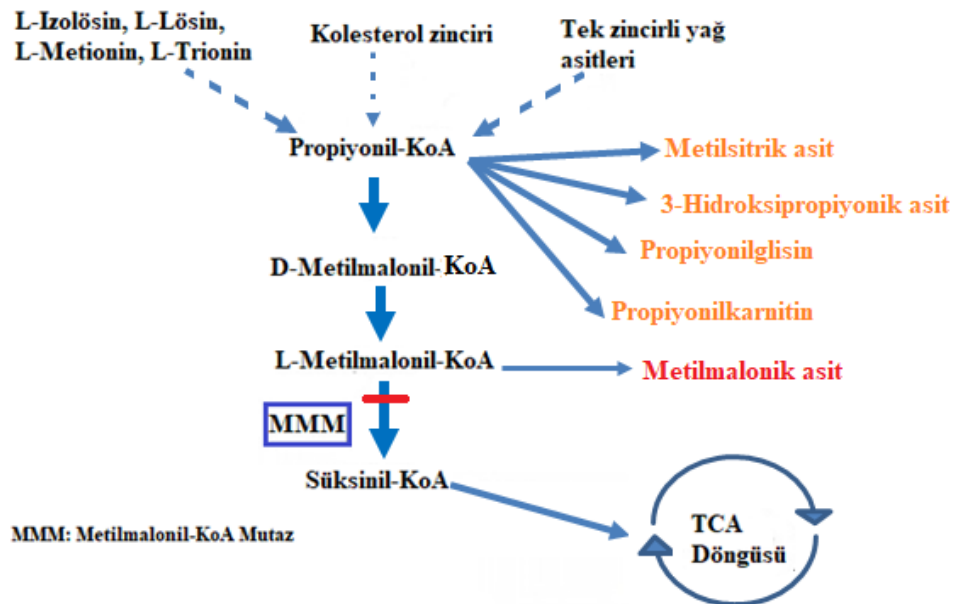
Henüz MLYCDD için tedavi rehberi bulunmamaktadır. Yağ asidi oksidasyonu bozukluklarındaki gibi, yüksek karbonhidrat ve düşük yağlı bir diyet önerilmektedir. Kardiyomiyopati için ACE inhibitörleri ve beta-blokerleri kullanılır. Buna ek olarak, karnitin takviyesi, sekonder karnitin eksikliğinin giderilmesi ve kardiyomiyopati ile kas güçsüzlüğünün giderilmesi için gerekli olabilir [78].

Celato ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ilk kez yeni doğan taraması ile hastalık teşhis edilmiş ve asemptomatik dönemde tedaviye başlanmıştır. Tedavisi için erken tanı yapılan (doğumdan 8 gün sonra) bir erkek bebeğe diyet terapisi (yüksek karbonhidrat, düşük uzun zincirli yağ asidi ve orta uzun zincirli trigliserit ilaveli, L-karnitin takviyesi) uygulanmıştır. Tedaviye erken başlanması metabolik değişikliklerde bir iyileşme sağlamış ve neredeyse normal bir klinik duruma geçilmiştir [83].

Ersoy ve arkadaşları 2017’de yaptıkları bir çalışmada geç tanı koyulan 1 yaşında bir erkek hastaya karnitin, düşük yağ, yüksek karbonhidrat içerikli diyet uygulayarak hastalığın gerilemesinde oldukça etkili sonuçlar elde etmişlerdir [80].

#### 4.2 Metilmalonik Asidüri

Metilmalonil-KoA mutaz, MUT geni tarafından kodlanır. Bu gendeki mutasyon, propiyonat metabolizmasına ait otozomal resesif kalıtsal bir hastalık olan metilmalonik asidüriye neden olur. İzolösin, treonin, metionin, valin ve tek zincirli yağ asidi katabolizması propionil-KoA oluşturur. Propionil-KoA da metilmalonil-KoA aracılığıyla indirgenerek Krebs döngüsüne katılır. Bu hastalıkta mitokondri içinde metilmalonil- KoA’dan süksinil-KoA oluşumunda bozulma vardır. Burada görevli olan enzim metilmalonil-KoA Mutaz (MCM) ve koenzimi adenozil kobalamindir. Enzim bozulmasında metilmalonil- KoA artar ve hidrolize olması sonucu metilmalonik asit (MMA) oluşur. Böylece kanda, idrarda, beyin-omurilik sıvısında (BOS) metilmalonik asit yükselir. MCM enzimini kodlayan gen 6. kromozom kısa kolunda bulunmaktadır (6p21.2-p12) ve buradaki farklı mutasyonlar hastalığın nedeni olarak görülmektedir. Metilmalonil-KoA mutaz ya tamamen (mut0) ya da kısmen eksik (mut) olabilir. Bunun yanı sıra metilkobalamin metabolizmasına sahip bazı hastalıklar sonucunda da metilmalonik asidüri görülebilmektedir. Şekil 4.3’te metilmalonil-KoA mutaz eksikliği görülmektedir [84-86].



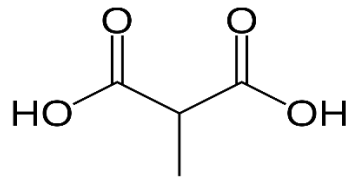
Şekil 4.3: Metilmalonik asidürde metilmalonil-KoA mutaz eksikliğini gösteren metabolik yol.

Metilmalonik asidürinin farklı fenotipleri vardır. Ağır formları yeni doğan döneminde ilk hafta içinde ortaya çıkıp erken dönemde ölümle sonuçlanırken, hafif formları erişkin döneme kadar bulgu vermeyebilir. Genellikle yaşamın ilk yıllarında kusma, beslenme güçlüğü, letarji, dehidratasyon ve şiddetli metabolik asidozla başlar. Nörolojik bulguları nöbetler, hipotoni, hareket bozuklukları, gelişim geriliği, zeka geriliği ve dispraksiyi (motor planlama bozukluğu) içerir. Genel olarak klinik bulgular hızlı bir şekilde ilerler ve enfeksiyonlar ile birlikte hastalıkta bir artış olur. Metilmalonik asidüri bulunan hastalarda optik sinir tutulumu nadiren görülmektedir. Yapılan bir çalışmada kardiyomiyopati geliştiren üç metilmalonik asidüri hastası belirlenmiştir [87-89].

#### 4.2.1 Tanı

Metilmalonik asidüri, metilmalonil-KoA ve metilmalonik asidin aşırı birikimi ile belirlenir. Tipik metilmalonik asidüri klinik olarak letarji, kusma, hipertoni, biokimyasal olarak ise akut ataklar sırasında hiperamonyemi ve ketoasidoz ile ilişkili metilmalonik asidin doku ve sıvılarda birikimi ile karakterizedir. Hasta yönetimindeki gelişmelere rağmen, hayatı tehdit eden ataklar, böbrek ya da nörolojik komplikasyonlar hala metilmalonik asidüri hastaları için kesindir [85,90].

Metilmalonik asit, (2-metil propandioik asit) molekül ağırlığı  $M_A = 118.091$  g/mol olan  $pK_{a1} = 3,07$ ,  $pK_{a2} = 5,79$  değerlerine sahip bir dikarboksilik asittir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4:** Metilmalonik asit molekül yapısı.

Çizelge 4.2’de tabloda, metilmalonik asidürinin fenotiplerinde ve enzimatik alt tiplerinde sağlık birey idrarındaki MMA konsantrasyonları verilmiştir [91].

**Çizelge 4.2:** Metilmalonik asidüri fenotiplerinde ve enzimatik alt tiplerinde sağlıklı birey idrarındaki MMA konsantrasyonları.

| <b>Metilmalonik Asidüri Fenotipleri/Enzimatik Alt Tipleri</b>                                                  | <b>İdrardaki Metilmalonik Asit mmol/mol kreatinin</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Çocuk/B <sub>12</sub> duyarlı olmayan                                                                          | 1000-10000                                            |
| B <sub>12</sub> duyarlı                                                                                        | 10-100                                                |
| İyi huylu/yetişkin metilmalonik asidüri<br><i>mut</i> <sup>0</sup> , <i>mut</i> <sup>-</sup> , <i>cblB</i>     | 10-100                                                |
| Metilmalonil-KoA epimeraz eksikliği<br><i>cblA</i> , <i>cblD</i> -MMA<br><i>cblB</i> , <i>mut</i> <sup>-</sup> | 50-1500                                               |
| Sağlıklı birey (bebek)                                                                                         | 0,00-79,00                                            |
| Sağlıklı birey (çocuk)                                                                                         | 1,00-11,00                                            |
| Sağlıklı birey (yetişkin)                                                                                      | 0,7-3,5                                               |

#### 4.2.2 Tedavi

Tedavi için düşük proteinli bir diyet, belirli ilaçlar, antibiyotikler ve bazı durumlarda karaciğer ve böbrek nakli uygulanır. Metilmalonik asidürinin bazı cevap veren alt türleri için B<sub>12</sub> vitamini de verilebilmektedir [92].

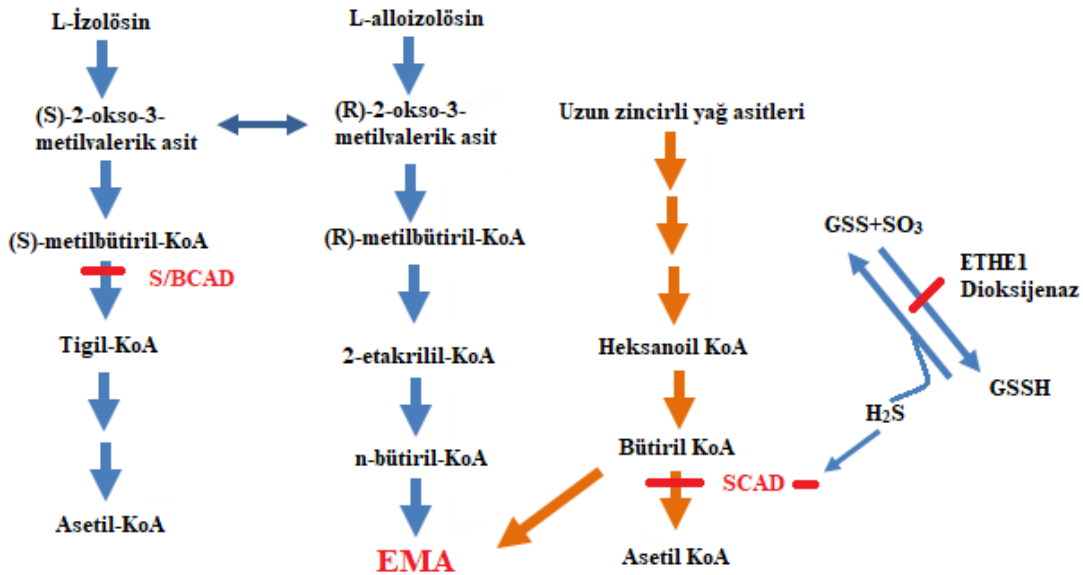
Wesół-Kucharska ve arkadaşları yaş ortalaması 1,5-2 arasında olan 5 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada hidroskobalamin (damar yolu ile verilen B<sub>12</sub>) kullanmışlardır. Bu sayede serum ve idrarda metilmalonik asitte azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca uygun diyet programı, B<sub>12</sub> vitamini ve L-karnitin kullanımının devamı ile hastalarda organ bozuklukları çok nadir görülmüş metabolik dengesizliklere ise hiç rastlanmamıştır [93].

Mc Guire ve arkadaşları hastalık tedavisinde karaciğer ve böbrek naklinin etkilerini incelemişlerdir. Serum ve idrardaki metilmalonik asit miktarlarında önemli ölçüde azalma gözlenirken nörolojik bozulmalar devam etmiştir [84].

### 4.3 Etilmalonik Asidüri

Etilmalonik asidüri, dikarboksilik asit ve etilmalonik asit (EMA) birikimiyle karakterize fizyolojik bir rahatsızlıktır. EMA bütirat karboksilasyonu sonucu oluşur. EMA'nın aşırı üretimi ise yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonundaki enzimatik bozukluklar veya izolösin gibi dallanmış zincirli amino asit sentezlerindeki aksaklıklar sebebiyle meydana gelir. Etilmalonik asidüri, kısa zincirli açıl-KoA dehidrojenaz eksikliği, multipl açıl-KoA dehidrojenaz eksikliği ve etilmalonik ensefalopati gibi çeşitli metabolik hastalıklarda gözlemlenmektedir [94,95].

Etilmalonik ensefalopati, ETHE1 genindeki mutasyon nedeniyle meydana gelen nadir görülen otozomal resesif geçişli mitokondriyal bir hastalıktır. Hastalık geni 19q13 kromozomu üzerinde bulunur. ETHE1 geni ürünü olan sülfür dehidrojenaz ETHE1'deki (ETHE1-SDO) bozulan aktivite çeşitli dokularda hidrojen sülfür ( $H_2S$ ) birikmesine yol açar.  $H_2S$  oluşumu kısa zincirli açıl-KoA dehidrojenaz ve sitokrom c oksidaz aktivitelerini engelleyerek C4 ile C5 açıl-karnitin seviyelerinde artışa ve etilmalonik asidüriye sebep olur [95,96]. Şekil 4.5'te etilmalonik asidüri için metabolik yollar verilmiştir.



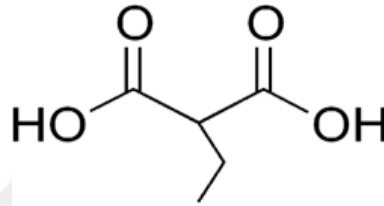
Şekil 4.5: Etilmalonik asidürinin metabolik yolları.

Etilmalonik ensefalopati gelişim geriliği, tekrarlayan peteşi, ortostatik akrosiyanoz ve kronik ishal ile karakterize yıkıcı bir hastalıktır. Hastalığın prognozu oldukça zayıftır, metabolik dekompanseasyon ile hastaların yarısında iki yaşından önce ölüme sebebiyet verir [97,98].

#### 4.3.1 Tanı

Hastalıkta erken başlayan ve ilerleyen psikomotor gerilik, nöbetler, peteşi, kronik hemarojik ishal gibi belirtiler şüphe uyandırıcıdır. Laboratuvar bulgularında ise kan laktat seviyesinde artış, kan C4 ve C5-açilkarnitin esterlerinde artış, plazma tiyosülfat artışı ve idrarda etilmalonik asit artışı görülür. İdrardaki birikme seviyesi 54 ile 2270 mmol/mol kreatinin olarak verilmiştir [47,99].

Etilmalonik asit, (2-etil propandioik asit) molekül ağırlığı  $M_A = 132,115$  g/mol olan  $pK_{a1} = 2,99$ ,  $pK_{a2} = 5,83$  değerlerine sahip bir dikarboksilik asittir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Etilmalonik asit molekül yapısı.

Sağlıklı insan idrarındaki normal etilmalonik asit seviyeleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3: Sağlıklı bireylerin idrarında etilmalonik asit seviyeleri.

| Yaş Aralığı        | Etilmalonik asit<br>(mmol/mol kreatinin) |
|--------------------|------------------------------------------|
| Yeni doğan dönemi  | 20,00-42,00                              |
| Çocukluk dönemi    | 1,00-5,00                                |
| Yetişkinlik dönemi | 1,20-5,80                                |

#### 4.3.2 Tedavi

Etilmalonik ensefalopati ve diğer ölümcül hastalıkların tanı ve tedavisi için etilmalonik asidürinin erken tespiti hayati önem taşımaktadır. EMA yenidoğan ve erken çocukluk döneminde ölümlere yol açmaktadır.

Hastalık seyrinin erken döneminde uygulanan fizik tedavinin istenmeyen kas kasılmalarını önlemede yardımcı olacağı belirlenmiştir. Şiddetli ishal durumunda sıvı

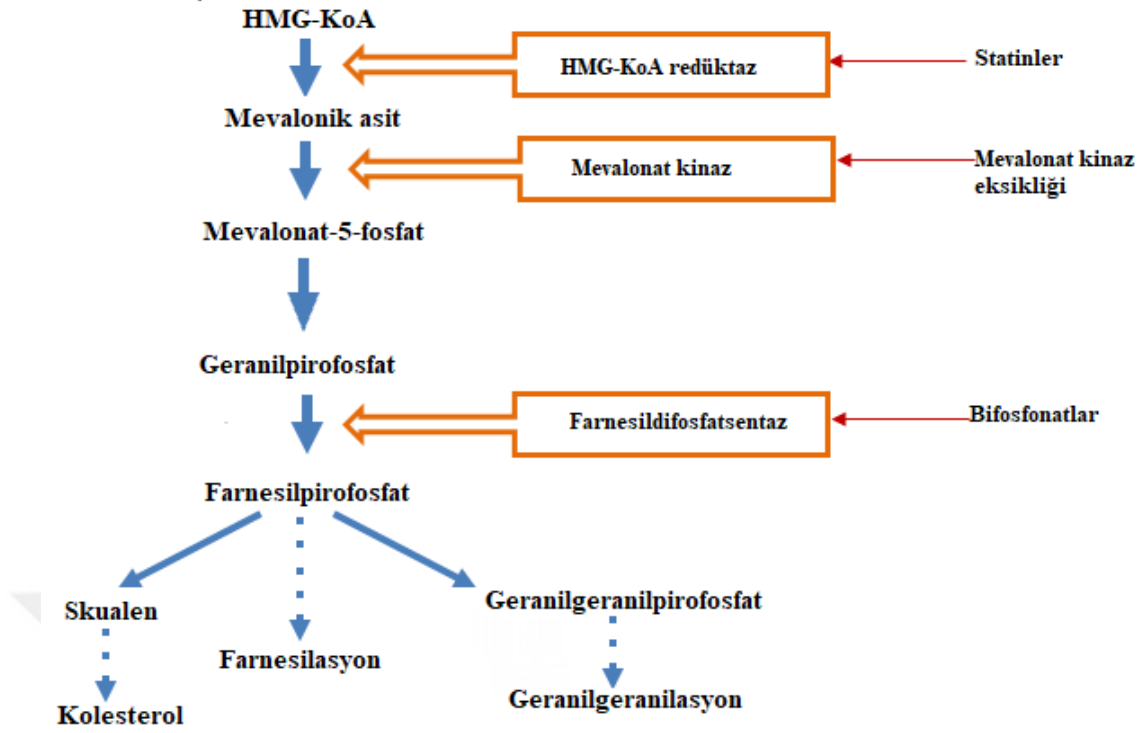
ve yüksek kalori alınması önemlidir. Ölümcül olabilecek enfeksiyonların önlenmesi de önemlidir [99].

Özellikle hastalık başlangıcında koenzim Q10, N-asetilsistein ve metronidazol (bağırsak temizlenmesi için) ile kombine tedavi sonucunda belirgin bir nörolojik gelişme, akrosiyanoz ve peteşide azalma, ishalin yok olması gözlemlenmiştir [99,100].

#### **4.4 Mevalonik Asidüri**

Mevalonat kinaz eksikliği (MKD) otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır. İki Fenotipi bulunmaktadır: Hiper IgD Sendromu (HIDS) ve mevalonik asidüri. Her iki hastalıktada ateş ve iltihaplanmanın eşlik ettiği mide-bağırsak şikayetleri, lenf bezlerinin şişmesi, eklem ağrıları, deri döküntüsü ve mukozal ülserler görülür. Bu atakların yanı sıra, daha şiddetli fenotip mevalonik asidüriden etkilenen hastalar dismorfik özelliklere, doğum öncesi ve sonrası büyüme geriliğine, nörolojik ve oküler tutulumu sahiptir. İdrarda mevalonik asit (MVA) seviyesi ile hastalık teşhisi koyulabilir [100,101].

Mevalonat kinaz, mevalonat biyosentetik yolağının anahtar enzimidir. Kolesterol ve nonsterol izoprenoidlerin oluşmasında görevlidir. Bu yolak HMG-KoA'yı mevalonata çeviren HMG-KoA (3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A) redüktaz enzimi ile başlar. Mevalonat kinaz, mevalonatın C5 hidroksil oksijeninin fosforilasyonunu gerçekleştirerek 5-fosfomevalonik asidi oluşturur. Daha sonraki adımlar bu bileşiğin izopentil pirofosfata dönüşmesini sağlar. Bu yoldaki mevalonat kinaz enzim aktivitesindeki eksiklik hem mevalonik asit birikimine hem de bahsedilen bileşiklerin eksikliğine neden olur. Mevalonik asit seviyelerinin plazma ve idrarda artışı ile sonuçlanır (Şekil 4.7) [100-102].

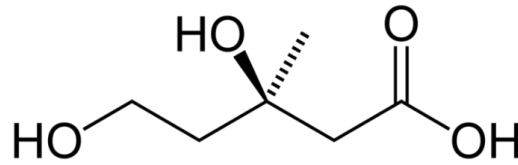


Şekil 4.7: Mevalonik asit fosforilasyonu.

#### 4.4.1 Tanı

Tanı idrarda yükselen mevalonik asit miktarı ile koyulabilir. Genetik testlerle hastalık doğrulanır [101]. MKD hastalığının kompleks yapısı kesin tanı koyulmasında gecikmelere sebep olabilmektedir. İlerleyen yaşlardaki sonuçları kesin olarak bilinmemektedir [103].

Mevalonik asit molekül ağırlığı  $M_A=148,16$  g/mol  $pK_a=4,48$  değerine sahip bir asittir. Şekil 4.8’de mevalonik asit molekül yapısı görülmektedir.



Şekil 4.8: Mevalonik asit molekül yapısı

Sağlıklı insan idrarındaki normal mevalonik asit seviyeleri Çizelge 4.4’te gösterilmiştir.

**Çizelge 4.4:** Sağlıklı bireylerin idrarında mevalonik asit seviyeleri.

| <b>Dönem</b> | <b>Mevalonik asit<br/>(mmol/mol kreatinin)</b> |
|--------------|------------------------------------------------|
| Çocukluk     | 0,10-1,90                                      |
| Yetişkinlik  | 0,00-2,00                                      |

#### **4.4.2 Tedavi**

Tedavi seçenekleri sınırlı veriye dayalı olarak gerçekleştirilir. Nonsteroidal antiinflamotari ilaçlar, kartikosteroidler ve özel sitokin yolaklarını hedef alan biyolojik ajanlar kullanılır. Daha az şiddetli olan formlarda nonsteroidal antiinflamotuar ilaçlar veya steroidler ateş atakları esnasına kullanılabilir. Hastalığın daha şiddetli formuna sahip olan kişilerde biyoterapi ile iyileşme sağlanabilir. Son yıllarda biyolojik ilaçlar için iyi sonuçlar alınsa da bu çalışmalarda tatmin edici bir azalma gözlenmemiştir. Bu sebeple daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır [99]. Jeyaratnam ve Frenkel'in çalışmasında interlökin-1 antagonist canakinumab kullanılmış ve hastaların %35'inde tamamiyle bir azalma raporlanmıştır. Fakat ilacın maliyeti birçok hasta için ulaşılmaz olmasına sebep olmaktadır [104].

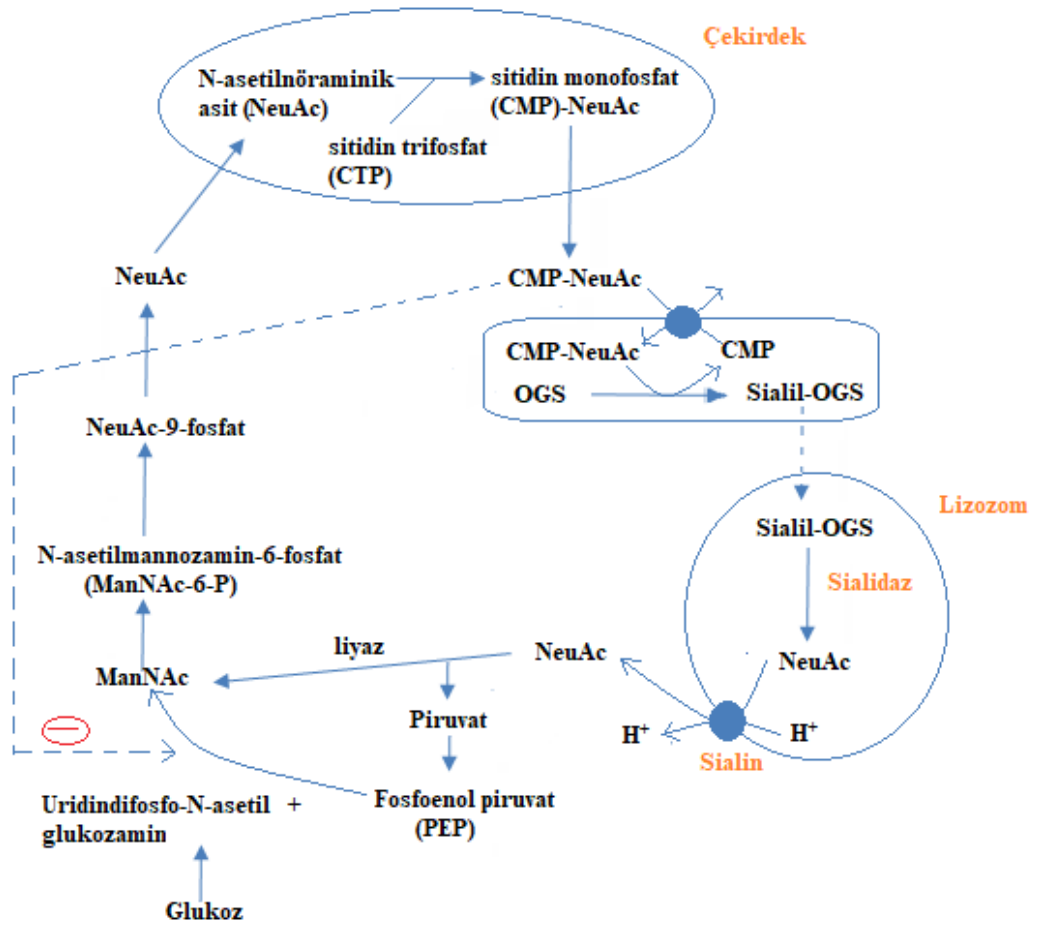
K. Rafiq ve arkadaşları ise tokilizumab ile 12 yaşındaki bir kız çocuğu hastayı tedavi ettiklerini raporlamış ve MKD tedavisi için kısıtlı da olsa bir katkı sağladıklarını belirtmişlerdir [105].

#### **4.5 Sialik Asidüri**

Sialik asit depo hastalıkları (SSD'ler) nadir görülen resesif nörodejeneratif genetik bozukluklardır. Bu durum serbest sialik asidin dokularda, fibroblastlarda ve idrarda birikimine sebep olur. Hastalığın üç formu bulunmaktadır: Salla hastalığı en hafif fenotip olup doğumda normal görünüm ve bulgular ardından psikomotor gelişimde gerilik, spastisite ve epileptik nöbetler ile sonuçlanan yavaş ilerleyen nörolojik bozulma ile karakterize edilir. En şiddetli olan fenotip olan ISSD'de (infantile free sialic acid storage disease) ise belirtiler doğumdan önce veya doğumun hemen ardından görülür. Bu belirtiler ciddi gelişimsel gerileme, kaba yüz özellikleri, karaciğer ve kalp büyümesi ile erken çocukluk döneminde ölüm olarak sıralanabilir.

Hastalığın üçüncü formu ise orta şiddette olarak belirtilmiştir. Bu hastalığın belirtileri de Salla hastalığı ve ISSD belirtileri arasında bulunur.

Bu hastalıkların üçü de 6q13 kromozomu üzerinde bulunan SLC17A5 genindeki homozigot veya bileşik heterozigot mutasyondan kaynaklanır. Hastalığın şiddetini gendeki spesifik değişim belirler. SLC17A5 geni serbest sialik asidi lizozom içinden taşımakla görevli sialin adı verilen proteinin üretilmesinden sorumludur. Sialik asit, glikoprotein ve glikolipitlerin lizozom tarafından parçalanmasıyla oluşan bir şekerdir. Sialik asit depo hastalıklarında yetersiz çalışan sialin sebebiyle sialik asidin lizozomlarda toplanmasına neden olur (Şekil 4.9) [106,107].

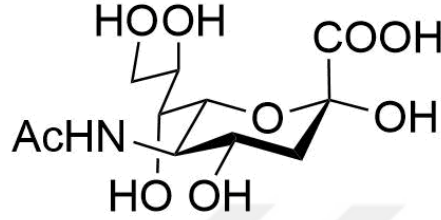


Şekil 4.9: Sialik asidin metabolizma yolu.

#### 4.5.1 Tanı

Fiziksel muayene ardından hastadaki belirtiler değerlendirilir. Tanı için idrardaki yükselen sialik asit seviyesine bakılır. Ayrıca beyindeki anormallikler incelenir. Hastalığın formunun kesinleştirilmesi için genetik testlerden de faydalanılmaktadır.

Sialik asit (N-asetilnöraminik asit, SA) molekül ağırlığı  $M_A=309,2699$  g/mol  $pK_a=2,60$  değerine sahip bir asittir. Şekil 4.10'da SA molekül yapısı görülmektedir.



Şekil 4.10: Sialik asit molekül yapısı.

Sağlıklı insan idrarındaki normal sialik asit seviyeleri Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5: Sağlıklı bireylerin idrarında sialik asit seviyeleri.

| Dönem       | Sialik asit<br>(mmol/mol kreatinin) |
|-------------|-------------------------------------|
| Çocukluk    | 0,79-3,17                           |
| Yetişkinlik | 11,32-73,58                         |

#### 4.5.2 Tedavi

Hastalığın onaylanmış bir tedavisi bulunmamaktadır. Genel olarak her hastaya özel olacak şekilde destekleyici ve belirtileri gidermeye yönelik tedaviler uygulanmaktadır. Nöbetlerin tedavi edilmesi, yeterli beslenmenin sağlanması, hareket ve iletişimin iyileştirilmesi için rehabilitasyon uygulanması, kalsiyum ve D vitamini takviyesi, özel eğitim, konuşma terapisi ve sosyal destek gibi destek çalışmaları yapılabilir [106-109].

## 5. DENEYSEL KISIM

Bu doktora çalışmasında kapiler elektroforez-temassız iletkenlik dedektör tekniği ile çeşitli metabolitler için üç analiz yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmanın ilk kısmı etilmalonik asit için bir analiz yöntemini içermektedir. Çalışmasının ikinci kısmında ise MA, MMA ve EMA'nın aynı anda tayini gerçekleştirilmiştir. Üçüncü kısımda ise mevlonik ve sialik asit için geliştirilen yöntem bulunmaktadır. Her üç yöntemin de idrar örneklerinin analizlerine uygulaması yapılmıştır.

### 5.1 Malzeme ve Yöntemler

#### 5.1.1 Kimyasallar

Malonik asit (MA), metilmalonik asit (MMA), etilmalonik asit (EMA), setiltrimetilamonyum bromür (CTAB), 2-(N-morfolin)etansulfonik asit (MES), 2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol (Tris), mevalonik asit (MVA) ve sialik asit (N-asetilnöraminik asit) (SA) Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, ABD). Çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Çalışmada kullanılan ultrasaf su Elga Purelab Option-7-15 filtreleme sisteminden elde edilmiştir.

#### 5.1.2. Standart çözeltilerin ve idrar örneklerinin hazırlanması

İdrar örnekleri İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Çocuk Beslenme ve Metabolizma Bilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

Tüm idrar örnekleri -20°C'de saklanmış ve analizden önce ultrasaf su ile 1:100 (v/v) oranında seyreltilmiştir. MA, MMA, EMA, SA ve MVA için stok çözeltiler (100 mg/L) hazırlanmıştır. Tüm standartlar ve stok çözeltiler -20°C'de saklanmış ve analizden önce oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir. Standart çözeltiler ise stok çözeltilerin uygun oranlarda seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

Tampon çözelti MES ve Malonik asit'in ultra saf suda çözünmesi ile hazırlanmış ve pH ayarlaması 0,1 mol/L Tris ile yapılmıştır. Örnek çözeltileri enjeksiyondan önce

günlük olarak hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler kullanımdan önce 0,45 µm'lik mikrofiltrelerden geçirilmiştir.

MA, MMA, EMA, SA ve MVA çözeltilerinin kararlılığı araştırılmış ve sonuçlar % RSD olarak verilmiştir. Kararlılık çalışmaları sulu ortam ve idrarda 2, 5 ve 10 mg/L standart asit çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Standart çözeltilerin sulu ortamdaki kararlılığı 7 gün boyunca 4°C'de ve idrardaki kararlılığı ise 24 saat oda sıcaklığında ve üç kere dondurma çözme işleminden sonra belirlenmiştir.

Sulu ortamdaki kararlılık için %RSD 3,58–4,57 arasında bulunmuştur. İdrardaki kararlılık ise 24 saat oda sıcaklığında % 4,25-5,32 ve üç dondurma çözme işleminden sonra ise, % 5,98–6,37 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, MA, MMA, EMA, SA ve MVA çözeltilerinin bu çalışma sırasında kullanılan saklama koşullarında kararlı olduğunu göstermektedir.

### 5.1.3 Cihazlar ve çalışma şartları

Analizler TraceDec Temassız İletkenlik Dedektörü ile birleştirilmiş CE sistemi (Prince Technologies, Emmen, Hollanda) ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda kullanılan silika kapiler kolonun (Polymicro Technologies, Phoenix, ABD) toplam ve etkin uzunlukları Çizelge 5.1'de verilmiştir.

**Çizelge 5.1:** Silika kapiler kolonların iç çapı, toplam ve etkin uzunlukları.

| Analit       | İç Çap (µm) | Toplam uzunluk (cm) | Etkin uzunluk (cm) |
|--------------|-------------|---------------------|--------------------|
| EMA          | 50          | 65                  | 52                 |
| MA, MMA, EMA | 25          | 60                  | 46                 |
| SA ve MVA    | 50          | 65                  | 52                 |

Veriler DAX 8.0 Data Acquisition and Analysis yazılımı (Hollanda) ile analiz edilmiştir. Her çalışma gününün başında silika kapiler kolon 0,1 mol/L NaOH (10 dk), su (5 dk) ve tampon (10 dk) ile yıkanmıştır. Enjeksiyon aralarında ise NaOH, su ve tampon çözelti ile 2'şer dk yıkama gerçekleştirilmiştir. Yapılan her üç çalışmada çalışma voltajı olarak 28 kV seçilmiştir. Örnek enjeksiyonu hidrokinamik enjeksiyon ile uygulanmıştır.

## 6. SONUÇLAR

### 6.1 İdrarda Etilmalonik Asit Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi

Bölüm 4'te belirtildiği gibi nadir görülen metabolik hastalıklardan olan asidürilerin tanısı için ilgili asit miktarının idrardaki yükselme miktarları kullanılmaktadır. EMA  $pK_{a1}$  ve  $pK_{a2}$  değerleri sırasıyla 2,99 ve 5,83 olan düşük molekül ağırlıklı ve UV-absorpsiyonu düşük olan bir organik asittir. Bu nedenle  $C^4D$  ile dedeksiyon bu organik asit için uygun ve güvenilir olmaktadır.  $C^4D$  ile ölçüm prensibi tampon ve analit arasındaki iletkenlik farkına dayanır.  $C^4D$  dedeksiyonunda hassasiyetinin artırılması ve kapilerdeki akımın azaltılması için CE'de kullanılan tampon çözelti iletkenliğinin düşük olması gerekir. Tampon iletkenliği ve aynı zamanda EMA'nın elektroforetik mobilitesi pH ve iyonik şiddetten etkilenmektedir. Bu etkilerin kaynağını ise tampon çözeltinin bileşimi oluşturmaktadır. Bu çalışmada düşük iletkenliğinden ötürü çalışma tamponu olarak MES seçilmiştir [110]. İyonik şiddetin artışının engellenmesi için ise pH ayarlamaları Tris ile gerçekleştirilmiştir.

CE'de analiz edilebilmesi için EMA negatif yüklenmelidir [23, 111]. Kaplı olmayan silika kapilerde EOA katoda doğrudur. Örnekler pozitif kutuptan cihaza enjekte edilir ve negatif kutba doğru EOA ile birlikte sürüklenerek negatif kutba yerleştirilmiş dedektörde tespit edilirler. Elektroforez boyunca tüm türler yüklerine bakılmaksızın negatif kutba doğru EOA ile hareket ederler. Fakat çalışmamızda kullanılan küçük organik asitler gibi bazı türler yüksek elektroforetik mobilitelere sahip olduklarından EOA ile detektöre doğru uzun sürelerde göç ederler. Bu da analiz sürelerinin uzamasına sebep olur. Analiz hızını artırmak ve EMA göç süresini azaltmak için EOA yönün değiştirilmesi gerekir. Kapilerin iç yüzeyinin pozitif yüklerle kaplanması sağlanarak akış yönü negatif elektrottan pozitif elektroda doğru çevrilerek polarite değiştirilir ve örnek enjeksiyonu negatif uçtan gerçekleştirilir. Artık analitin elektroforetik mobilitesi ve EOA yönü aynıdır. Böylece göç süreleri kısalır ve daha kısa zamanda ayırım gerçekleştirilmiş olur [47]. Bu bilgiler göz önüne alınarak çalışma tamponuna akış düzenleyici olarak alkilamonyum tuzu (CTAB) eklenmiştir [110-112]. EMA pikinin idrardaki matriks etkilerinden ayrılması, ayırma gücünün optimize edilmesi adına pH 5,00 ve 9,00 arasındaki tampon çözeltilerle ön denemeler

gerçekleştirilmiştir. pH 5,50 altında EMA pikinin göç süresi uzamış ve pik genişlemesi gözlenmiştir. pH 7,5 üzerinde ise pik yükseklikleri artmış fakat bu kez de matriks pikleri ve EMA piki arasındaki ayırma gücü azalmıştır. CTAB derişiminde 0,05 mmol/L altındaki değerlerde asit piki gözlemlenememiştir. Konsantrasyondaki artış ile yine ayırma gücünde azalma görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlardan yola çıkarak pH, MES konsantrasyonu ve CTAB konsantrasyonunu optimize etmek için Box-Behnken tasarımı (BBD) uygulanmıştır.

### 6.1.1 Box-Behnken tasarımı ile optimizasyon

Öncelikle idrar örnekleri EMA ile zenginleştirilerek (spike-in) analiz edilmiştir. Fakat analiz sonucunda idrar matriksinden gelen pikler ile EMA pikinin üst üste bindiği tespit edilmiştir. CE ayırma gücünün tampon bileşiminden etkilendiği göz önüne alınarak MES ve CTAB konsantrasyonu ile tampon pH'sının optimizasyonu için Box-Behnken tasarımı (BBD) uygulanmıştır. Bu tasarım için seçilen faktörlerin minimum, maksimum ve orta değerleri Çizelge 6.1'de görülmektedir.

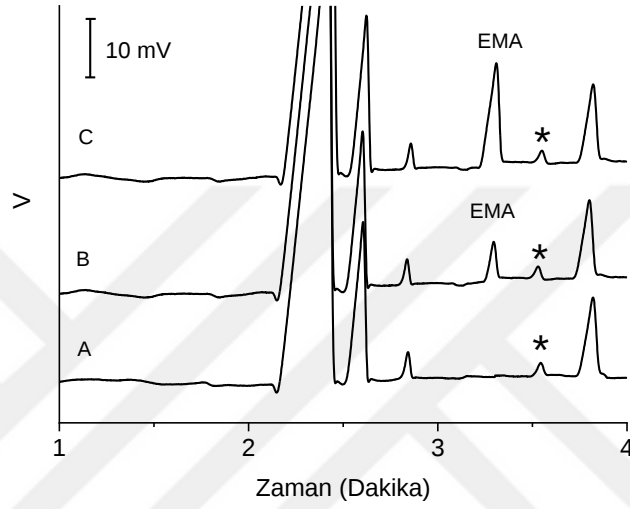
**Çizelge 6.1:** Çalışmada kullanılan faktörler ve seviyeleri.

| Faktörler     | Minimum Değer<br>(-1) | Merkezi Değer<br>(0) | Maksimum Değer<br>(+1) |
|---------------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| MES (mmol/L)  | 20                    | 50                   | 80                     |
| pH            | 5,5                   | 6,5                  | 7,5                    |
| CTAB (mmol/L) | 0,05                  | 0,10                 | 0,15                   |

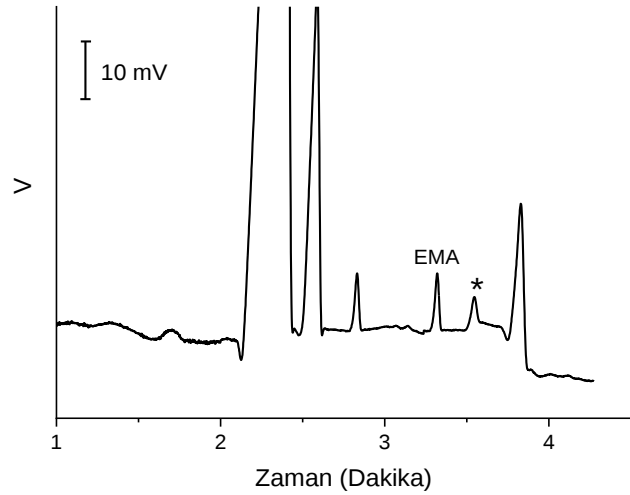
Bu üç faktörün optimum değerlerinin hesaplanması için yanıt olarak pik ayırma güçleri ve pik yükseklikleri seçilmiştir. Değerlerin belirlenmesinin ardından tasarım matrisi oluşturulmuş ve deneyler rastgele olacak şekilde ve 15 farklı kombinasyonda deney gerçekleştirilmiştir. Deneysel tasarım matrisi Bölüm 3'te yer alan Çizelge 3.4'e göre hazırlanmıştır.

Optimum ayırma koşullarının belirlenmesi için Minitab 16 programı kullanılmıştır. Tasarım sonuçları ve grafikler EK A'da verilmiştir. Çizelge A.1'de ayırma gücü için Çizelge A.2'de ise pik yüksekliği için varyans analizi sonuçları görülmektedir. Şekil A.1 ve Şekil A.2'de yüzey grafikleri verilmiştir. Model terimlerinin anlamlı olup olmadığı *p* şeklinde ifade edilen olasılık değerlerinden anlaşılmaktadır. *p* değerinin

0,0500'ten küçük olması faktörlerin etkili olduğunu gösterir. BBD sonuçlarına göre ayırma gücü ve pik yükseklikleri için etkili faktörlerin pH ve MES konsantrasyonu olduğu görülmektedir. BBD sonucunda optimum ayırma koşulları şu şekilde bulunmuştur: 50 mmol/L MES, 0,13 mmol/L CTAB ve pH= 6,5. (Şekil A.3). Bu koşullar altında EMA piki oldukça kısa sürede (3-4 dk) ve diğer piklerden ayrılmış bir şekilde elektroferogramda görülmüştür (Şekil 6.1 ve Şekil 6.2).



**Şekil 6.1:** Optimum ayırma koşulları: 50 mmol/L MES, 0,13 mmol/L CTAB ve pH=6,5.A: Sağlıklı insan idrarı B: 5 mg/L EMA eklenmiş sağlıklı insan idrarı C: 20 mg/L EMA eklenmiş sağlıklı insan idrarı.



**Şekil 6.2:** Hasta idrarındaki EMA için elektroferogram.

## 6.1.2 Metot validasyonu

### 6.1.2.1 Kalibrasyon

Doğrusal çalışma aralığını belirlemek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda EMA standart çözeltileri su ortamında ve idrar ortamında hazırlanarak elde edilmiştir (Çizelge 6.2).

### 6.1.2.2 Matriks etkisi

Matriks etkisi sulu çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisi ile idrar içeren çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisi eğimlerinin oranlarından hesaplanmıştır. Matriks etkisi %-9,1 olarak bulunmuştur.  $\pm 10$  aralığına giren değerler ihmal edilebilir olduğundan bu çalışmada matriks etkisi bulunmamaktadır.

### 6.1.2.3 LOD ve LOQ değerleri

LOD değerleri sinyal ve gürültü oranının 3 katı, LOQ değerleri de sinyal ve gürültü oranının 10 katı olacak şekilde hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 6.2’de görülmektedir.

**Çizelge 6.2:** Regresyon parametreleri, LOD ve LOQ değerleri.

|                               | İdrarda EMA                                       | Suda EMA                                          |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Lineer Regresyon Denklemi     | $y = 1,29 \times 10^{-6} x - 7,95 \times 10^{-7}$ | $y = 1,42 \times 10^{-6} x - 8,75 \times 10^{-7}$ |
| Regresyon katsayısı ( $R^2$ ) | 0,9998                                            | 0,9998                                            |
| Kalibrasyon aralığı (mg /L)   | 1-100                                             | 1-100                                             |
| Nokta sayısı                  | 8                                                 | 8                                                 |
| LOD (mg/L)                    | 0,139                                             | 0,128                                             |
| LOQ (mg/L)                    | 0,466                                             | 0,427                                             |

#### 6.1.2.4 Kesinlik ve geri kazanım

Metodun kesinlik ve doğruluğu hasta idrar örneğine üç farklı EMA konsantrasyonunun eklenmesi ile belirlenmiştir. Gün içi, günler arası tekrarlanırlık ve geri kazanım sonuçları Çizelge 6.3'te verilmiştir

**Çizelge 6.3:** İdrarda EMA için geri kazanım ve kesinlik.

| Eklenen miktar<br>(mg /L) | Geri kazanım<br>(%) $\pm$ SS | Gün içi          |       | Günler arası |       |
|---------------------------|------------------------------|------------------|-------|--------------|-------|
|                           |                              | RSD%             |       | RSD %        |       |
|                           |                              | (n=5)            |       | (n=15)       |       |
|                           | %Gün içi                     | A/t <sup>a</sup> | t     | A/t          | t     |
| 1                         | 95,3 $\pm$ 1,8               | 4,02             | 0,156 | 5,98         | 0,285 |
| 2,5                       | 97,0 $\pm$ 1,6               | 3,78             | 0,137 | 5,76         | 0,212 |
| 5                         | 98,2 $\pm$ 2,0               | 3,95             | 0,123 | 5,49         | 0,252 |

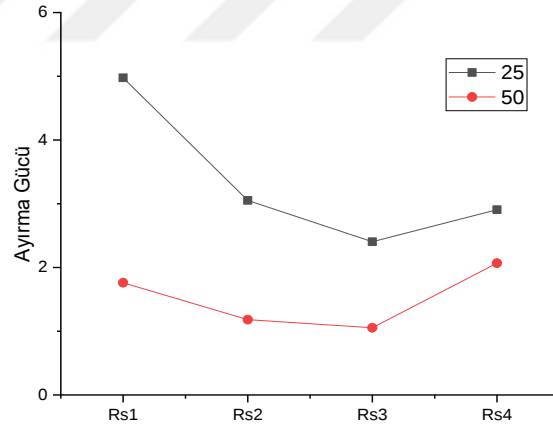
<sup>a</sup>Alan/göç zamanı

#### 6.1.3 Yöntemin hasta idrarında EMA tayinine uygulanması

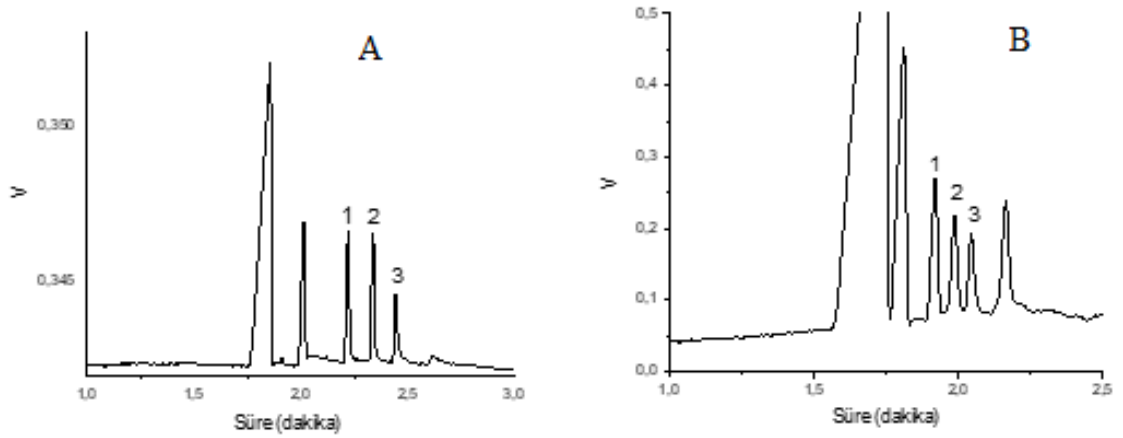
Üç farklı sağlıklı gönüllüden alınan idrar örnekleri incelendiğinde matriks profillerinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Kör idrar örneklerinin elektroferogramları ile 5 ve 20 mg/L EMA ile zenginleştirilmiş idrar örnekleri kıyaslandığında EMA'nın kendine özgü ve idrardaki diğer piklerle çakışmayan bir pike sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum EMA'nın sağlıklı birey idrarlarında oldukça düşük seviyelerde bulunması ile tutarlı olmaktadır. Örneğin Naccarato ve arkadaşları sağlıklı bireylerdeki EMA seviyelerini 0,31-4,4 mg/L olarak rapor etmiştir [113]. Bu değerler çalışmamızda kullandığımız hasta bireylerin idrar örneklerindeki EMA değerlerinden 56-790 kat daha düşük olması ile sağlıklı birey idrarındaki EMA seviyelerinin ihmal edilebileceğini göstermektedir. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nden alınan hasta idrarında EMA 245 $\pm$ 3 mg/L olarak tespit edilmiştir.

## 6.2 İdrarda Malonik, Metilmalonik ve Etilmalonik Asit Eşzamanlı Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi

MA ve MMA, EMA'ya benzer şekilde molekül ağırlığı düşük olan organik asitlerdir. MA için  $pK_{a1}$  ve  $pK_{a2}$  değerleri sırası ile 2,83 ve 5,69 iken MMA'ya ait değerler sırasıyla 3,07 ve 5,79'dur. Bu asitler CE'de eksi yüklenerek analiz edilir. Üç farklı malonik asitlerin eşzamanlı tayini birleşik malonik ve metilmalonik asidüri tanısı için de yöntemi kullanışlı hale getirmektedir [78]. Tampon bileşimi olarak EMA tayininde kullanılan tampon bileşimi seçilmiştir. Bu çalışmada bu üç asidin ayrılması için ilk deneysel çalışmalar 50  $\mu m$  iç çapa sahip silika kapiler kolon ile gerçekleştirilmiştir. Asitlerin konsantrasyonları arttıkça birbirleri arasında ve idrardaki diğer pikler ile arasında ayırma gücü azalmaktadır. Bu nedenle 25  $\mu m$  iç çapa sahip silika kapiler kolon ile de denemeler gerçekleştirilmiştir. Şekil 6.3 iki kapiler arasındaki ayırma gücü farklarını göstermektedir. 25  $\mu m$  iç çapa sahip silika kapiler kolonda ayırma gücünün daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara dayanarak bundan sonraki çalışmalara 25 $\mu m$  iç çapa sahip silika kapiler kolon ile devam edilmiştir.



**Şekil 6.3:** Farklı iç çapa sahip silika kapiler kolonların ayırma gücü üzerindeki etkisi.



**Şekil 6.4:** Farklı kapiler kolonlarda 10 mg/L konsantrasyondaki asitlerin elektroferogramları.

1: MA 2:MMA 3:EMA A: 25 µm B: 50 µm.

25µm iç çaplı silika kapiler kolon ile enjeksiyon hacmi küçülmekte ve bu nedenle de dedektör hassasiyeti düşmektedir. Bu durumun giderilmesi için de metot optimizasyonunda ayırma gücünde bir azalma olmadan örnek sıkıştırma yöntemi kullanılarak dedektör hassasiyeti arttırılmaya çalışılmıştır. Örnek sıkıştırma yöntemi için elektrokinetik ve hidrodinamik enjeksiyonun pik yüksekliğini nasıl etkilediğini belirlemek için denemeler yapılmıştır. Elektrokinetik enjeksiyonda pik boyları çok kısalmış ve düşük konsantrasyonlarda ise pikler görülememiştir. Bu nedenle çalışmaya hidrodinamik enjeksiyon ile devam edilmiştir.

### 6.2.1 Box-Behnken tasarımı ile optimizasyon

EMA çalışmasında MES konsantrasyonu ve tampon pH ayırma gücü üzerinde etkili faktörler olarak belirlenmişti. Bu tasarımda tampon konsantrasyonu ve pH'nın yanında dedeksiyon hassasiyetini etkileyen faktör olarak enjeksiyon süresi tasarıma eklenmiştir. Seçilen üç faktörün optimum değerlerinin tespit edilmesi için yanıt olarak seçilen ortalama pik yükseklikleri ve ayırma güçleri üzerine etkileri Box-Behnken tasarımı ile incelenmiştir. Çizelge 6.4'te üç asidin eşzamanlı tayini için seçilen faktör ve bu faktörlerin değerleri görülmektedir. BBD ile 15 deney gerçekleştirilmiştir. Deneysel tasarım matrisi Bölüm 3'te verilen Çizelge 3.4'e uygun olacak şekilde hazırlanmıştır.

**Çizelge 6.4:** Çalışmada kullanılan faktörler ve seviyeleri.

| Faktörler          | Minimum Değer<br>(-1) | Orta Değer<br>(0) | Maksimum Değer<br>(+1) |
|--------------------|-----------------------|-------------------|------------------------|
| MES (mmol/L)       | 20                    | 50                | 80                     |
| pH                 | 5,5                   | 6,5               | 7,5                    |
| $t_{inj}$ (saniye) | 10                    | 35                | 60                     |

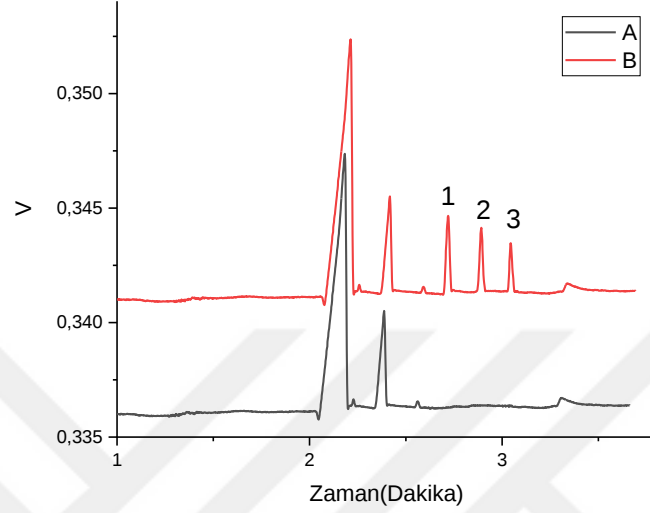
Yanıtlar ve faktör etkileri arasındaki ilişkileri tayin etmek ve yorumlamak için ikinci derece polinomiye model (yanıt yüzey yöntemi) kullanılmıştır. Deneysel sonuçlar Minitab programı kullanılarak önerilen regresyon modeline uygunluğu test edilmiştir. Box-Behnken tasarım analizi sonucunda elde edilen varyans analizi (ANOVA) sonuçları EK B’de (Çizelge B.1, B.2 ve B.3) görülmektedir. ANOVA sonuçlarına göre üç faktörün  $p$  değerleri 0,0500 ten küçüktür bu nedenle faktörler ayırma gücü üzerinde etkilidir.  $t_{inj}^2$  (0,0003; 0,0002) ve  $pH^2$  (0,0362; 0,0110) etkileşimleri de etkili katsayılarıdır. Bunlar da injeksiyon süresinin ve pH’ın ayırma gücü üzerinde kuadratik etkisinin olduğunu göstermektedir. Ayırma gücünü en fazla etkileyen faktör injeksiyon süresidir. Pik yüksekliği için ise pH ve injeksiyon süresinin  $p$  değerleri 0,0500 ten küçüktür ve yine  $t_{inj}^2$  (0,0001) ve  $pH^2$  (0,0421) etkileşimleri pik yüksekliği için anlamlı katsayılarıdır, injeksiyon süresi pik yüksekliğini en çok etkileyen parametredir.

Model uyumu, modelin  $p$  değerinden,  $R^2$  değerinden ve uyum eksikliğinden belirlenebilir. Modellerin  $p$  değerlerinden ( $p<0,05$ ) modellerin önerilen kuadratik modele uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.  $R^2$  (çoklu belirleme katsayısı) değerleri  $R_1$ ,  $R_2$  ve  $h$  için sırasıyla 0,9840;0,9889 ve 0,9874 tür. Bu değerler pik yüksekliği ve ayırma gücündeki değişimin ne kadarının faktörlerle açıklanabileceğini göstermektedir. Uyum eksikliği 0,0500’ten büyük olması uyum eksikliğinin anlamlı olmadığını belirtir. Anlamlı olmayan uyum eksikliği iyidir ve modelin verilere uyumlu olduğunun bir göstergesidir. Elde edilen bu sonuçlara göre matematiksel modellerin uygun olduğu söylenebilmektedir.

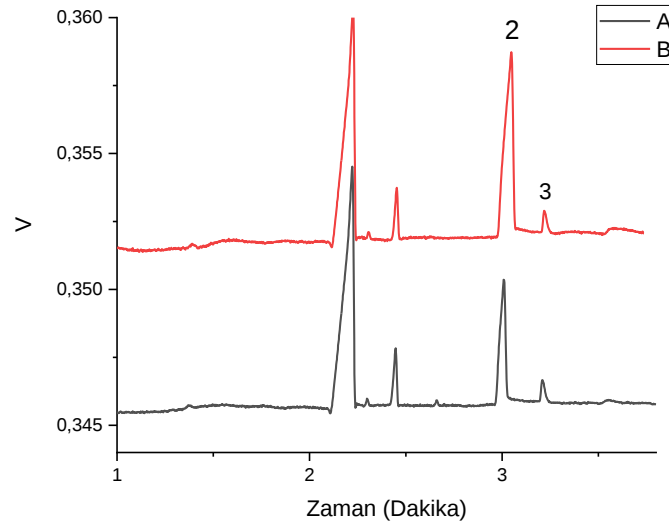
EK B Şekil B.1, B.2 ve B.3’te verilen üç boyutlu yüzey grafiklerinde ise faktörlerin hem birbirleri hem de yanıt üzerindeki etkileri görülmektedir. BBD’den elde edilen sonuçlara göre optimum koşullar 45 mM MES, pH=6,5 ve  $t_{inj}$ =0,5 dk olarak belirlenmiştir (Şekil B.4). Şekil 6.5’te optimum tampon koşullarında sağlıklı insan

ıdrarı ve sağlıklı insan ıdrarına standart asit eklenmesiyle elde edilen elektroferogramlar görülmektedir.

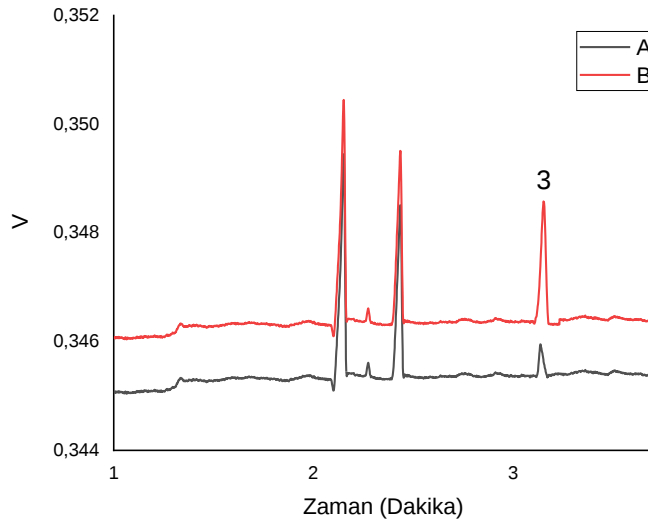
Şekil 6.6 ve  ekil 6.7’de ise hasta ıdrarlarına ait elektroferogramlar görülmektedir



**Şekil 6.5:** A: Sağlıklı insan ıdrarı B: 10 mg/L MA (1) ,MMA (2) ve EMA(3) eklenmiş sağlıklı insan ıdrarı. Optimum ayırma koşulları: 45 mmol/L MES,  $t_{inj}=0,5$  dk ve pH=6,5.



**Şekil 6.6:** A: Metilmalonik asidüri hasta ıdrarı B: 10 mg/L MMA (2) standardı eklenmiş metilmalonik asidüri hasta ıdrarı. Optimum ayırma koşulları: 45 mmol/L MES,  $t_{inj}=0,5$  dk ve pH=6,5.



**Şekil 6.7:** A: Etilmalonik asidüri hasta idrarı B: 10 mg/L EMA (3) standardı eklenmiş metilmalonik asidüri hasta idrarı. Optimum ayırma koşulları: 45 mmol/L MES,  $t_{inj}=0,5$  dk ve pH=6,5.

## 6.2.2 Metot validasyonu

### 6.2.2.1 Kalibrasyon

Doğrusal çalışma aralığını belirlemek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda MA, MMA ve EMA standart çözeltileri su ortamında ve idrar ortamında hazırlanarak elde edilmiştir (Çizelge 6.5).

**Çizelge 6.5:** Su ve idrar ortamındaki doğrusal çalışma alanı.

| Bileşik | Lineer Regresyon Denklemi | R <sup>2</sup> | Doğrusal aralık |
|---------|---------------------------|----------------|-----------------|
| MA      | $y = 0,0037x - 0,0049$    | 0,9992         | 0,75-100 mg/L   |
|         | $y = 0,0036x - 0,0049^*$  | 0,9993         | 0,75-100 mg/L   |
| MMA     | $y = 0,0035x - 0,0023$    | 0,9990         | 0,8-200 mg/L    |
|         | $y = 0,0032x - 0,0014^*$  | 0,9996         | 0,8-200 mg/L    |
| EMA     | $y = 0,0029x - 0,0060$    | 0,9995         | 1,5-100 mg/L    |
|         | $y = 0,0027x - 0,0068^*$  | 0,9990         | 1,5-100 mg/L    |

\*idrar ortamı

#### 6.2.2.2 Matriks etkisi

Matriks etkisi sulu çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisi ile idrar içeren çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisi eğimlerinin oranlarından hesaplanmıştır. Matriks etkisi MA, MMA ve EMA için sırasıyla %2,7, %8,57, %6,89 olarak bulunmuştur. Elde edilen değerler  $\pm 10$  aralığına girdiğinden matriks etkisi ihmal edilebilir.

#### 6.2.2.3 LOD ve LOQ değerleri

LOD değerleri sinyal ve gürültü oranının 3 katı, LOQ değerleri de sinyal ve gürültü oranının 10 katı olacak şekilde hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 6.6’te görülmektedir.

**Çizelge 6.6:** LOD ve LOQ değerleri.

|     | LOD<br>(mg/L) | LOQ<br>(mg/L) |
|-----|---------------|---------------|
| MA  | 0,222         | 0,741         |
| MMA | 0,228         | 0,761         |
| EMA | 0,431         | 1,436         |

#### 6.2.2.4 Kesinlik ve geri kazanım

Metodun kesinlik ve geri kazanımı hasta idrar örneğine üç farklı standart konsantrasyonunun eklenmesi ile belirlenmiştir. Gün içi, günler arası düzeltilmiş alan (A/t) ve zaman tekrarlanırlıkları Çizelge 6.7’de ve geri kazanım sonuçları Çizelge 6.8’de verilmiştir.

**Çizelge 6.7:** Metodun kesinlik değerleri.

| Örnek | Gün içi<br>(%RSD) n=7 |       | Günler arası<br>(%RSD) n=7x3 |       |
|-------|-----------------------|-------|------------------------------|-------|
|       | A/t                   | t     | A/t                          | t     |
| MA    | 3,37                  | 0,102 | 4,85                         | 0,547 |
| MMA   | 3,19                  | 0,153 | 4,31                         | 0,642 |
| EMA   | 3,95                  | 0,094 | 4,74                         | 0,689 |

A: alan t:göç zamanı

**Çizelge 6.8:** Geri kazanım değerleri (n=3).

| Analit | Eklenen konsantrasyon (mg/L) | Geri kazanım (%)±SS |
|--------|------------------------------|---------------------|
| MA     | 20                           | 93,7 ± 2,5          |
|        | 40                           | 98,3 ± 2,7          |
|        | 80                           | 97,8 ± 2,3          |
| MMA    | 25                           | 97,9 ± 2,5          |
|        | 50                           | 101 ± 3             |
|        | 100                          | 106 ± 2             |
| EMA    | 2                            | 96,9 ± 2,7          |
|        | 4                            | 98,4 ± 2,8          |
|        | 8                            | 102 ± 3             |

SS: standart sapma

### 6.2.3 Yöntemin Hasta İdrarlarında MMA ve EMA Tayinine Uygulanması

Üç farklı sağlıklı gönüllüden alınan idrar örnekleri incelendiğinde matris profillerinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Kör idrar örneklerinin elektroferogramları ile 5 ve 20 mg/L EMA ile zenginleştirilmiş idrar örnekleri kıyaslandığında MMA ve EMA'nın kendine özgü ve idrardaki diğer piklerle çakışmayan bir pike sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum MMA ve EMA'nın sağlıklı birey idrarlarında oldukça düşük seviyelerde bulunması ile tutarlı olmaktadır. Örneğin sağlıklı bireylerdeki MMA seviyeleri yetişkinlerde <4 mg/L, yeni doğanlarda ise <56 mg/L, EMA ise sağlıklı bireylerde <3,5 mg/L ve yeni doğanlarda ise <14 mg/L olarak rapor edilmiştir [114]. Bu değerler metodun dedeksiyon limitinin altında olması nedeni ile sağlıklı birey idrarlarında bu metabolitler tespit edilememiştir. İtatanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nden alınan hasta idrarlarında MMA hastasındaki MMA değeri 4158 ±15 mg/L, EMA ise 339±5 mg/L, EMA hastasında 251±4 mg/L olarak tespit edilmiştir.

## 6.3 İdrarda Sialik ve Mevalonik Asit Eşzamanlı Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi

### 6.3.1 Deneysel tasarım

Bu çalışmada tarama tasarımı olarak kısmi faktöriyel ve optimizasyon için ise BBD kullanılmıştır. Çalışmadaki amaç idrarda sialik asit (SA) ve mevalonik asit (MVA) analizi için optimum ayırma koşullarını belirlemektir. Serbest sialik asit ( $pK_a=2,60$ ) sulu ortamda negatif yük kazanan bir organik asittir. Mevalonik asitin  $pK_a$  değeri 4,48 dir. MVA'nın da tayin edilmesi için negatif yüke sahip olmaları gerekir. Önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi uzun analiz sürelerinden kaçınmak için kapiler kolon duvarı katyonik bir yüzey aktif ile kaplanmıştır. Uygun ayırma tamponunu belirlemek için ilk önce çeşitli ön denemeler yapılmıştır. Bu ön denemelerde çeşitli pH'larda ( $pH=3,30$  ile  $12,80$  arasında) tampon bileşenleri denenmiştir. Tampon olarak MES, 3-[sikloheksilamino]-1-propansülfonik asit (CAPS), 3-(sikloheksilamino)-2-hidroksi-1-propansülfonik asit (CAPSO), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-(2-etansülfonik asit) (HEPES), 3-(N-morfolino)propansülfonik asit (MOPS),  $Na_2HPO_4+NaOH$ ,  $CH_3COOH$  ve MA kullanılmış, kapiler kolon duvarının kaplanması için ise yüzey aktif madde olarak CTAB ve hekzadesitrimetilamonyum bromür (HTAB) ile denemeler gerçekleştirilmiştir. Düşük ( $<5$ ) ve yüksek ( $<7$ ) pH değerlerinde metabolitler için istenen pikler elde edilememiştir. Bu nedenle  $pK_a$  değerleri 5 ve 6 aralığına düşen tampon çözeltiler MES, MOPS, HEPES ve MA ile her iki metabolit için uygun pikler elde edilmiştir. Bu tampon çözeltiler karşılaştırıldığında pik yükseklikleri ve gürültü etkisi göze alındığında en iyi sonucun MA ile alındığı belirlenmiştir. HTAB ile yapılan denemelerde ise pikler belirlenemediğinden CTAB ile deneylere devam edilmesine karar verilmiştir. Bu ilk çalışmalar sonucunda SA ve MVA idrar örneklerine eklenerek idrar bileşenlerinin pikleri ile bir çakışma olup olmadığı kontrol edilmiştir. Önceki çalışmalarımızdan belirlediğimiz şartlara benzer şekilde 15 mM MA; 0,1 mM CTAB pH 6,5 olan bir tampon çözelti ile denemeler yapılmıştır. Bu ayırma tamponu ile SA ve MVA piklerinin idrardaki bileşenler ile örtüşmediği görülmüştür. Bu tampon bileşiminde SA ve MVA için dedeksiyon limitleri sırasıyla 0,696 mg/L ve 1,070 mg/L olarak belirlenmiştir. Sağlıklı çocukların idarları yaklaşık olarak 20 mg/L den düşük miktarlarda SA içermektedir. Hasta idrarlarının SA içeriği ise normal değer 2 ile 1500 kat arasındadır. Minimum miktarın ( $\approx 40$  mg/L) bizim belirlediğimiz dedeksiyon limitleri altında kalması nedeniyle duyarlılığı artırmak için bir örnek sıkıştırma

yöntemi kullanılmıştır. Örnek sıkıştırma yöntemi büyük hacimde örnek enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Örnek sıkıştırma yönteminin optimizasyonunda deneysel tasarım ile kullanılmıştır.

#### 6.3.1.1 Tarama tasarımı ile örnek sıkıştırma yöntemi için etkili faktörlerin bulunması

Örnek sıkıştırma yöntemi için etkili faktörlerin belirlenmesi adına bir tarama tasarımı kullanılmıştır. Önceki çalışmalarımızda test edilmiş veriler (Çalışma voltajı 28 kV, çalışma sıcaklığı 25°C) seçilmiştir. Bu tarama tasarımında tampon pH'ı, tampon konsantrasyonu, CTAB konsantrasyonu, enjeksiyon süresi ve enjeksiyon basıncından oluşan beş parametrenin pik yüksekliği ve ayırma gücü üzerindeki etkileri incelenmiştir. Seçilen faktörler ve bu faktörlere ait değerler Çizelge 6.9'da görüldüğü gibidir.

Çizelge 6.9: Çalışmada kullanılan faktörler ve seviyeleri.

| Değişken                | Minimum Değer (-1) | Maksimum Değer (+1) |
|-------------------------|--------------------|---------------------|
| MA (mmol/L)             | 5                  | 25                  |
| CTAB (mmol/L)           | 0,1                | 0,5                 |
| pH                      | 5,5                | 7,5                 |
| t <sub>inj</sub> (sn)   | 6                  | 40                  |
| P <sub>inj</sub> (mbar) | 50                 | 150                 |

Tarama tasarımı olarak kullanılan kısmi faktöriyel tasarım ile bir tasarım matrisi hazırlanmıştır. Faktörler ile etkileşimlerinin incelenmesi adına iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım ( $2^{5-1}=16$  deney) kullanılmıştır. Deneyler rastgele bir sıra ile gerçekleştirilmiştir. Deneysel tasarım analizleri Microsoft Excel 2016 ve Minitab 16 programları kullanılarak analiz edilmiştir. Seçilen değerler ile tasarlanan deney EK C Çizelge C.1'de verilmiştir.

Bu faktörlerden bazıları ayırma gücünü etkilerken, diğerleri örnek sıkıştırma etkisi üzerinde etkiye sahip olabileceğinden, yanıt değişkenleri ayırma gücü ve ortalama pik yüksekliği olarak belirlenmiştir. Minitab istatistik yazılımının veri analizinden elde

edilen bilgilerden yararlanılarak, her bir değişkenin önemi, hesaplanan yanıt değişkenine göre kararlaştırılmıştır. Çizelge 6.10'da de pik yüksekliği ( $R_1$ ) ve ayırma gücü ( $R_2$ ) için tarama tasarımından elde edilen etkili p değerleri görülmektedir.

**Çizelge 6.10:** Kısmi faktöriyel analiz sonuçları.

| Faktör        | p değeri |       |
|---------------|----------|-------|
|               | $R_1$    | $R_2$ |
| MA            | 0,006    | 0,024 |
| $P_{inj}$     | 0,029    | 0,007 |
| $t_{inj}$     | 0,007    | 0,007 |
| MA* $P_{inj}$ | 0,036    |       |
| MA* $t_{inj}$ | 0,040    |       |

Etkili faktörlerin belirlenmesi için  $p$ -değerinin anlamlılık düzeyinin 0,05 ten küçük olması gerekmektedir. Bu çalışmaların sonunda beş faktör üçe indirilerek  $p$  değerleri sırasıyla 0,05'ten küçük olduğundan tampon konsantrasyonu, enjeksiyon basıncı ve enjeksiyon süresi etkili faktörler olarak belirlenmiştir. Pik yüksekliğine MA'nın negatif,  $P_{inj}$  ve  $t_{inj}$ 'nin ise pozitif etkisi bulunmaktadır. Ayırma gücüne ise MA pozitif,  $P_{inj}$  ve  $t_{inj}$  ise negatif bir etkiye sahiptir.

### 6.3.1.2 Box-Behnken tasarımı ile optimizasyon

BBD ile örnek sıkıştırma yönteminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Tarama tasarımı ile belirlenen üç parametre; tampon konsantrasyonu, enjeksiyon süresi ve enjeksiyon basıncıdır. Bu üç parametrenin, öncelikle pik yüksekliğine ( $R_1$ ) olan etkileri yanıt yüzey metodu ile araştırılmıştır. CTAB konsantrasyonu, çalışma voltajı, sıcaklık ve tampon pH'ı sırasıyla 0,1 mM, 28 kV, 25 ° C ve 6,5 olarak ayarlanmıştır. BBD için faktör ve değerleri Çizelge 6.11'de verilmiştir. Bu faktörler kullanılarak BBD için tasarım matrisi Bölüm 3 Çizelge 3.4'e göre oluşturulmuştur.

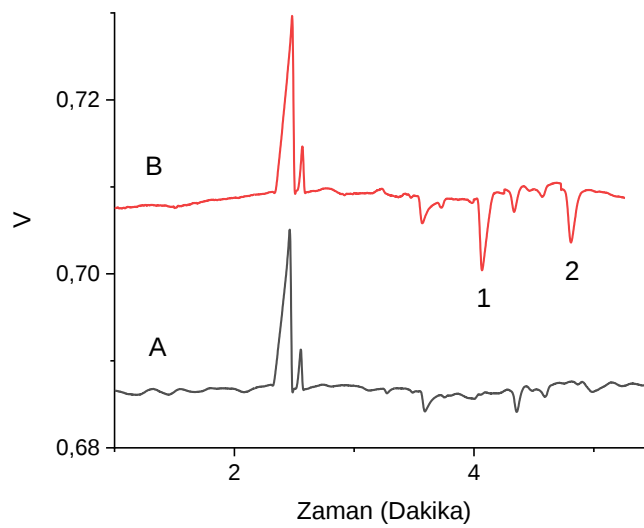
**Çizelge 6.11:** Çalışmada kullanılan faktörler ve seviyeleri.

| Faktörler        | Minimum Değer<br>(-1) | Orta Değer<br>(0) | Maksimum Değer<br>(+1) |
|------------------|-----------------------|-------------------|------------------------|
| MA (mmol/L)      | 5                     | 15                | 25                     |
| $t_{inj}$ (sn)   | 6                     | 23                | 40                     |
| $P_{inj}$ (mbar) | 50                    | 100               | 150                    |

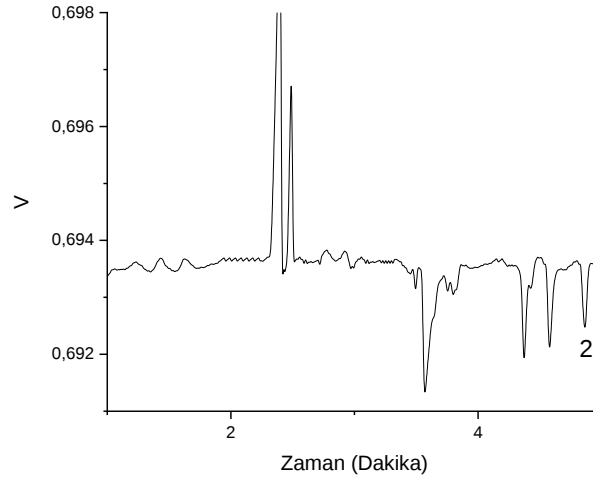
Deneyisel veriler çoklu regresyon analizi uygulanarak analiz edilmiştir. Yanıtlar ve faktörler arasındaki ilişkileri belirlemek için yanıt yüzey metodu kullanılmıştır. Daha fazla duyarlılık sağlayan koşullar, ikinci dereceden modellerle açıklanmaktadır. 0,0500'den küçük  $p$  değerleri, model terimlerinin anlamlı olduğunu gösterir. Bu durumda MA,  $P_{inj}$ ,  $t_{inj}$ ,  $MA \cdot P_{inj}$ ,  $MA \cdot t_{inj}$ ,  $MA^2$ ,  $P_{inj}^2$ ,  $t_{inj}^2$  önemli model terimleridir (Çizelge C.2). Uyum eksikliği için  $p$  değerinin 0,0500'den büyük olması saf hataya göre önemli olmadığını gösterir. Anlamlı olmayan uyum eksikliği iyidir ve modelin başarısını gösterir.

EK C Şekil C.1, her faktör çifti için model tarafından tahmin edilen yanıt yüzeylerini göstermektedir. Şekil C.2 ise her bir faktör için optimum değerleri göstermektedir. Bu yüzeylerde yanıt fonksiyonunun maksimum değeri aşağıdaki faktör değerlerinde bulunur: 10 mM MA, 114 mbar enjeksiyon basıncı ve 33 s enjeksiyon süresi. Bu optimum örnek sıkıştırma koşullarında dedeksiyon limitleri normal enjeksiyon şartlarındaki dedeksiyon limitlerine göre yaklaşık 5 kat geliştirilmiştir.

EK C Şekil C.3'te optimum koşulların pik yüksekliği ( $R_1$ ) ve ayırma gücüne ( $R_2$ ) etkisi görülmektedir. Elde edilen optimum koşullar ayırma gücünde bir azalma yaratmamıştır. Şekil 6.8'de optimum tampon koşullarında sağlıklı insan idrarı ve sağlıklı insan idrarına standart asit eklenmesiyle elde edilen elektroferogramlar Şekil 6.9'da ise farklı bir sağlıklı insanın idrarı görülmektedir.

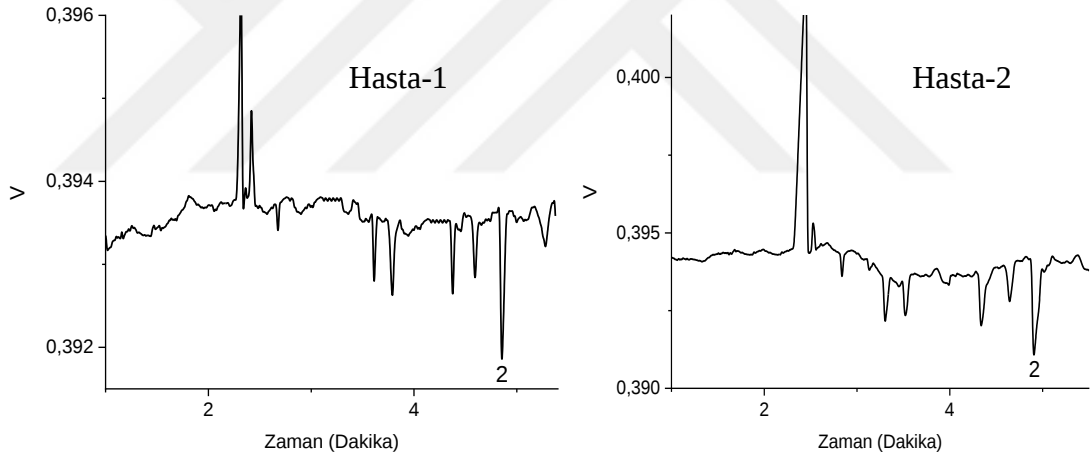


**Şekil 6.8:** A: Sağlıklı insan idrarı B: 5 mg/L standart asit eklenmiş sağlıklı insan idrarı 1: Mevalonik Asit 2: Sialik asit. Optimum ayırma koşulları: 10 mmol/L MA, 0,1 mmol/L CTAB ve pH=6,5.



**Şekil 6.9:** Sağlıklı insan idrarına ait elektroferogram. Optimum ayırma koşulları: 10 mmol/L MA, 0,1 mmol/L CTAB ve pH=6,5.

Şekil 6.10’da ise hasta idrarlarına ait elektroferogramlar görülmektedir.



**Şekil 6.10:** İki farklı hasta idrarında SA için elektroferogramlar.

### 6.3.2 Metot validasyonu

#### 6.3.2.1 Kalibrasyon

Yöntem için doğrusal kalibrasyon aralıkları ve  $R^2$  değerleri Çizelge 6.12’de özetlenmiştir.

**Çizelge 6.12:** Su ve idrar ortamındaki doğrusal çalışma alanı.

| Bileşik | Kalibrasyon eğrisi        | R <sup>2</sup> | Doğrusal aralık(mg/L) |
|---------|---------------------------|----------------|-----------------------|
| MVA     | $y = 0,0350 x + 0,0085$   | 0,9991         | 0,5-100               |
|         | $y = 0,0351 x + 0,1191^*$ | 0,9993         |                       |
| SA      | $y = 0,0312 x + 0,0409$   | 0,9990         | 0,8-100               |
|         | $y = 0,0293 x + 0,0506^*$ | 0,9989         |                       |

\*idrar ortamı

#### 6.3.2.2 Matriks etkisi

Matriks etkisi sulu çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisi ile idrar içeren çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisi eğimlerinin oranlarından hesaplanmıştır. Matriks etkisi MVA ve SA için sırasıyla %-0,29, %6,09 olarak bulunmuştur.  $\pm 10$  aralığına giren değerler ihmal edilebilir.

#### 6.3.2.3 LOD ve LOQ değerleri

LOD değerleri sinyal ve gürültü oranının 3 katı, LOQ değerleri de sinyal ve gürültü oranının 10 katı olacak şekilde hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerleri Çizelge 6.13'te görülmektedir.

**Çizelge 6.13:** LOD ve LOQ değerleri.

|     | LOD<br>(mg/L) | LOQ<br>(mg/L) |
|-----|---------------|---------------|
| MVA | 0,145         | 0,483         |
| SA  | 0,223         | 0,743         |

#### 6.3.2.4 Kesinlik ve geri kazanım

Metodun kesinlik değerleri Çizelge 6.14'te verilmiştir. Doğruluk ise geri kazanım deneyleri ile değerlendirilmiştir. Geri kazanım çalışmalarından elde edilen sonuçlar

Çizelge 6.15'te özetlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre metot iyi bir tekrarlanabilirliğe ve geri kazanıma sahiptir.

**Çizelge 6.14:** Metodun kesinlik değerleri.

|     | Tekrarlanırlık gün içi<br>(% RSD) n=7 |       | Tekrarlanırlık günler arası<br>(% RSD)n=7x3 |       |
|-----|---------------------------------------|-------|---------------------------------------------|-------|
|     | A                                     | t     | A                                           | t     |
| MVA | 3,164                                 | 0,132 | 5,132                                       | 0,252 |
| SA  | 4,378                                 | 0,139 | 6,275                                       | 0,268 |

A: alan t:göç zamanı

**Çizelge 6.15:** Geri kazanım değerleri (n=3).

| Analit | Eklenen<br>konsantrasyon (mg/L) | Geri kazanım<br>(%) ±ss |
|--------|---------------------------------|-------------------------|
| MVA    | 10,00                           | 99,64 ± 1,84            |
|        | 20,00                           | 101 ± 1                 |
|        | 40,00                           | 102 ± 1                 |
| SA     | 9,00                            | 98,72 ± 1,34            |
|        | 18,00                           | 99,25 ± 1,56            |
|        | 32,00                           | 103 ± 1                 |

ss: standart sapma

### 6.3.3 Yöntemin hasta idrarlarında SA tayinine uygulanması

Geliştirilen ve optimize edilen metot üç sağlıklı insan ve iki hastanın idrar örneklerine uygulanmıştır. Her bir örnek cihaza verilmeden önce filtre edilmiştir. Örnekler optimize şartlar altında 3 kere analiz edilmiştir. Hiçbir idrar örneğinde MVA tespit edilememiştir. SA ise iki sağlıklı insanda ve iki hasta idrarında tayin edilmiştir. Sağlıklı kişilerde sialik asit  $10,3 \pm 0,8$  ve  $61,8 \pm 0,7$  mg/L hastalarda ise Hasta 1'de  $1861 \pm 22$  mg/L, Hasta 2'de ise  $472 \pm 6$  mg/L olarak bulunmuştur.

## 6.4 Tartışma ve Yorum

Bu tez çalışmasında, organik asit metabolitlerinin (MA, MMA, EMA, MVA ve SA) kompleks idrar numunelerinden ayrımı ve tayini için basit, hızlı, hassas ve pratik üç CE- C<sup>4</sup>D yöntemi geliştirilmiştir: (1) EMA'nın tayini; (2) MA, MMA ve EMA'nın aynı anda tayini, (3) MVA ve SA'nın tayini.

İdrar numunelerindeki MA, MMA, EMA, SA ve MVA analizleri genellikle pahalı MS cihazı içeren GC [109,115,116] ve LC [27,39,40,117] ile gerçekleştirilir. Bu yöntemler ile elde edilen LOD değerleri 0,0044 ile 0,016 mg/L arasında rapor edilmiştir [113,115-117,27,39,40]. Bu değerler bu doktora çalışmasında elde edilen LOD değerlerinden daha düşüktür. Ancak bu yöntemler biyolojik maddeler için zahmetli bir türevlendirme ve çöktürme gibi karmaşık, zaman alıcı numune hazırlama adımları içermektedir. Bu sorun CE yöntemi ile çok daha basit bir şekilde çözülür. Numune hazırlanması için sadece süzme ve seyreltme işlemi yeterlidir, türevlendirme basamağına da gerek yoktur. Organik asitler doğrudan doğal formlarında belirlenebilirler.

C<sup>4</sup>D özellikle hızlı göç eden ve kromofor grubu olmayan analitler için hassas bir dedeksiyon yöntemidir. CE de kullanılan UV ve amperometrik dedeksiyonla karşılaştırdığında C<sup>4</sup>D çok daha basit ve sağlam bir cihaz olma avantajına sahiptir. UV dedeksiyon daha karmaşık ve pahalı iken, diğer bir elektrokimyasal dedeksiyon tekniği olan amperometride kapiler ve elektrotun hassas olarak hizalanması zordur ayrıca elektrot kirlenmesi kararlılığı etkilemektedir. Bu nedenle amperometrik dedektör rutin kullanımda sorunlar yaratır.

İdrarda EMA tayini için ilk kez bu doktora çalışmasında bir CE-C<sup>4</sup>D yöntemi geliştirilmiş ve literatüre kazandırılmıştır [118]. Literatürde MA, MMA ve EMA'nın aynı anda tayini için LC-MS yöntemi ile bir çalışma rapor edilmiştir [27]. Bu doktora çalışması ile MA, MMA ve EMA'nın aynı anda idrardaki tayinleri için CE-C<sup>4</sup>D yöntemi geliştirilmiştir.

Bu tez çalışmasının son kısmında ise idrarda MVA ve SA birlikte tayini için ilk kez bir CE-C<sup>4</sup>D yöntemi geliştirilmiştir. Literatürde MVA tayini için kullanılan CE-C<sup>4</sup>D yöntemi bulunmamaktadır. SA'nın idrardaki tayini için ise CE ile bileştirilmiş UV [29-31], MS [33,34] ve amperometrik [35] dedeksiyon tekniklerini kullanan

elektroforetik yöntemler rapor edilmiştir. Bu yöntemlerin LOD değerleri 0,309 ile 25,05 mg/L arasında tespit edilmiştir. En düşük LOD değeri CE-MS yöntemi ile tespit edilmiştir. Bu doktora çalışmasında SA için tespit edilen LOD değeri CE-MS yönteminden daha düşük olarak belirlenmiştir [33].

Geliştirilen yöntemler, organik asitler için hasta idrarının hızlı (3-5 dakika) bir şekilde taranmasına olanak sağlar. Ayrıca, yöntemlerin yüksek ayırma gücü sayesinde, idrardaki MA, MMA, EMA, MVA ve SA seviyeleri basit bir şekilde belirlenebilmektedir. Geliştirilen yöntemlerin lineer aralığı yüksek regresyonla belirlenmiştir. Yöntemler idrar numunelerinde MA, MMA, EMA, MVA ve SA'nın analiz edilmesini sağlayan iyi bir tekrarlanabilirlik ve seçicilik göstermiştir. Geri kazanım değerleri kabul edilen sınırlar içinde bulunmuştur. Elde edilen deneysel sonuçlar ile CE-C<sup>4</sup>D yönteminin idrar örneklerinde MA, MMA, EMA, MVA ve SA'nın tayini için alternatif yöntem olarak uygunluğu gösterilmiştir.

Geliştirilen yöntemlerin en önemli avantajı numune hazırlanması için sadece, süzme ve seyreltme işleminin yeterli olmasıdır. Ayrıca yöntemler organik çözücüler içermediği için çevre dostudur. CE-C<sup>4</sup>D yönteminin diğer bir avantajı spektrofotometrik dedeksiyonla karşılaştırıldığında daha yüksek duyarlılığı sahip olmasıdır.

CE-C<sup>4</sup>D ile organik asit tayini, klinik uygulamalar için önemli bir potansiyele sahiptir, bu teknik, hem doğumsal metabolik bozuklukların hızlı taranması hem de hastaların yaşamsal belirtilerin izlenmesi ve sağlık durumunun değerlendirilmesi için kullanılabilir. Bu nedenle geliştiren yöntemler, klinik uygulamalarda geniş uygulama alanı bulabilir.



## KAYNAKLAR

- [1] **Onat, T.** (1996). *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları*, İstanbul. Eksen Yayınları, Cilt 1, s:294- 319.
- [2] **Hasanoğlu, E., Düşünsel R., Bideci, A.** (2010). *Temel Pediatri*, Ankara, Güneş Tıp Kitabevi, s: 515-61
- [3] **Nyhan, W. L., Ozand, P. T.** (1998). *Atlas of Metabolic Diseases*, London, Chapman & Hall Medical, p: 1,153, 646.
- [4] **Vaidyanathan, K., Narayanan, M. P., Vasudevan, D. M.** (2011). Organic Acidurias: An Updated Review, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26(4), 319–325.
- [5] **Ozand, P. T., Gascon, G. G.** (1991). Topical Review Article: Organic Acidurias: A Review. Part 1, *Journal of Child Neurology*, 6 (3), 196-219.
- [6] **Kara, A.** (2012). *Pediyatrik Metabolizma Hastalıkları ve Beslenme Polikliniğinde Tanı Alan veya Takibe Giren Kalıtsal Metabolik Hastalığı Olan Hastaların Tanılarının Klinik ve Laboratuar Bulgularının Analizi ile Takip Sonuçlarının Değerlendirilmesi*, (Uzmanlık Tezi). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana.
- [7] **d. Quinn, T. He, Fu, E., Wang, Y.K.** (1999). Analysis of diagnostic metabolites by capillary electrophoresis–mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 727 (1-2), 43-52.
- [8] **Duez, P., Kumps, A., Mardens, Y.** (1996). GC-MS profiling of urinary organic acids evaluated as a quantitative method, *Clinical Chemistry*, 42 (10), 1609-1615.
- [9] **Hagen, T., Korson, M. S., Sakamoto, M., Evans, J. E.** (1999). A GC/MS/MS screening method for multiple organic acidemias from urine specimens, *Clinica Chimica Acta*, 283 (1-2), 77-88.
- [10] **Lehotay, D.C., Hall, P., Lepage, J., Eichhorst, J.C., Etter, M.L., Greenberg, C. R.** (2011). LC–MS/MS progress in newborn screening, *Clinical Biochemistry*, 44 (1), 21-31.
- [11] **Blom, H. J., van Rooij, A., Hogeveen, M.** (2007). A simple high-throughput method for the determination of plasma methylmalonic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45 (5) ,645-650.
- [12] **Baena, B., Cifuentes, A., Barbas, C.** (2005). Analysis of carboxylic acids in biological fluids by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 26 (13), 2622–2636.
- [13] **Klampfl, C. W.** (2007). Determination of organic acids by CE and CEC methods, *Electrophoresis*, 28 (19), 3362–3378.

- [14] **Galli, V., García, A., Saavedra, L., Barbas, C.** (2003). Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples, *Electrophoresis*, 24 (12-13), 1951–1981.
- [15] **Elbashir, A. A., Aboul-Enein, H. Y.** (2012). Recent advances in applications of capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C4D): An update, *Biomedical Chromatography*, 26 (8), 990-1000.
- [16] **Kubáň, P., Hauser, P. C.** (2008). A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection, *Analytica Chimica Acta*, 607(1), 15-29.
- [17] **Sonlinova, V., Kasicka, V.** (2006). Recent applications of conductivity detection in capillary electrophoresis, *Journal of Separation Science*, 29 (12), 1743-1762.
- [18] **Ramautar, R., Demirci, A., de Jong, G. J.** (2006). Capillary electrophoresis in metabolomics, *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (5) 455-466.
- [19] **Cansever, M. Ş., Erim, F. B.** (2005). Determination of urinary succinylacetone by capillary electrophoresis for the diagnosis of tyrosinemia type I, *Journal of Chromatography B*, 818 (2), 309–311.
- [20] **Öztekin, N., Balta, G. S., Cansever, M. Ş.** (2018). Determination of homogentisic acid in urine for diagnosis of alcaptonuria: Capillary electrophoretic method optimization using experimental design, *Biomedical Chromatography*, 32 (7), 4216.
- [21] **Arellano, M., Couderc, F., Puig, L.** (1997). Simultaneous separation of organic and inorganic acids by capillary zone electrophoresis. Application to wines and fruit juices, *American Journal of Enology and Viticulture*, 48 (4), 408–412.
- [22] **Wu, C. H., Lo, Y. S., Lee, Y.H., Lin, T.I.** (1995). Capillary electrophoretic determination of organic acids with indirect detection, *Journal of Chromatography A*, 716, 291–301.
- [23] **Öztekin, N., Erim, F. B.** (2001). Simultaneous determination of inorganic anions and organic acids by capillary electrophoresis, *Turkish Journal of Chemistry*, 25 (2), 145–150.
- [24] **T. Soga, T., Ross, G. A.** (1999). Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 837, 231–239.
- [25] **Yang, W.C., Regnier, F.E.** (2008). Comparative metabolite profiling of carboxylic acids in rat urine by CE-ESI MS/MS through positively pre-charged and <sup>2</sup>H-coded derivatization, *Electrophoresis*, 29 (22), 4549–4560.
- [26] **Tuma, P., Samcova, E., Stulík, K.** (2011). Determination of the spectrum of low molecular mass organic acids in urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity and ultraviolet photometric detection - an efficient tool for monitoring of inborn metabolic disorders, *Analytica Chimica Acta*, 685 (1), 84-90.

- [27] **Ambati, C.S.R., Yuan, F., Abu-Elheiga, L.A., Zhang, Y., Shetty, V.** (2017). Identification and Quantitation of Malonic Acid Biomarkers of In-Born Error Metabolism by Targeted Metabolomics, *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 28 (5), 929-938.
- [28] **Ellum, J., Dollekamp, H., Brunsvig, A., Gislefoss, R.** (1997). Diagnostic applications of chromatography and capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B*, 689 (1), 155-164 .
- [29] **Dong, X. L., Xu, X., Han, F. T., Ping, X. Y., Yuang, X. L., Lin, B. C.** (2001). Determination of sialic acids in the serum of cancer patients by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 22, 2231.
- [30] **Strousopoulou, K., Militopoulou, M., Stagiannis, K., Lamari, F. N., Karamanos, N. K.** (2002). A capillary zone electrophoresis method for determining N-acetylneuraminic acid in glycoproteins and blood sera, *Biomedical Chromatography*, 16 (2), 146-150.
- [31] **Taga, A., Sugimura, M., Suzuki, S., Honda, S.** (2002). Estimation of sialic acid in a sialoglycan and a sialoglycoprotein by capillary electrophoresis with in-capillary sialidase digestion, *Journal of Chromatography A*, 954 (1-2), 259-266.
- [32] **Szabo, Z., Bones, J., Guttman, A., Glick, J., Karger, B. L.** (2012). Sialic acid speciation using capillary electrophoresis: optimization of analyte derivatization and separation, *Analytical Chemistry*, 84 (18), 7638-7642.
- [33] **Che, F. Y., Shao, X. X., Wang, K. Y., Xia, Q. C.** (1999). Characterization of derivatization of sialic acid with 2-aminoacridone and determination of sialic acid content in glycoproteins by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography--ion trap mass spectrometry, *Electrophoresis*, 20 (14), 2930-2937.
- [34] **Ortner, K., Buchberger, W.** (2008). Determination of sialic acids released from glycoproteins using capillary zone electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry, *Electrophoresis*, 29 (10), 2233-2237.
- [35] **Zheng, Y., Wang, T., Kong, J., Ma, Y., Heng, Y., Ren, Y., Ye, J., Chu, Q.** (2016). Electrochemical Determination of Salivary N-Acetylneuraminic Acid by Miniaturized Capillary Electrophoresis Coupled with Sample Stacking, *Chinese Journal of Chemistry*, 34 (9), 925-930.
- [36] **Lamari, F. N., Karamanos, N. K.** (2002). Separation methods for sialic acids and critical evaluation of their biologic relevance, *Journal of Chromatography B*, 781 (1-2), 3-19.
- [37] **Shallan, A., Guijt, R., Breadmore, M.** (2013). Capillary Electrophoresis: Basic Principles, *Encyclopedia of Forensic Sciences*, Second Edition, Academic Press, JA Siegel and PJ Saukko (ed), United States of America, 549-559.
- [38] **Lunte, S. M., Radzik, D. M.** (1996). Chapter 1 Principles of capillary electrophoresis, *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2, 3-21.

- [39] **Skoog, D.A., Holler, F.J., and Nieman, T.A.** (1998). *Enstrümantal Analitik İlkeleri*, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- [40] **A.M. Stalcup, A.M.** (2006). Chapter 8- Chiral separations by capillary electrophoresis, *Chiral Analysis*, 241-275.
- [41] **Heiger, D.** (2000). *High Performance Capillary Electrophoresis An Introduction*, Agilent Technologies, Germany.
- [42] **See, H. H., Ali, N. A.** (2019). Capillary Electrophoresis: Principles of Capillary, *Electrophoresis*, 328-333.
- [43] **Hajba, L., Guttman, A.** (2017). Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins, *Trends in Analytical Chemistry*, 90, 38-44.
- [44] **Righetti, P.G., Gelfi, C., Verzola, B., Castelletti, L.** (2001). The state of the art of dynamic coatings, *Electrophoresis*, 22 (4), 603-611.
- [45] **Reiter, R.J.** (1991). Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions, *Endocrine Reviews*, 12 (2), 151-180.
- [46] **Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T.** (1996). Capillary Electrophoresis Methods and Potentials, Vieweg, Germany.
- [47] **Cansever, M.Ş.** (2010). *Metabolik hastalıkların teşhisinde kapiler elektroforez*, (Doktora tezi) İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [48] **Breadmore, M. C.** (2009). Electrokinetic and hydrodynamic injection: Making the right choice for capillary electrophoresis, *Bioanalysis*, 1 (5), 889-894.
- [49] **Osbourn, D., M., Weiss, D., J., Lunte, C.E.** (2000). Online Preconcentration methods for Capillary Electrophoresis, *Electrophoresis*, 21, 2768-2779.
- [50] **Lian, D. S., Zhao, S. J., Li, J. ve Li, B. L.** (2014). "Progress in stacking techniques based on field amplification of capillary electrophoresis," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 6129-6150.
- [51] **Li, S.F.Y.** (1992). Capillary Electrophoresis Principles, Practice and Applications, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- [52] **Simpson, S. L., Quirino, J. P. ve Terabe, S.** (2008). "On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis: Fundamentals and applications," *Journal of Chromatography A*, 1184, 504-541.
- [53] **Voeten, R. L.C., Ventouri, I. K., Haselberg, R., Govert W. Somsen, G. W.** (2018). Capillary Electrophoresis: Trends and Recent Advances, *Analytical Chemistry*, 90 (3), 1464-1481.
- [54] **Kubáň, P., Hauser, P. C.** (2018). 20th anniversary of axial capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 311-321.
- [55] **Kubáň, P., Hauser, P. C.** (2020). Capacitively coupled contactless conductivity detection for analytical techniques – Developments from 2018 to 2020, *Journal of Chromatography A*, 1632, 461616.

- [56] **Zemann, A.J., Schnell, E., Volgger, D., Bonn, G.K.** (1998). Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 70 (3), 563-567.
- [57] **Fracassi da Silva, J.A., do Lago, C.L.** (1998). An oscillometric detector for capillary electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 70 (20), 4339-4343.
- [58] **Mai, T. D.** (2011). *Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection and Sequential Injection Analysis in Capillary Electrophoresis and Capillary Electro-Chromatography*, (PhD Thesis), University of Basel, Faculty of Philosophy and Natural Sciences, Basel.
- [59] **Altria, K. D.** (1999). Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 856 (1-2), 443-463.
- [60] **Kalogiouri, N.P., Alizadeh, R., Dasenaki, M.E., Thomaidis, N.S.** (2020). Application of High Resolution Mass Spectrometric methods coupled with chemometric techniques in olive oil authenticity studies - A review, *Analytica Chimica Acta*, 1134, 150-173.
- [61] **Antony, J.** (2014). *Design of Experiments for Engineers and Scientists*, Second Edition, Elsevier, New York, United States of America.
- [62] **Bowden, G.D., Pichler, B.J. Maurer, A.** (2019). A Design of Experiments (DoE) Approach Accelerates the Optimization of Copper-Mediated <sup>18</sup>F-Fluorination Reactions of Arylstannane, *Scientific Reports*, 9 (1), 11370.
- [63] **Kechagias, J.D., Aslani, K.E., Fountas, N.A., Vaxevanidis, N.M., Manolakos, D.E.** (2020). A comparative investigation of Taguchi and full factorial design for machinability prediction in turning of a titanium alloy, *Measurement*, 151, 107213.
- [64] **Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M.** (2009). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, John Wiley & Sons, New Jersey.
- [65] **Otto, M.** (1999) *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, Weinheim, New York.
- [66] **Hanrahan Eds. G., Gomez F. A.** (2010). *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- [67] **Hanrahan G., Montes R., and Gomez F.A.** (2008). Chemometric experimental design based optimization techniques in capillary electrophoresis: a critical review of modern applications, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 390 (1), 169–179.
- [68] **Morgan, E.**, (1991). *Chemometrics: Experimental Design*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- [69] **Pekel, N., şahiner, N., Güven, O., Rzaev, Z.M.O.** (2001). Synthesis and characterization of N-vinylimidazole-ethyl methacrylate copolymers and determination of monomer reactivity ratios, *European Polymer Journal*, 37, 2443-2451.

- [70] **Khatib, I., Chow, M.Y.T, Ruan, J., Cipolla, D., Chan, H.K.** (2021). Modeling of a spray drying method to produce ciprofloxacin nanocrystals inside the liposomes utilizing a response surface methodology: Box-Behnken experimental design, *International Journal of Pharmaceutics*, 597, 120277.
- [71] **Belgada, A., Charik, F.Z., Achiou, B.** (2021). Optimization of phosphate/kaolinite microfiltration membrane using Box–Behnken design for treatment of industrial wastewater, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9 (1), 104972.
- [72] **Chaker, H., Ameer,N., Saidi-Bendahou K., Djennas, M., Fourmentin, S.,** (2021). Modeling and Box-Behnken design optimization of photocatalytic parameters for efficient removal of dye by lanthanum-doped mesoporous TiO<sub>2</sub>, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9 (1), 104584.
- [73] **Chalmers, R.A ,Lawson, A.M.** (1982). *Organic acids in man, Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias*. 1st ed, London: Chapman and Hall.
- [74] **Scriver, C.R, Beaudet, A., Sly, W.S .,Valle, D.** (2001). *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (8th ed), McGraw-Hill, New York.
- [75] **Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., Gaidzinski, D., Dutra Filho, C.S.** (1986). Detection of inborn errors of metabolism in patients of paediatric intensive care units of Porto Alegre, Brazil. Comparison between the prevalence of such disturbances in a selected and an unselected sample, *Brazilian Journal of Genetics*, 9, 331-340.
- [76] **Hoffmann, G.F.** (1994). Selective screening for inborn errors of metabolism: past, present and future, *European Journal of Pediatrics*, 153 (Suppl 1), 562-567.
- [77] **Lehotay, D.C., Clarke, J.T.** (1995). Organic acidurias and related abnormalities, *Critical Reviews Clinical Laboratory Sciences*, 32 (4), 377-429.
- [78] **Chapel-Crespo, C., Gavrilova, D., Sowaa, M., Myersc, J., Salvatored, D.L., Lynne, H., ..... Abdenur, J.E.** (2019). Clinical, biochemical and molecular characteristics of malonyl-CoA decarboxylase deficiency and long-term follow-up of nine patients, *Molecular Genetics and Metabolism*, 128 (1-2), 113–121.
- [79] **Brown, G. K., Scholem, R.D., Bankier, A., Danks, D.M.** (1984). Malonyl coenzyme A decarboxylase deficiency, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 7 (1), 21-26.
- [80] **Ersoy, M., Akyol, M.B., Ceylaner, S., Çakır Biçer, N.** (2017). A novel frameshift mutation of malonyl-CoA decarboxylase deficiency: clinical signs and therapy response of a late-diagnosed case, *Clinical Case Reports*, 5 (8), 1284-1288.

- [81] **Froese, D.S., Forouhar, F., Tran, T.H., Vollmar, M., Kim, Y.S., Lew, S., .... Tong, L.** (2013). Crystal Structures of Malonyl-Coenzyme A Decarboxylase Provide Insights into Its Catalytic Mechanism and Disease-Causing Mutations, *Structure*, 21 (7), 1182–1192.
- [82] **Gregg, A. R., Warman, A. W., Thorburn, D. R., O'Brien, W. E.** (1998). Combined malonic and methylmalonic aciduria with normal malonyl-coenzyme A decarboxylase activity: A case supporting multiple aetiologies, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 21 (4), 382-390.
- [83] **Celato, A., Mitola, C., Tolve, M., Giannini, M.T., De Leo, S., Carducci, C., Carducci, C., Leuzzi, V.** (2013). A new case of malonic aciduria with a presymptomatic diagnosis and an early treatment, *Brain and Development*, 35 (7), 675-80.
- [84] **Mc Guire, P.J., Lim-Melia, E., Diaz, G.A., Raymond, K., Larkin, A., Wasserstein, M.P., Sansaricq, C.,** (2008). Combined liver-kidney transplant for the management of methylmalonic aciduria: a case report and review of the literature, *Molecular Genetics and Metabolism*, 93 (1), 22–29.
- [85] **Kido, J., Mitsubuchi, H., Sakanashi, M., Matsubara, J., Matsumoto, S., Sakomoto, R., Endo, F., Nakamura, K.** (2017). Pulmonary artery hypertension in methylmalonic acidemia, *Hemodialysis International*, 21 (2), 25-29.
- [86] **Hirotsu, A., Kusudo, E., Mori, N., Miyai, Y., Suzuki, K., Kawamoto, S., Fukuda, K.,** (2018). Successful perioperative management of living-donor liver transplantation for a patient with severe methylmalonic acidemia: a case report, *Journal of A Clinical Reports*, 4 (1), 83.
- [87] **Olukman, Ö., Çalkavur, Ş., Gökaslan, F., Kılıç, F. K., Onursal, Y., Atlhan, F.** (2011). Metil malonik asidemili bir yenidoğan olgusu, *İzmir Dr. Behçet Uz. Çocuk Hast. Dergisi*, 1 (2), 93-96.
- [88] **Ünalp, A., Uran, N., Özmen, D., Özcan, T., Dizdärer, C.** (2008). Metilmalonik Asidemiye Bağlı Optik Sinir Tutulumu: Bir Olgu Sunumu, *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 15 (4) 283-285.
- [89] **Nicolaides, P., Leonard, J., Surtees, R.** (1998). Neurological outcome of methylmalonic acidemia, *Archives of Disease in Childhood*, 78 (6), 508–512.
- [90] **Acquaviva, C., Benoist, J.F., Pereira, S., Callebaut, I., Koskas, T., Porquet, D., Elion, J.** (2005). Molecular Basis of Methylmalonyl-CoA Mutase Apoenzyme Defect in 40 European Patients Affected by mut1 and mut-Forms of Methylmalonic Acidemia: Identification of 29 Novel Mutations in the MUT Gene, *Human Mutation*, 25 (2), 167-176.
- [91] **Manoli, I., Sloan, J.L., Venditti, C.P.** (2005). Isolated Methylmalonic Acidemia, *Gene Reviews [Internet]*, 1993–2021, Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1231/>.
- [92] **Haijes, H.A., van Hasselt, P.M.** (2019). Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 2: Treatment strategies, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42 (5), 745-761.

- [93] **Wesół-Kucharska, D., Kaczor, M., Pajdowska, M., vel Emczyńska-Seliga, E.E., Bogdańska, A., Kozłowski, D., ..... Rokicki, D.** (2020). Clinical picture and treatment effects in 5 patients with Methylmalonic aciduria related to MMAA mutations, *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 22, 100559.
- [94] **Zafeiriou, D. I., Augoustides-Savvopoulou, P., Haas, D., Smet, J., Triantafyllou, P., Vargiami, E., ..... Gregersen, N.** (2007). Ethylmalonic encephalopathy: Clinical and biochemical observations. *Neuropediatrics*, 38 (2), 78–82.
- [95] **Tiranti, V., D'Adamo, P., Briem, E., Ferrari, G., Mineri, R., Lamantea, E., ..... Zeviani, M.** (2004). Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein, *The American Journal of Human Genetics*, 74 (2), 239–252.
- [96] **Tiranti, V., Zeviani, M.** (2013). Altered sulfide (H<sub>2</sub>S) metabolism in ethylmalonic encephalopathy, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5 (1), a011437.
- [97] **Grosso, S., Mostardini, R., Farnetani, M. A., Molinelli, M., Berardi, R., Dionisi-Vici, C., ..... Balestri, P.** (2002). Ethylmalonic encephalopathy: Further clinical and neuroradiological characterization, *Journal of Neurology*, 249 (10), 1446–1450.
- [98] **Garcia-Silva, M. T., Ribes, A., Campos, Y., Garavaglia, B., Arenas, J.** (1997). Syndrome of encephalopathy, petechiae, and ethylmalonic aciduria, *Pediatric Neurology*, 17 (2), 165–170.
- [99] **Di Meo, I., Lamperti, C., Tiranti, V.** (2017). Ethylmalonic Encephalopathy, *Gene Reviews [Internet]*, Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453432/>.
- [100] **Favier, L., Schulert, G.** (2016). Mevalonate kinase deficiency: current perspectives, *The Application of Clinical Genetics*, 2016 (9), 101-110.
- [101] **Galeotti, C., Georgin-Lavialle, S., Sarraey, G., Touitou, I., Koné-Paut, I.** (2018). Mevalonate kinase deficiency in 2016, *La Revue de Medecine Interne*, 39 (4), 265-270.
- [102] **Mulders-Manders, C.M., Simon, A.** (2015). Hyper-IgD syndrome/mevalonate kinase deficiency: what is new?, *Seminars in Immunopathology*, 37 (4), 371–376.
- [103] **Esposito, S., Ascolese, B., Senatore, L., Bosis, S., Verrecchia, E., L Cantarini, L., Rigante, D.** (2014). Current advances in the understanding and treatment of mevalonate kinase deficiency, *Int J Immunopathol Pharmacol*, 27 (4), 491-498.
- [104] **Jeyaratnam, J., Frenkel, J.** (2020). Management of Mevalonate Kinase Deficiency: A Pediatric Perspective, *Frontiers in Immunology.*, 11, 1150.
- [105] **Rafiq, N.K., Lachmann, H.J., Joensen, F.** (2018). Tocilizumab for the Treatment of Mevalonate Kinase Deficiency, *Case Reports in Pediatrics*, 2018 (12), 1-6.

- [106] **Aula, N., Aula, P.** (2006). Prenatal diagnosis of free sialic acid storage disorders (SASD), *Prenatal Diagnosis*, 26 (8), 655-658.
- [107] **Helip-Wooley, A., Kleta, R., Gahl, W.** (2007). Lysosomal Free Sialic Acid Storage Disorders: Salla Disease and ISSD, *Lysosomal Storage Disorders*, Springer, Boston, MA., 499-511.
- [108] **Barmherzig, R., Bullivant, G., Cordeiro, D., Sinasac, D.S., Blaser, S., Mercimek Mahmutoglu, S.** (2017). A New Patient With Intermediate Severe Salla Disease With Hypomyelination: A Literature Review for Salla Disease, *Pediatric Neurology*, 74, 87-91.
- [109] **Adams, D., Wasserstein, M.** (2003). Free Sialic Acid Storage Disorders, *Gene Reviews* [Internet], Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1470/>.
- [110] **Belin, G. K., Krahenbuhl, S., Hauser, P. C.** (2007). Direct determination of valproic acid in biological fluids by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Journal of Chromatography B*, 847 (2), 205-209.
- [111] **Law, W. S., Zhao, J. H., Hauser, P. C., Li, S. F. Y.** (2007). Capillary electrophoresis with capacitively contactless conductivity detection for low molecular weight organic acids in different samples, *Journal of Separation Science*, 30 (18), 3247–3254.
- [112] **Zhao, S., Yin, D., Du, H., Tian, X., Chen, Y., Zhang, W., Yu, A., Zhang, S.** (2018). Determination of oxalate and citrate in urine by capillary electrophoresis using solid-phase extraction and capacitively coupled contactless conductivity based on an improved mini-cell. *Journal of Separation Science*, 41 (12), 2623–2631.
- [113] **Naccarato, A., Gionfriddo, E., Elliani, R., Sindona, G., Tagarelli, A.** (2014). A fast and simple solid phase microextraction coupled with gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method for the assay of urinary markers of glutaric acidemia. *Journal of Chromatography A*, 1372C, 253–259.
- [114] **HMDB 4.0: the Human Metabolome Database Version 4.0**, <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000622>
- [115] **Hušek, P., Švageraa, Z., Hanzlikova, D., Řimnáčková, L., Zahradníčková, H., Opekarova, I., Šimek, P.** (2016). Profiling of urinary amino-carboxylic metabolites by in-situ heptafluorobutyl chloroformate mediated sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1443, 211-232.
- [116] **Woollen, B.H., Holme, P.C., Northway, W.J., Martin, P.D.** (2001). Determination of mevalonic acid in human urine as mevalonic acid lactone by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 760, 179-184.
- [117] **Kindt, E., Szekely-Klepser, G., Fountain, S.T.** (2011). The validation of a simple LC/MS/MS method for determining the level of mevalonic acid in human plasma, *Biomedical Chromatography*, 25 (3), 323–329.

- [118] **Özçelik, S., Öztekin, N., Kıyıkım, E., Cansever, M.Ş., Aktuğlu-Zeybek, A.Ç.** (2020). Capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection for the determination of urinary ethylmalonic acid for the diagnosis of ethylmalonic aciduria, *Journal of Separation Science*, 43 (7), 1365-1371.



## **EKLER**

**EK A:** İdrarda Etilmalonik Asit Tayini İçin Sonuç Çizelge ve Grafikleri

**EK B:** İdrarda Malonik, Metilmalonik ve Etilmalonik Asit Eşzamanlı Tayini İçin Sonuç Çizelge ve Grafikleri

**EK C:** İdrarda Sialik ve Mevalonik Asit Eşzamanlı Tayini İçin Sonuç Çizelge ve Grafikleri

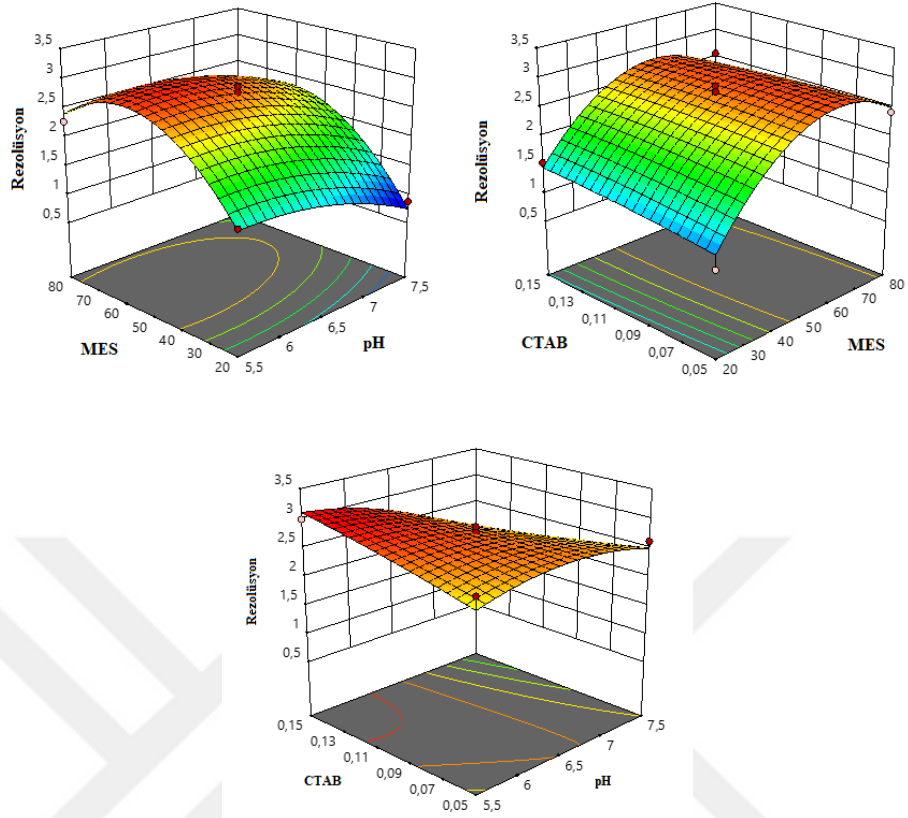


**EK A: İdrarda Etilmalonik Asit Tayini İçin Sonuç Çizelge ve Grafikleri****Çizelge A.1: Ayırma gücü için varyans analizi sonuçları.**

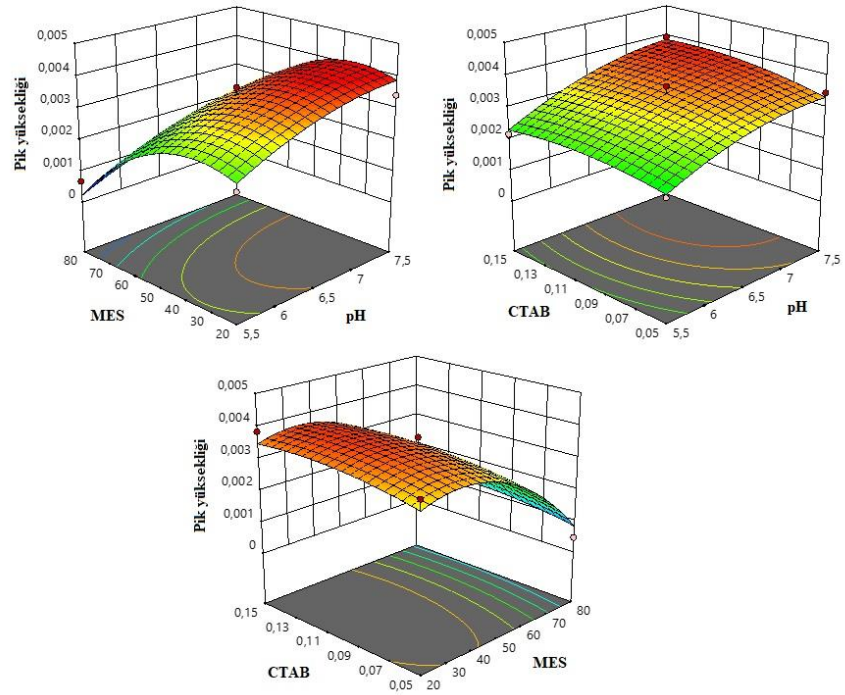
|                           | Kareler Toplamı             | sd | Kareler Ortalaması               | F-değeri | p-değeri |
|---------------------------|-----------------------------|----|----------------------------------|----------|----------|
| <b>Model</b>              | 6,20                        | 9  | 6,20                             | 10,88    | 0,0086   |
| <b>pH</b>                 | 0,6725                      | 1  | 0,6725                           | 10,62    | 0,0225   |
| <b>MES</b>                | 2,30                        | 1  | 2,30                             | 36,35    | 0,0018   |
| <b>CTAB</b>               | 0,0012                      | 1  | 0,0012                           | 0,0188   | 0,8963   |
| <b>pH*MES</b>             | 0,0442                      | 1  | 0,0442                           | 0,6981   | 0,4415   |
| <b>pH*CTAB</b>            | 0,3863                      | 1  | 0,3863                           | 6,10     | 0,0565   |
| <b>MES*CTAB</b>           | 0,0446                      | 1  | 0,0446                           | 0,7051   | 0,04394  |
| <b>pH<sup>2</sup></b>     | 0,1954                      | 1  | 0,1954                           | 3,09     | 0,1393   |
| <b>MES<sup>2</sup></b>    | 2,64                        | 1  | 2,64                             | 41,73    | 0,0013   |
| <b>CTAB<sup>2</sup></b>   | 0,0045                      | 1  | 0,0045                           | 0,0717   | 0,7996   |
| <b>Arta kalan</b>         | 0,3166                      | 5  | 0,0633                           |          |          |
| <b>Uyum Eksikliği</b>     | 0,2898                      | 3  | 0,0966                           | 7,20     | 0,1243   |
| <b>Hata</b>               | 0,0268                      | 2  | 0,0134                           |          |          |
| <b>Düzeltilmiş Toplam</b> | 6,52                        | 14 |                                  |          |          |
|                           | <b>R<sup>2</sup>=0,9514</b> |    | <b>R<sup>2</sup>(adj)=0,8640</b> |          |          |

**Çizelge A.2: Pik yüksekliği için varyans analizi sonuçları.**

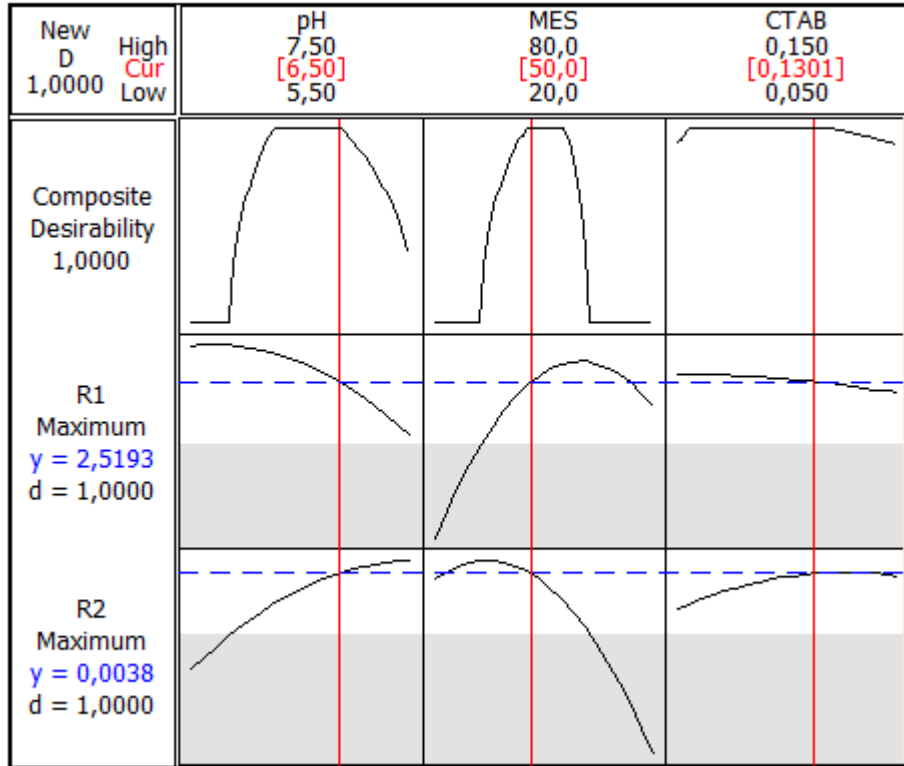
|                           | Kareler Toplamı             | sd | Kareler Ortalaması               | F-değeri | p-değeri |
|---------------------------|-----------------------------|----|----------------------------------|----------|----------|
| <b>Model</b>              | 0,0000                      | 9  | 2,127.10 <sup>-6</sup>           | 9,12     | 0,0127   |
| <b>pH</b>                 | 3,762.10 <sup>-6</sup>      | 1  | 0,6725                           | 10,62    | 0,0225   |
| <b>MES</b>                | 0,0000                      | 1  | 2,30                             | 36,35    | 0,0018   |
| <b>CTAB</b>               | 2,435.10 <sup>-7</sup>      | 1  | 2,435.10 <sup>-7</sup>           | 1,04     | 0,3537   |
| <b>pH*MES</b>             | 1,187.10 <sup>-9</sup>      | 1  | 1,187.10 <sup>-9</sup>           | 0,0051   | 0,9459   |
| <b>pH*CTAB</b>            | 3,440.10 <sup>-8</sup>      | 1  | 3,440.10 <sup>-8</sup>           | 0,1475   | 0,7167   |
| <b>MES*CTAB</b>           | 7,263.10 <sup>-10</sup>     | 1  | 7,263.10 <sup>-10</sup>          | 0,0031   | 0,9577   |
| <b>pH<sup>2</sup></b>     | 3,931.10 <sup>-7</sup>      | 1  | 3,931.10 <sup>-7</sup>           | 1,69     | 0,2508   |
| <b>MES<sup>2</sup></b>    | 4,344.10 <sup>-6</sup>      | 1  | 4,344.10 <sup>-6</sup>           | 18,63    | 0,0076   |
| <b>CTAB<sup>2</sup></b>   | 1,673.10 <sup>-7</sup>      | 1  | 1,673.10 <sup>-7</sup>           | 0,7172   | 0,4357   |
| <b>Arta kalan</b>         | 1,166.10 <sup>-6</sup>      | 5  | 2,332.10 <sup>-7</sup>           |          |          |
| <b>Uyum Eksikliği</b>     | 1,085.10 <sup>-6</sup>      | 3  | 3,615.10 <sup>-7</sup>           | 8,86     | 0,1031   |
| <b>Hata</b>               | 8,160.10 <sup>-8</sup>      | 2  | 4,080.10 <sup>-8</sup>           |          |          |
| <b>Düzeltilmiş Toplam</b> | 0,0000                      | 14 |                                  |          |          |
|                           | <b>R<sup>2</sup>=0,9426</b> |    | <b>R<sup>2</sup>(adj)=0,8392</b> |          |          |



Şekil A.1: Ayırma gücü için yüzey grafikleri.



Şekil A.2: Pik yüksekliği için yüzey grafikleri.



**Şekil A.3** : Optimum tampon koşulları  
R<sub>1</sub>: ayırma gücü, R<sub>2</sub>: pik yüksekliği.

**EK B:** İdrarda Malonik, Metilmalonik ve Etilmalonik Asit Eşzamanlı Tayini İçin  
Sonuç Çizelge ve Grafikleri

**Çizelge B.1:** R<sub>1</sub>(Ayırma gücü 1) için varyans analizi sonuçları.

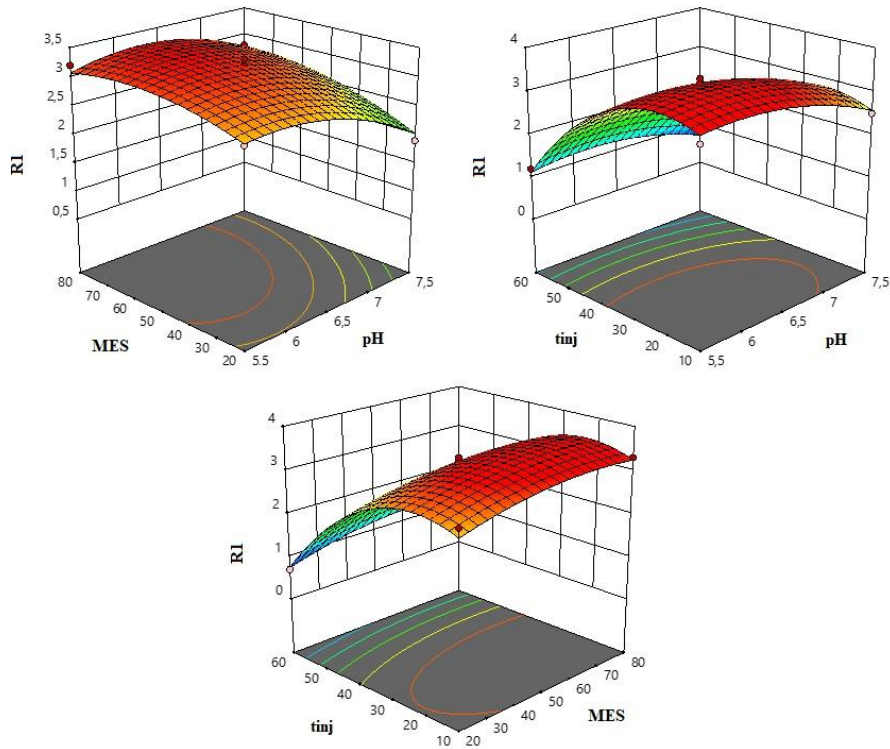
|                                    | Katsayılar<br>(Kareler Toplamı) | df | Katsayılar<br>(Kareler<br>Ortalaması) | F-değeri | p-değeri |
|------------------------------------|---------------------------------|----|---------------------------------------|----------|----------|
| <b>Model</b>                       | 12,88                           | 9  | 1,43                                  | 34,07    | 0,0006   |
| <b>pH</b>                          | 0,6050                          | 1  | 0,6050                                | 14,40    | 0,0127   |
| <b>MES</b>                         | 0,5000                          | 1  | 0,5000                                | 11,90    | 0,0182   |
| <b>t<sub>inj</sub></b>             | 8,00                            | 1  | 8,00                                  | 190,48   | 0,0001   |
| <b>pH*MES</b>                      | 0,0625                          | 1  | 0,0625                                | 1,49     | 0,2769   |
| <b>pH* t<sub>inj</sub></b>         | 0,0225                          | 1  | 0,0225                                | 0,5357   | 0,4971   |
| <b>MES*t<sub>inj</sub></b>         | 0,0025                          | 1  | 0,0025                                | 0,0595   | 0,8169   |
| <b>pH<sup>2</sup></b>              | 0,3606                          | 1  | 0,3606                                | 8,59     | 0,0326   |
| <b>MES<sup>2</sup></b>             | 0,1667                          | 1  | 0,1667                                | 3,97     | 0,1029   |
| <b>t<sub>inj</sub><sup>2</sup></b> | 3,42                            | 1  | 3,42                                  | 81,44    | 0,0003   |
| <b>Arta kalan</b>                  | 0,2100                          | 5  | 0,0420                                |          |          |
| <b>Uyum<br/>Eksikliği</b>          | 0,1900                          | 3  | 0,0633                                | 6,33     | 0,1394   |
| <b>Hata</b>                        | 0,0200                          | 2  | 0,0100                                |          |          |
| <b>Düzeltilmiş<br/>Toplam</b>      | 13,09                           | 14 |                                       |          |          |
|                                    | <b>R<sup>2</sup>= 0,9840</b>    |    | <b>R<sup>2</sup>(adj)= 0,9551</b>     |          |          |

**Çizelge B.2:** R<sub>2</sub> (Ayırma gücü 2) için varyans analizi sonuçları.

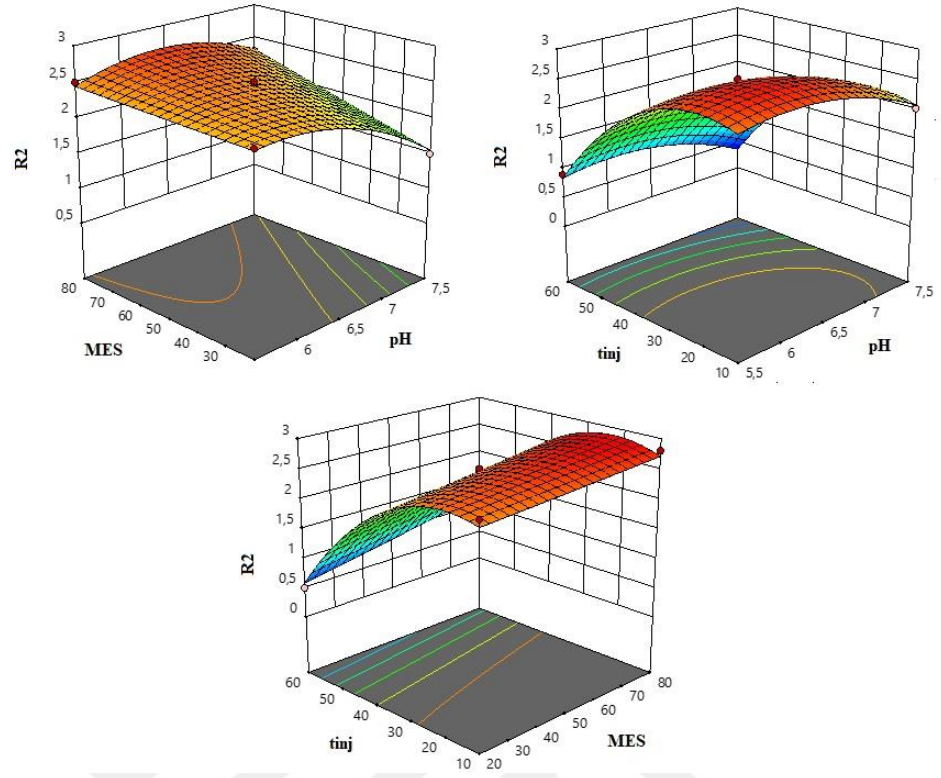
|                                    | Katsayılar<br>(Kareler Toplamı) | df | Katsayılar<br>(Kareler<br>Ortalaması) | F-değeri | p-değeri |
|------------------------------------|---------------------------------|----|---------------------------------------|----------|----------|
| <b>Model</b>                       | 8,90                            | 9  | 0,9887                                | 49,44    | 0,0002   |
| <b>pH</b>                          | 0,4404                          | 1  | 0,4404                                | 22,02    | 0,0054   |
| <b>MES</b>                         | 0,03604                         | 1  | 0,03604                               | 18,02    | 0,0081   |
| <b>t<sub>inj</sub></b>             | 5,82                            | 1  | 5,82                                  | 291,14   | 0,0001   |
| <b>pH*MES</b>                      | 0,1225                          | 1  | 0,1225                                | 6,13     | 0,0562   |
| <b>pH* t<sub>inj</sub></b>         | 0,0001                          | 1  | 0,0001                                | 0,0066   | 0,9383   |
| <b>MES*t<sub>inj</sub></b>         | 0,0396                          | 1  | 0,0396                                | 1,98     | 0,2184   |
| <b>pH<sup>2</sup></b>              | 0,3092                          | 1  | 0,3092                                | 15,46    | 0,0110   |
| <b>MES<sup>2</sup></b>             | 0,0001                          | 1  | 0,0001                                | 0,0035   | 0,9549   |
| <b>t<sub>inj</sub><sup>2</sup></b> | 1,89                            | 1  | 1,89                                  | 94,35    | 0,0002   |
| <b>Arta kalan</b>                  | 0,1000                          | 5  | 0,0200                                |          |          |
| <b>Uyum<br/>Eksikliği</b>          | 0,0902                          | 3  | 0,0301                                | 6,14     | 0,1433   |
| <b>Hata</b>                        | 0,0098                          | 2  | 0,0049                                |          |          |
| <b>Düzeltilmiş<br/>Toplam</b>      | 9,00                            | 14 |                                       |          |          |
|                                    | <b>R<sup>2</sup>= 0,9889</b>    |    | <b>R<sup>2</sup>(adj)=0,9689</b>      |          |          |

**Çizelge B.3:** Ortalama pik yüksekliği için varyans analizi sonuçları.

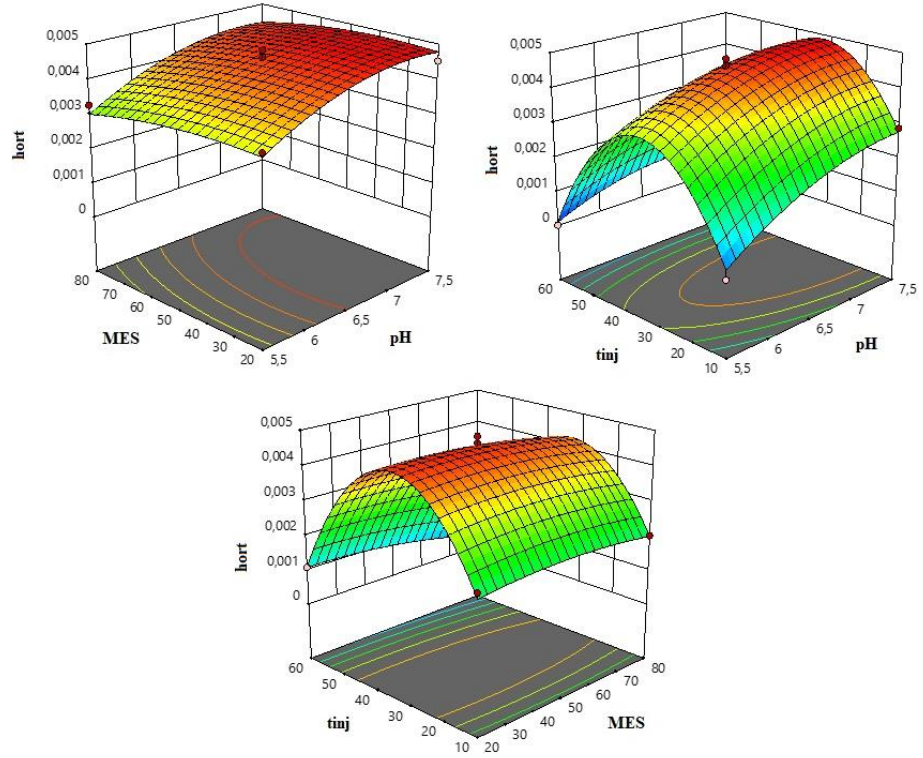
|                                 | Kareler Toplamı | sd | Kareler Ortalaması | F-değeri | p-değeri |
|---------------------------------|-----------------|----|--------------------|----------|----------|
| <b>Model</b>                    | 0,0000          | 9  | $4,611.10^{-6}$    | 43,65    | 0,0003   |
| <b>pH</b>                       | $3,687.10^{-6}$ | 1  | $3,687.10^{-6}$    | 34,91    | 0,0020   |
| <b>MES</b>                      | $3,149.10^{-7}$ | 1  | $3,149.10^{-7}$    | 2,98     | 0,1448   |
| <b><math>t_{inj}</math></b>     | $3,404.10^{-6}$ | 1  | $3,404.10^{-6}$    | 32,23    | 0,0024   |
| <b>pH*MES</b>                   | $2,97.10^{-9}$  | 1  | $2,97.10^{-9}$     | 0,0281   | 0,8734   |
| <b>pH* <math>t_{inj}</math></b> | $4,119.10^{-7}$ | 1  | $4,119.10^{-7}$    | 3,90     | 0,1053   |
| <b>MES*<math>t_{inj}</math></b> | $1,083.10^{-7}$ | 1  | $1,083.10^{-7}$    | 1,02     | 0,3578   |
| <b>pH<sup>2</sup></b>           | $7,773.10^{-7}$ | 1  | $7,773.10^{-7}$    | 7,36     | 0,0421   |
| <b>MES<sup>2</sup></b>          | $1,276.10^{-7}$ | 1  | $1,276.10^{-7}$    | 1,21     | 0,3217   |
| <b><math>t_{inj}^2</math></b>   | 0,0000          | 1  | 0,0000             | 315,83   | 0,0001   |
| <b>Arta kalan</b>               | $5,282.10^{-7}$ | 5  | $5,282.10^{-7}$    |          |          |
| <b>Uyum Eksikliği</b>           | $3,615.10^{-7}$ | 3  | $1,205.10^{-7}$    | 1,45     | 0,4338   |
| <b>Hata</b>                     | $1,667.10^{-7}$ | 2  | $8,335.10^{-8}$    |          |          |
| <b>Düzeltilmiş Toplam</b>       | 0,0000          | 14 |                    |          |          |
|                                 | $R^2=0,9874$    |    | $R^2(adj)= 0,9648$ |          |          |



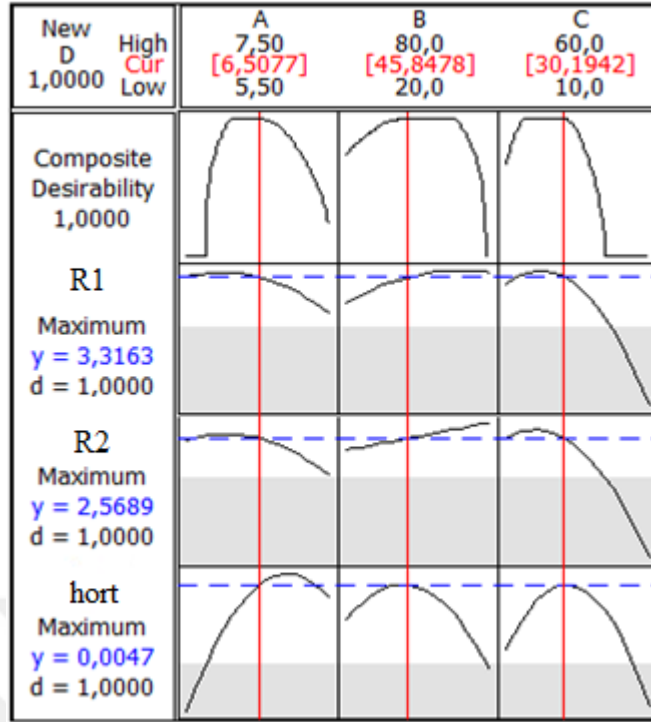
**Şekil B.1:**  $R_1$  (Ayırma gücü 1) için yüzey grafikleri.



Şekil B.2:  $R_2$  (Ayırma gücü2) için yüzey grafikleri.



Şekil B.3:  $hort$  (ortalama pik yüksekliği) için yüzey grafikleri.



**Şekil B.4:** Optimum tampon koşulları.  
R<sub>1</sub> ve R<sub>2</sub>: ayırma gücü, h<sub>ort</sub>: ortalama pik yüksekliği.

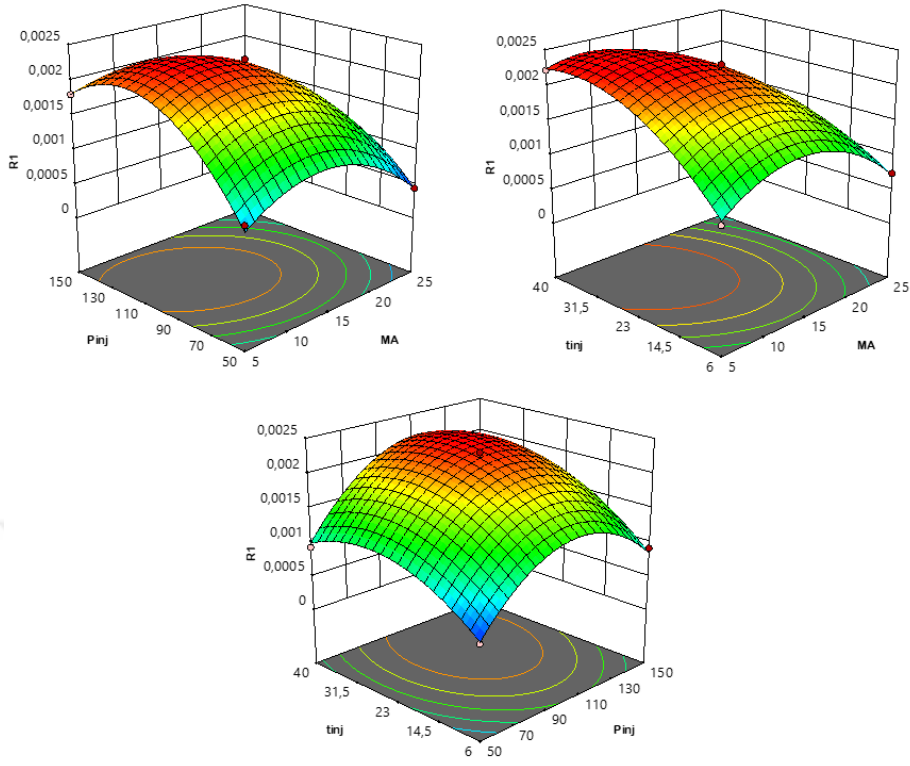
**EK C: İdrarda Sialik ve Mevalonik Asit Eşzamanlı Tayini İçin Sonuç Çizelge ve Grafikleri**

**Çizelge C.1:** Optimizasyon için tasarlanan deney ile seçilen faktörlerin kodlu ve gerçek değerleri.

| Deneyler | Kodlu Değerler |      |    |        |      | Deneyisel Değerler |      |     |        |      |
|----------|----------------|------|----|--------|------|--------------------|------|-----|--------|------|
|          | MA             | CTAB | pH | BASINÇ | SÜRE | MA                 | CTAB | pH  | BASINÇ | SÜRE |
| 1        | -1             | -1   | -1 | -1     | 1    | 5                  | 0,1  | 5,5 | 50     | 0,5  |
| 2        | 1              | -1   | -1 | -1     | -1   | 25                 | 0,1  | 5,5 | 50     | 0,1  |
| 3        | -1             | 1    | -1 | -1     | -1   | 5                  | 0,5  | 5,5 | 50     | 0,1  |
| 4        | 1              | 1    | -1 | -1     | 1    | 25                 | 0,5  | 5,5 | 50     | 0,5  |
| 5        | -1             | -1   | 1  | -1     | -1   | 5                  | 0,1  | 7,5 | 50     | 0,1  |
| 6        | 1              | -1   | 1  | -1     | 1    | 25                 | 0,1  | 7,5 | 50     | 0,5  |
| 7        | -1             | 1    | 1  | -1     | 1    | 5                  | 0,5  | 7,5 | 50     | 0,5  |
| 8        | 1              | 1    | 1  | -1     | -1   | 25                 | 0,5  | 7,5 | 50     | 0,1  |
| 9        | -1             | -1   | -1 | 1      | -1   | 5                  | 0,1  | 5,5 | 100    | 0,1  |
| 10       | 1              | -1   | -1 | 1      | 1    | 25                 | 0,1  | 5,5 | 100    | 0,5  |
| 11       | -1             | 1    | -1 | 1      | 1    | 5                  | 0,5  | 5,5 | 100    | 0,5  |
| 12       | 1              | 1    | -1 | 1      | -1   | 25                 | 0,5  | 5,5 | 100    | 0,1  |
| 13       | -1             | -1   | 1  | 1      | 1    | 5                  | 0,1  | 7,5 | 100    | 0,5  |
| 14       | 1              | -1   | 1  | 1      | -1   | 25                 | 0,1  | 7,5 | 100    | 0,1  |
| 15       | -1             | 1    | 1  | 1      | -1   | 5                  | 0,5  | 7,5 | 100    | 0,1  |
| 16       | 1              | 1    | 1  | 1      | 1    | 25                 | 0,5  | 7,5 | 100    | 0,5  |
| 17       | 0              | 0    | 0  | 0      | 0    | 15                 | 0,3  | 6,5 | 75     | 0,3  |
| 18       | 0              | 0    | 0  | 0      | 0    | 15                 | 0,3  | 6,5 | 75     | 0,3  |
| 19       | 0              | 0    | 0  | 0      | 0    | 15                 | 0,3  | 6,5 | 75     | 0,3  |
| 20       | 0              | 0    | 0  | 0      | 0    | 15                 | 0,3  | 6,5 | 75     | 0,3  |

**Çizelge C.2:**  $R_1$ (pik yüksekliği) için varyans analizi sonuçları.

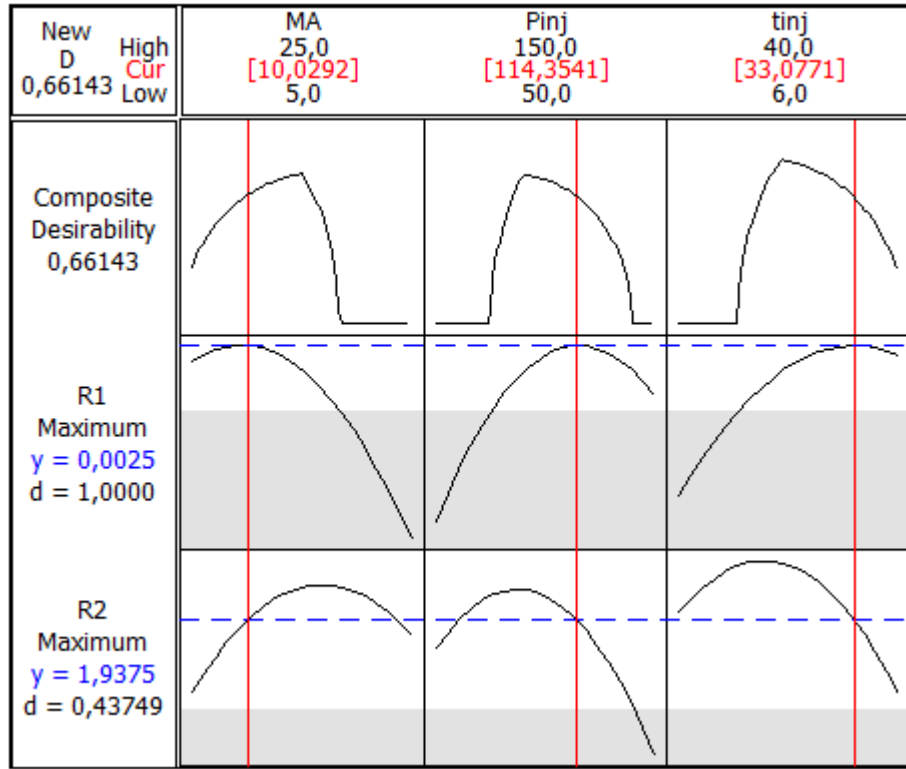
|                         | Katsayılar<br>(Kareler Toplamı) | df | Katsayılar<br>(Kareler Ortalaması) | F-değeri | p-değeri |
|-------------------------|---------------------------------|----|------------------------------------|----------|----------|
| Model                   | $7,035 \cdot 10^{-6}$           | 9  | $7,817 \cdot 10^{-7}$              | 90,15    | 0,0001   |
| MA                      | $1,386 \cdot 10^{-6}$           | 1  | $1,386 \cdot 10^{-6}$              | 159,86   | 0,0001   |
| $P_{inj}$               | $5,784 \cdot 10^{-7}$           | 1  | $5,784 \cdot 10^{-7}$              | 66,70    | 0,0004   |
| $t_{inj}$               | $9,299 \cdot 10^{-7}$           | 1  | $9,299 \cdot 10^{-7}$              | 107,24   | 0,0001   |
| $MA \cdot P_{inj}$      | $2,352 \cdot 10^{-7}$           | 1  | $2,352 \cdot 10^{-7}$              | 27,12    | 0,0034   |
| $MA \cdot t_{inj}$      | $3,025 \cdot 10^{-7}$           | 1  | $3,025 \cdot 10^{-7}$              | 34,89    | 0,0020   |
| $P_{inj} \cdot t_{inj}$ | $5,056 \cdot 10^{-8}$           | 1  | $5,056 \cdot 10^{-8}$              | 5,83     | 0,0605   |
| $MA^2$                  | $1,271 \cdot 10^{-6}$           | 1  | $1,271 \cdot 10^{-6}$              | 146,56   | 0,0001   |
| $P_{inj}^2$             | $2,098 \cdot 10^{-6}$           | 1  | $2,098 \cdot 10^{-6}$              | 241,92   | 0,0001   |
| $t_{inj}^2$             | $6,821 \cdot 10^{-7}$           | 1  | $6,821 \cdot 10^{-7}$              | 78,67    | 0,0003   |
| Arta kalan              | $4,336 \cdot 10^{-8}$           | 5  | $8,671 \cdot 10^{-9}$              |          |          |
| Uyum Eksikliği          | $3,43 \cdot 10^{-8}$            | 3  | $1,144 \cdot 10^{-8}$              | 2,53     | 0,2960   |
| Saf Hata                | $9,046 \cdot 10^{-9}$           | 2  | $4,523 \cdot 10^{-9}$              |          |          |
| Düzeltilmiş Toplam      | $7,079 \cdot 10^{-6}$           | 14 |                                    |          |          |
| $R^2 = 0,9939$          |                                 |    | $R^2(ajd) = 0,9829$                |          |          |



Şekil C.1:  $R_1$  (pik yüksekliği) için yüzey grafikleri.

| New<br>D<br>1,0000                  | High<br>Cur<br>Low                            | MA                       | Pinj                        | tinj                     |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|
|                                     |                                               | 25,0<br>[10,0364]<br>5,0 | 150,0<br>[114,3443]<br>50,0 | 40,0<br>[33,0638]<br>6,0 |
| Composite<br>Desirability<br>1,0000 |                                               |                          |                             |                          |
|                                     | R1<br>Maximum<br>$y = 0,0025$<br>$d = 1,0000$ |                          |                             |                          |

Şekil C.2: Örnek sıkıştırma yöntemi için optimum şartlar  $R_1$ (pik yüksekliği).



Şekil C.3: Optimum tampon koşullarında pik yüksekliği ( $R_1$ ) ve ayırma gücü ( $R_2$ ) değerleri.



## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Sirun ÖZÇELİK

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2010, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya
- **Yükseklisans** : 2013, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya

### DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Özçelik, S., Öztekin, N., Kıyıkım, E., (2019).** Determination of Methylmalonic Acid in Urine by Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. *Uluslararası Metabolik Hastalıklar ve Beslenme Kongresi*, April 10-14, 2019 Istanbul, Turkey.
- **Özçelik, S., Öztekin, N., Kıyıkım, E., Cansever, M.Ş., Aktuğlu-Zeybek, A.Ç., (2019).** Chemometric optimization of Malonic Acid Biomarkers in Urine by Capillary Electrophoresis. *Fourth International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications*, May 1-4, 2019 Aydın, Turkey.
- **Özçelik, S., Öztekin, N., Kıyıkım, E., Cansever, M.Ş., Aktuğlu-Zeybek, A.Ç., (2020).** Capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection for the determination of urinary ethylmalonic acid for the diagnosis of ethylmalonic aciduria, *Journal of Separation Science*, 43(7), 1365-1371.

