

Tütüne Özgü Kanserojen Nitrozaminlerin Biyolojik Örneklerde Tayini için Kullanılan Analitik Yöntemlerin İncelenmesi

Sinem Çolak* 

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Çaycuma Gıda ve Tarım MYO, 67900, Zonguldak, Türkiye

Öne Çıkanlar

- Tütüne özgü nitrozaminlerin (TSNA) tümör ve kanser gelişimindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır.
- Farklı biyolojik örneklerde TSNA analizi ile farklı organlardaki metabolik aktivasyonları konusunda önemli bilgiler elde edilebilir.
- Eser düzeyde analizine imkan veren metotlar, tütün kaynaklı kanser türlerindeki araştırmalara destek olur

Makale Bilgileri

Geliş: 11.04.2021
Kabul: 09.05.2021

Anahtar Kelimeler

TSNA,
Biyolojik örnek,
LC-MS

Özet

Tütüne özgü nitrozaminler (TSNA) nikotinin kimyasal reaksiyonları sonucu oluşmaktadır ve çoğu kanserojendir. Biyolojik örneklerde bu nitrozamin miktarlarının takibi, hastalık ve kanser riski için önemli bilgiler sağlayabilir. Ancak, TSNA'ların biyolojik örneklerdeki konsantrasyonlarının düşük olması ve örneklerde matris etkisinin fazlalığı hassas ekstraksiyon ve analiz yöntemleri gerektirmektedir. Bu çalışma, şu anda mevcut olan yöntem ve kullanılan cihazlara genel bir bakış açısı sunmaktadır. Ayrıca, farklı biyolojik matrislerde TSNA ölçen çeşitli çalışmalar için analitik prosedürlerin kapsamlı bir özeti sağlamaktadır. Her yöntemin avantaj ve dezavantajlarının yanı sıra biyolojik örneklerdeki analitik zorluklar da çalışmada vurgulanmış ve bunların giderilmesi için benimsenen yaklaşımlar tartışılmıştır. Geleneksel yöntemlerin yanında yeni geliştirilen nanomalzemeler ve biyosensörler de çalışmada sunulmuştur.

Investigation of Analytical Methods Used for the Determination of Tobacco-Specific Cancerogen Nitrosamines in Biological Samples

Highlights

- In tumor and cancer development, the role of tobacco-specific nitrosamines (TSNA) is not fully understood.
- By TSNA analysis in different biological samples, can be obtained important information about metabolic activation in different organs.
- Methods that allow for trace-level analysis support research in tobacco source cancer types.

Article Info

Received: 11.04.2021
Accepted: 09.05.2021

Keywords

TSNA,
Biological sample,
LC-MS

Abstract

Tobacco specific nitrosamines (TSNA) are formed by chemical reactions of nicotine and most of them are carcinogenic. It has been demonstrated that the monitoring of these nitrosamine amounts in different types of biological samples can provide important information about disease and cancer risk. However, the low concentrations of TSNAs in biological samples and the excess matrix effect in the samples, require sensitive extraction and analysis methods. This study has been provide an overview of the currently available methods and devices. The review also provides a comprehensive summary of analytical procedures of various studies measuring TSNA in different biological matrices. In addition to the advantages and disadvantages of each method, analytical difficulties in biological samples were also highlighted in this study and were discussed the approaches adopted to overcome them. In addition to traditional methods, newly developed nanomaterials and biosensors are also presented in this study.



1. GİRİŞ

Nikotinin kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşturduğu tütüne özgü nitrozaminlerin (TSNA) çoğu kanserojenik olup, yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile tümör oluşumunu başlattığı bilinmektedir. Tütüne özgü nitrozaminler sınıfında yer alan bileşikler *Çizelge 1*'de verilmiştir [1]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansına (IARC) göre NNK ve NNN Grup 1'de (kanserojenik) yer almaktadır [2].

Çizelge 1. TSNA sınıfında yer alan bileşikler

| Bileşiğin İsmi | |
|--|----------|
| Nitrozonornikotin | NNN |
| 4-(metilnitrozoamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon | NNK |
| Nitrozoanabasin | NAB |
| Nitrozoanatabin | NAT |
| 4-(metilnitrozoamino)-1-(3-piridil)-1-bütanol | NNAL |
| 4-(metilnitrozoamino)-4-(3-piridil)-1-bütanol | izo-NNAL |
| 4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil) bütanoik asit | izo-NNAC |
| 4-(N-metil-N-nitrozamin)-4-(3-piridil) bütanal | NNA |

Kimyasal ve biyolojik ajanların canlılarda oksidatif stres ve hücre hasarına neden olduğu bildirilmiştir [3]. NNN ve NNK özellikle akciğer hastalıklarına, inflamasyona, oksidatif strese, tümör oluşumuna ve farklı kanser türlerine neden olmaktadır [4-6]. Nitrozaminler kanserojen etkilerini, DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) bazlarını alkilleyerek ve DNA'nın yapısını değiştiren eklentiler oluşturarak göstermektedirler [7]. Ancak Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), insanlar ile yapılan kanser çalışmalarından elde edilen yetersiz kanıtlar nedeniyle NNK ve NNN'nin belirli organlardaki etkisini net olarak ifade edememektedir [8]. Bu yüzden bu nitrozaminlerin biyolojik örneklerdeki miktar tayinleri son derece önemlidir. Örneğin, TSNA'ların, patofizyolojik etkileri ve aşırı mukus salgılanması ile ilişkisini konu alan bir çalışmada insan solunum yolu epitel hücrelerinde TSNA'ların sitotoksitesi değerlendirilmiştir. TSNA'ların mukus salgısı üzerindeki etkisini ve moleküler mekanizmasını araştıran bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile NAT, NNN, NNAL ve NNK' nin, enflamatuar hava yolu hastalıklarında aşırı mukus salgılanmasına neden olan sorumlu molekülleri indüklediği ileri sürülmüştür [9].

Tütün kaynaklı kanserojen nitrozaminlere, aynı ortamda bulunarak (pasif içicilik) maruziyet de benzer etkilere yol açmaktadır. Bu yüzden, IARC pasif içiciliği (second hand smoke) yani sekonder kaynaklı dumanı Grup1'de sınıflandırmıştır. Nikotin bırakmak için kullanılan ürünler de bu nitrozaminlere maruziyete sebep olmaktadır. Örneğin, sigara bırakmak için önerilen ürünleri kullanan deneklerin idrar örneklerinde NNN tespit edilmiştir [10].

İdrar ve kan gibi yaygın olarak kullanılan biyolojik örneklerdeki TSNA'ların analiz yöntemleri, analitik zorluklara sahip olduğu için (seyreltme veya eser miktarda bulunma gibi) daha az tercih edilen biyolojik örnekler için modifiye edilerek organ ve dokularda spesifik çalışmalar yapılabilir. Örneğin akciğerlerden elde edilen bronkoalveolar lavaj sıvısı veya doku örneklerinde akciğer kanseri için risk faktörü olan tütüne özgü nitrozaminlerin farmakolojisi ve toksikolojisinde yer alan genlerdeki varyasyonlar araştırılabilir.

Tütüne özgü nitrozaminler ile oksidatif strese ait biyobelirteçlerin ilişkisi, özellikle sigara ve tütün ürünleri maruziyeti ile oluşan oksidatif stres hakkında önemli bilgiler sunabilir. Örneğin, NNK ve NNN aracılı membran hasarı ile reaktif oksijen türleri arasındaki ilişki, TSNA'ların lipid metabolizması üzerindeki etkisinin anlaşılmasına yardımcı olabilir. Proteinlerde oksidatif hasar belirteci olan 3-nitrotirozin ve reaktif oksijen türleri ile ilişkileri inflamasyon ve tümör oluşumu mekanizmalarını da aydınlatılabilir. Farklı biyolojik örneklerden elde edilen TSNA sınıfında yer alan nitrozaminlerin

miktarları ile matematiksel modeller geliştirilerek hastalık tanıları sınıflandırılabilir ve biyobelirteç olma potansiyelleri araştırılabilir.

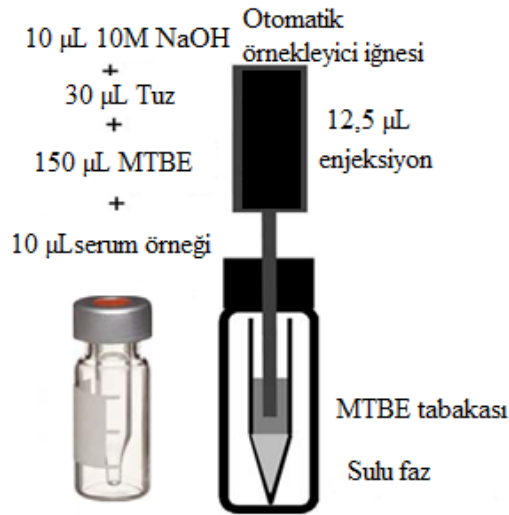
2. BİYOLOJİK ÖRNEKLERDE TSNA'LARIN EKTRAKSİYON YÖNTEMLERİ

Biyolojik örneklerde matriks etkisi fazla olduğundan, yüksek polarite ve düşük molekül ağırlığına sahip TSNA'ların kalitatif ve kantitatif tayini için en önemli işlem basamağı ekstraksiyondur. Literatürde farklı biyolojik örnekler için farklı protokollerin uygulandığı görülmüştür. Örneğin, serum örnekleri için genellikle organik çözücüler ile tuz ve protein çöktürme, buharlaştırma, sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) ve katı faz ekstraksiyon (SPE) kullanılmıştır [11-14].

2.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon (LLE)

Karmaşık örneklerde eser seviyede TSNA'ların ekstraksiyonu ve zenginleştirilmesi için geleneksel olarak organik çözücü ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) günümüzde hala uygulanmaktadır. LLE'de çözücü olarak sıklıkla diklormetan (DCM) tek başına veya 2-propanol ile karışım şeklinde kullanılmaktadır [15-17]. LLE'nin en büyük avantajı düşük maliyetli olmasıdır. Dezavantajları ise; LLE için gerekli organik çözücülerin toksik olması, örnek ve çözücünün fazla miktarda kullanılması, santrifüj ihtiyacı, fazla iş gücü gerektirmesi ve ekstraksiyon süresinin uzunluğudur. Ayrıca çözücü çeşidinin az ve biyolojik örneklerde TSNA kaybının fazla olması da diğer dezavantajlarından [11].

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada LLE'nin bu dezavantajlarının giderildiği ve serum gibi karışık matriks içeren örneklere uygulandığı bildirilmiştir [18]. Çalışmada 350 µL'lik bir insert vial'e 40 µL NaCl-NaOH karışımı ardından eVol elektronik analitik şırınga kullanılarak 150 µL metil tert-butil eter (MTBE)-iç standart çözeltisi ve 10 µL serum eklenmiştir. Flakon daha sonra hızlıca kapatılarak güçlü bir şekilde çalkalanmış ve vorteks ile karıştırıldıktan sonra üstte kalan organik fazdan 12,5 µL otomatik örnekleyiciye yerleştirilmiştir. Örnek hazırlama prosedürüne ait şema *Şekil 1*'de gösterilmiştir [18].



Şekil 1. Örnek hazırlama şeması [18]

Çalışmada ayrıca TSNA'ların sıvı sıvı ekstraksiyonu için sıklıkla kullanılan DCM ve MTBE ile etil asetatın ekstraksiyon verimleri de test edilmiştir. MTBE'nin, analitleri ekstrakte etmedeki veriminin daha yüksek olduğu ve matriks girişimlerini en aza indirdiği kanıtlanmıştır. Yöntem geliştirme sırasında test edilen organik çözücüler hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) ile uyumlu olduğundan ekstraktın kromatografik sistem üzerine doğrudan enjeksiyonu sağlanmıştır. Ekstraksiyon verimliliği, sulu faza eklenen NaOH ve NaCl'nin birleşik etkisiyle daha da artırılmış ve eş zamanlı olarak analit tuzlarının daha fazla çözünen organik serbest bazlara dönüştürülmesi sağlanmıştır. Tüm numune

bileşenleri (serum, tuzlu su-NaOH ve MTBE-IS) ekstraksiyon işlemi sırasında ince bir emülsiyon oluştursa da sulu ve organik tabakalar çalkalama ve karıştırmanın durmasından 1 dakika sonra faz ayrımı olmuş ve böylece örnekleyiciye yerleştirmeden önce santrifüje gerek kalmamıştır. Ekstraksiyon işleminde az miktarda kullanılan MTBE'nin uçmasını engellemek için de bazı çalışmalar yapılmıştır. Otomatik örnekleyici flakon kapağının dikkatlice sıkılmasıyla oda sıcaklığında ve otomatik örnekleyicide saklanan numune karışımını (serum, tuzlu su-NaOH, MTBE) içeren üç şişenin ağırlığı karşılaştırılmış ve 24 saatlik bir süre içinde organik çözücü kaybı gözlenmemiştir (maksimum gözlenen kayıp yaklaşık %0,2). Bununla birlikte, enjeksiyon işleminde delindikten sonra, flakon septanın buharlaşma kayıplarına izin vermeye daha yatkın olduğu fark edilmiş ve otomatik örnekleyicide sıcaklık 10 °C'de sabitlenmiştir. Bu şekilde alınan önlemler ile çözücünün buharlaşması kaynaklı analit konsantrasyonunda meydana gelebilecek değişikliklerin de önüne geçilmiştir [18].

2.2. Desteklenmiş Sıvı Ekstraksiyon (SLE)

Biotage tarafından bildirilen uygulama notunda, idrar, serum, plazma ve kan numunelerinde nikotin ve metabolitlerinin ekstraksiyonu için desteklenmiş sıvı ekstraksiyon (SLE) kullanılmıştır. Plakadan DCM: izopropanol (95:5, v/v, 1 mL) ayrıştırılan elüent HCl ile asitlendirilmiştir. Bunun sebebi de buharlaştırma işleminde nikotin kaybını azaltmak olarak bildirilmiştir [19]. Ancak serum ile yapılan farklı bir LLE çalışmasında asitlendirme işlemi istenilen verimi sağlamadığı için kullanılmamıştır [18].

2.3. Katı Faz Ekstraksiyon (SPE)

LLE işlemin fazla işgücü ve zaman gerektirmesi gibi sorunlar SPE' nin daha yaygın kullanılmasına sebep olmuştur. Son zamanlarda sorbent seçiminin esnekliği ve düşük organik çözücü tüketimi nedeniyle SPE, LLE 'ye mükemmel bir alternatif olmuştur. TSNA'ların ekstraksiyonu için kullanılan SPE yönteminde ters faz veya iyon değiştirici inorganik silika bazlı ve organik polimer bazlı malzemeler sorbent olarak kullanılmıştır [15,20].

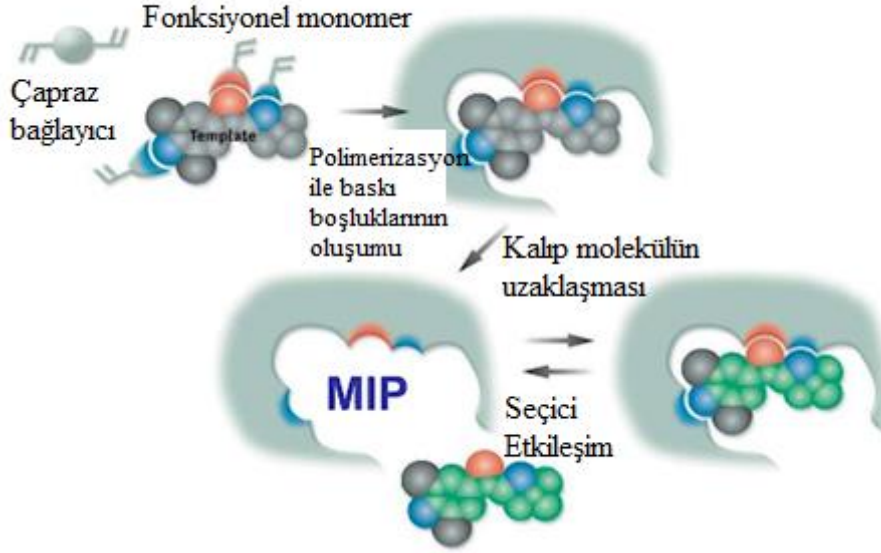
İdrar örnekleri ile yapılan bir çalışmada örnekler online katı faz ekstraksiyon (SPE) ile direk analiz edilmiş ve analiz süresi 19 dakika olarak rapor edilmiştir [21]. Ayrıca sıçan idrarı örneği ile yapılan bir çalışmada kullanılan SPE yöntemi, basit ve kısa süren işlem prosedürü, yüksek verim ve aynı anda çok sayıda örneğe uygulanabilir olması ile diğer mevcut yöntemlere göre avantajlar sunmuştur [22].

Plazma gibi biyolojik örneklerde maktrijs etkisi çok olduğundan SPE ile TSNA ekstraksiyonunda istenilmeyen maddelerin analite karışmaması için sorbent seçimi çok önemlidir. Yapılan bir çalışmada tetraazacalix [2] aren [2] triazinle modifiye edilmiş silika jel (NCS) bazlı yeni bir sabit faz sentezlenmiştir. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrobenzen, organik bazlar, fenoller ve inorganik anyonlar gibi bileşiklerin, NCS sabit fazında iyi ayrıldığı bildirilmiştir [12]. NNK, NNN, NAT, NAB ve NNAL gibi moleküller için hidrofobik, hidrojen bağı ve π - π gibi etkileşimlerin, NCS üzerindeki triazin halkaları ile piridil ve N-nitrozo grupları arasında olduğu tahmin edilmektedir. Bu yüzden, NCS SPE sorbentinin, dört TSNA ve NNAL'ın aynı anda ekstraksiyonu için yüksek bir seçicilik ve yüksek bir zenginleştirme gösterebileceği düşünülmüştür. Optimum koşullarda NCS sorbenti kullanılarak yapılan SPE sonrası analizler LC/MS/MS ile yapılmış ve yöntem valide edilmiştir. Çalışmada ayrıca C18 de sorbent olarak kullanılmış ve geri kazanım değerleri NCS sorbent ile karşılaştırılmıştır. 20 pg/mL konsantrasyonlarındaki NNK, NNN, NAT, NAB ve NNAL için her iki sorbentteki geri kazanım yüzdeleri sırasıyla (NCS sorbent; C18 sorbent); (93.2;82.1), (95.2;80.6), (91.4; 78.3), (101.6;84) ve (93.3; 79.7) olarak bildirilmiştir. Elüent olarak sadece metanolün kullanıldığı yöntemde, TSNA'ların kararlılığı sağlanmış ve pH değişiminin etkisi önlenmiştir. Çalışmada ayrıca plazma matriksi için mevcut SPE yöntemlerinden çok daha düşük LOD değerleri sunulmuştur [11].

2.4. Katı faz ekstraksiyon-Moleküler Baskılı Polimer (SPE-MIP)

SPE'de yaygın şekilde kullanılan hidrofobik, iyonik ve polar sorbentler yeterince yüksek seçicilik sağlayamaz ise, örnek hazırlama işlem süresinin uzaması ve düşük verim gibi olumsuzluklar ortaya çıkabilir. Son zamanlarda sorbent olarak kullanımı yaygınlaşan moleküler baskılı polimerler (MIP),

hedef analite yüksek seçicilikle bağlamak üzere tasarlanmıştır ve fazla miktarda çapraz bağlı polimerler içerir. Moleküler baskılama tekniğinde, baskılanan moleküller aracılığıyla spesifik tanıma bölgeleri oluşturulmaktadır [23]. Moleküler baskılama tekniği şema olarak Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 2. Moleküler baskılı polimer [23]

Sorbent malzemesi olarak kullanılan MIP'in avantajları aşağıda verilmiştir;

- Dış etkilere karşı fiziksel ve kimyasal kararlılığı oldukça yüksek polimerlerdir,
- Mekanik kuvvete dayanıklıdır.
- Yüksek sıcaklık ve basınca dayanıklıdır.
- Asit, baz, metal iyonları ve organik çözücülere karşı dayanıklıdır
- Saklama ömrü uzundur.
- Polimerlerin performansında hiçbir azalma olmaksızın oda sıcaklığında birkaç yıl saklanabilir.

MIP'ler, biyolojik örneklerde TSNA analizinde gereken tespit sınırlarını elde etmek için idrar örneklerinde yaygın olarak kullanılmıştır [24]. Sigara içenlerin ve içmeyenlerin idrarındaki toplam (serbest ve konjuge) NNAL, NNN, NAT ve NAB'ın belirlenmesi için idrar örnekleri önce β -glukuronidaz ile işleme tabi tutulmuştur. İki SPE adımının ardından (önce MIP-SPE, ardından katyon değişimli-SPE) analizleri LC/MS/MS ile gerçekleştirilmiştir [25]. İnsan saçı ile yapılan farklı bir çalışmada örnekler, C18-SPE ve MIP-SPE ile ekstrakte edilmiş ve ters fazlı ultrason destekli dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon (USA-DLLME) ile de zenginleştirilmiştir [26].

2.5. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon (MSPE)

Geleneksel SPE prosedüründe, difüzyon hızının yavaş olması ekstraksiyon süresini uzattığından yapılan bir çalışmada yeni bir metot geliştirilmiştir. Manyetik katı faz ekstraksiyonu (MSPE) yeni bir SPE yöntemi olup sorbent olarak manyetik veya mıknatıslanabilir bir malzeme kullanılmaktadır. Literatürde MSPE'nin, numune hazırlama uygulamasında ekstraksiyon süresinin kısa ve işlemin kolay olması gibi avantajlara sahip olduğu bildirilmiştir [27]. Ayrıca MSPE'de kullanılan farklı malzemelerden yapılmış sorbentler, yüksek ekstraksiyon verimliliği de sağlamaktadır. Örneğin nikotinin ekstraksiyonu için yapılan bir çalışmada grafen bazlı sorbent kullanılmıştır [28].

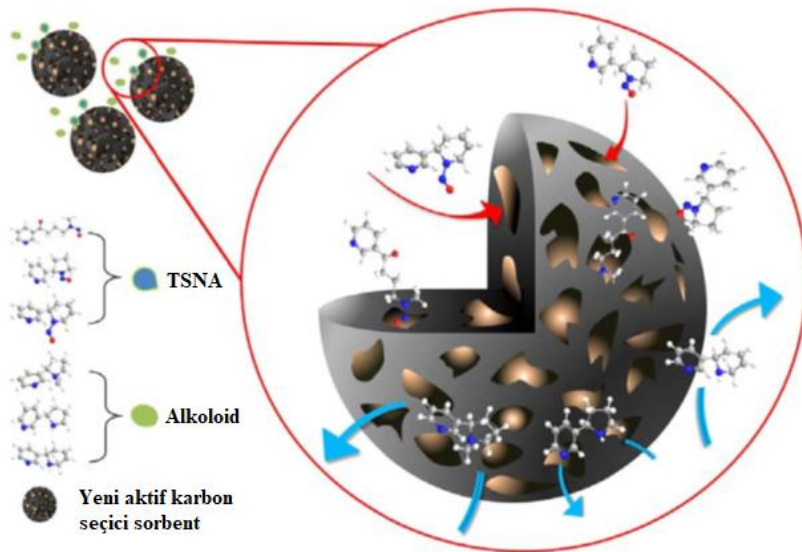
Manyetik katı faz ekstraksiyon çalışmaları, grafen bazlı malzemelerin TSNA'lar için yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir [29,30]. TSNA ekstraksiyonu için MSPE kullanılarak yapılan

bir başka çalışmada sorbent olarak manyetik grafen kompoziti kullanılmıştır. Optimize edilmiş koşullar altında MSPE tekniği, LC/MS/MS ile birleştirilerek TSNA tayini için hızlı ve hassas bir yöntem olmuştur. Önerilen yöntem TSNA analizi için biyolojik örnekler için denenmemiş ancak sigara örneklerine başarıyla uygulanmıştır [31].

2.6. Nanomateryal Kullanımı

Tütün kaynaklı kanserojen nitrozaminlerin analizinde son zamanlarda nanomalzemelerin kullanıldığı yöntemler geliştirilmektedir. Yaygın olarak kullanılan nanomateryaller; nanopartiküller, Framework ve monolittir. Nanopartiküller 1 ile 100 nanometre (nm) arasında büyüklükte partiküllerdir. Kanserojen analizi için kullanılan nanopartikül, aktif karbon sorbenttir. Alkaloid konsantrasyonu TSNA'dan bin kat daha yüksek olmasına rağmen, benzer moleküler yapıya sahip oldukları için TSNA ve alkaloidi (nikotin, nornikotin vb.) ayırt etmek çoğu zaman güç olabilmektedir [32]. Bu yüzden karmaşık çözelti içinde eser miktardaki TSNA'yı ayırt edici bir şekilde yakalamak için TSNA'nın moleküler yapısı ile nanopartiküllerin gözenek boyutu arasındaki uygunluk göz önünde bulundurulmuş ve adsorpsiyon tercih edilmiştir. Bu amaçla kullanılması düşünülen sorbentin, tercihen NNK'yı TSNA bileşenleri arasından yakalaması beklenir çünkü NNK en güçlü kanserojenliğe sahiptir. Bunun içinde yeni seçici sıvı adsorbanın gerekli olduğu düşünülmüştür [33].

Zeolitler ve mezogözenekli silika, klasik seçici adsorbanlar olup, gaz akışındaki uçucu nitrozaminleri (VNA) seçici olarak emebilirler. Bununla birlikte, TSNA'nın sıvı çözelti içinde sıvı adsorpsiyonu, VNA'nın gaz halinde adsorpsiyonundan tamamen farklıdır. İlk olarak, çözücü olarak kullanılan suyun adsorpsiyonu, NaY gibi birçok hidrofilik zeolitleri deaktive eder, bu nedenle TSNA'nın sıvı adsorpsiyonunda sadece ZSM-5 gibi bazı hidrofobik zeolitler kullanılabilir. İkinci olarak, TSNA molekülü, VNA ile karşılaştırıldığında çok daha yüksek molekül ağırlığına sahiptir [27]. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada aktif karbona ilk kez zeolitinkine benzer seçici bir adsorpsiyon kabiliyeti verilmiştir. Hindistan cevizi kabuğundan yapılan aktif karbonda en uygun mikro ortamı oluşturmak için sorbent ferrik asetat ile doyurularak dikkatlice modifiye edilmiştir (*Şekil 3*). Sonuç olarak, yeni aktif karbon sorbent, nikotin ekstratı çözeltisinde bulunan TSNA'ların 1796 ng mL⁻¹ konsantrasyonla %60'ını yakalamış ve bugüne kadarki en yüksek kapasiteyi (222 µg g⁻¹) sergilemiştir. Ayrıca, NNK'nın % 98,5'ini yakalamak için sıvı adsorpsiyonunda zeolit benzeri bir seçicilik göstermiştir. Ayrıca, yeni aktif karbon sorbent tarafından TSNA'ların çözelti içinde bulunan alkaloidlerden ayırt edilerek adsorpsiyonu keşfedilmiş ve bu da yeni seçici sorbentlerin geliştirilmesi için değerli bir ipucu sağlamıştır [33]. Zeolit bu yeni özelliklerinin anlaşılması yeni ve çok yönlü malzemelerin tasarımı ve geliştirilmesi için önemli bir adım olmuştur.



Şekil 3. Ferrik oksit modifikasyonu ile TSNA adsorpsiyonu [33]

Yapılan çalışmada, TSNA'ya uyan nanopartikülün seçiciliği ne kadar yüksek ise, ekstraksiyon yüzdesinin de o kadar arttığı ve örnekte daha az TSNA kaldığı görülmüştür [33]. Ayrıca farklı bir çalışmada demir oksit eklenmesiyle, karbon sorbentin gözenek boyutunun değiştirilebileceği ve hedef analit için daha uygun hale gelebileceği, böylece TSNA ekstraksiyonunun veriminin de artabileceği bildirilmiştir [32]. Mezogözenekli silikanın yüksek kapasitesinin ve mikro gözenekli zeolitinin birleştirilerek yeni bir işlevsel malzeme kullanılan bir çalışma da yapılmıştır. Kullanılan mezogözenekli silika SBA-15 ile %58 oranında NNK seçiciliği sağlanmıştır [28].

Termodinamik çalışmalar, NNK'nın grafen aerogel üzerine adsorpsiyon sürecinin kendiliğinden ve ekzotermik olduğunu göstermiştir. NNK'nın sulu çözeltiden çıkarılması için grafen aerogeli adsorpsiyonunun kullanıldığı bir çalışmada adsorpsiyon için en elverişli koşullar yüksek pH ve düşük sıcaklık olarak bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca NNK'nın grafen aerogeli üzerindeki adsorpsiyon mekanizmasının π - π dağılım etkileşimi yoluyla olduğu ve adsorpsiyon verimliliğinin -NO₂ fonksiyonel gruplarının varlığı ile arttığı sonucuna varılmıştır. NNK molekülünde bulunan piridin halkası, π - π dağılım etkileşimini kolaylaştırmaktadır. Çalışmada grafen aerogelin NNK emme kapasitesi için geri dönüşüm performansı da değerlendirilmiş ve altı döngü deneyi yapılmıştır. Aynı deneysel koşullar altında, grafen aerogelinin adsorpsiyon kapasitesinde belirgin bir azalma olmamıştır. Elüent olarak metanol sulu çözeltisinin kullanıldığı 6 döngüden sonra bile, NNK adsorpsiyon kapasitesinin %90'ından fazlası korunarak etkili bir adsorpsiyon performansı elde edilmiştir [34].

Gelecekteki çalışmalar için, nanomalzemeler, bütün kanserojenlerini analiz etmede büyük potansiyeller gösterdi, çünkü bunlar, karmaşık problemleri çözmede ve kimyasal analiz ve algılama kabiliyetini genişletmede daha fazla işlev ve etki için potansiyel olarak daha da geliştirilebilecek yeni alanlar oldular. Nanomalzemelerin özel özelliklerinden dolayı performanslarının kesinliği sağlanır. Hedeflenen ve hedeflenmeyen metabolomik çalışmasının kombinasyonuyla birlikte, ekipman ve kimyasal analiz yöntemindeki gelişmeler yeni keşifler bekliyor.

3. BİYOLOJİK ÖRNEKLERDE TSNA'LARIN ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.1. Sıvı Kromatografisi ile Analiz

Sıvı kromatografisi (LC), genellikle polar ve kaynama noktası yüksek olan bileşikler için güçlü bir teknik olarak kabul edilmekte ve nitrozaminlerin analizlerinde ultraviyole (UV) ve kütle spektrometresi (MS) ile birlikte kullanılmaktadır. Günümüzde biyolojik örneklerde TSNA tayininde genellikle LC/MS/MS tekniği kullanılmaktadır.

3.1.1. Biyolojik örneklerde LC/UV ile yapılan çalışmalar

NNK tayini için LC/UV ile geliştirilen yöntemde NNK'nın yapısında bulunan karbonil grubu enzim yardımıyla indirgenmiş ve oluşan NNAL metaboliti, izokratik elüsyon ile 230 nm'de ölçülmüştür. Yöntemin algılma limiti (LOD) de 3,2 ppb olarak bildirilmiştir [35].

3.1.2. Biyolojik örneklerde LC/MS/MS ile yapılan çalışmalar

İdrar örneğinde NNK ve NNAL'ı aynı anda ölçmek için LC-tandem MS/MS ile hassas ve seçici bir yöntem geliştirilmiş ve online katı faz ekstraksiyon (SPE) ile analiz süresi toplam 19 dakika olarak bildirilmiştir. Yöntemin LOD değerleri, NNK ve NNAL için sırasıyla 0,13 ve 0,19 pg olarak bulunmuş olup, 101 sigara içen ve 40 içmeyen kişiden alınan idrar örneklerinde NNK bulunmamıştır. Sigara içenlerin tamamına ait idrar örneklerinde serbest NNAL (0,10 ± 0,09 ng/mg kreatinin) ve toplam NNAL (0,17±0,14 ng/mg kreatinin) saptanmıştır. Bu çalışmada NNAL miktarıyla idrarda bulunan metillenmiş DNA lezyonları arasında yüksek oranda ilişki bulunmuştur. Ayrıca NNAL tayininin bütün dumanına maruz kalmaktan kaynaklı kanser riskini doğrulamaya yardımcı olabileceği gösterilmiştir [21]. Katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve moleküler baskılı polimer (MIP) kolonları kullanılarak ekstraksiyonu yapılan idrar örneklerinde NNK, NNN, NNAL, NAT ve NAB analizi yapılmıştır. Yöntem için 5 mL idrar örneği

kullanılmış ve MIP kolon hazırlığı için 48 saat, kromaografik analiz içinde 14 dakikalık çalışma süresi harcanmıştır. Valide edilen yöntem 50 sigara kullanan ve 30 sigara kullanmayan kişilerin idrar örneklerine başarıyla uygulanmıştır [20]. İdrar örnekleri ile yapılan başka bir çalışmada toplam NNAL'ın belirlenmesi için moleküler baskılı polimer (MIP) kolon kullanılarak geliştirilen analitik yöntem valide edilmiştir. MIP kolon ekstraksiyonu ve LC/MS/MS kombinasyonu ile geliştirilen yöntemin LOD değeri 0,30 pg/mL ve analiz süresi 6 dakika olarak bildirilmiştir. 36 sigara içmeyen ve 207 sigara içen kişinin idrar örnekleri ile yapılan çalışmada, sigara içenlerin idrarında bulunan NNAL içmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur [24].

Hamilelik sırasında sigara kullanmak sadece anne için değil, gelişmekte olan fetüs için de çeşitli olumsuz sonuçlara neden olmaktadır. Birçok çalışma, tütün dumanında bulunan kanserojenlerin plasentaya geçtiğini ve fetüste bulunduğunu göstermiştir. Gerek sigara kullanan gerekse pasif içici olan annelerin ve bebeklerinin idrar örneklerinde NNAL ölçümlerine dayanarak tütüne özgü kanserojen nitrozaminlere doğum öncesi maruziyeti belirlemek için bir çalışma yapılmıştır. Sigara içen annelerin idrar örnekleri ve yeni doğan bebeklerinin ilk idrarlarında NNAL miktarını belirlemek için bir çalışma yapılmıştır. Örnekler LLE sonrası LC/MS/MS'e verilmiş ve yöntemin LOD değeri NNAL için 5 pg/mL olarak bildirilmiştir [16]. İdrar örneklerinde NNAL'ı ölçmek için yapılan farklı bir çalışmada API 3000 triple quadruple MS ve SPE ile birleştirilmiş LC sistemi kullanılmıştır. 250 µL idrar örneklerinin kullanıldığı yöntemde LOD değerleri NNK için 20 pg/mL, NNAL için ise 10 pg/mL olarak bulunmuş ve kromatografik analiz süresi 20 dakika olarak bildirilmiştir [36].

Elektronik sigara (e-sigara) kullanıcılarından yayılan aerosole pasif olarak maruz kalan sigara içmeyen kişilerde NNAL düzeylerini değerlendirmek için bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada, 25'i evde sigara içenlerle, 6'sı e-sigara kullanıcılarıyla ve 24'ü sigara kullanmayanlarla birlikte yaşayan toplam 55 kişiden idrar örnekleri alınmış ve LC/MS/MS ile analiz edilmiştir. Yöntemin kantitatif tayin sınırı (LOQ) 0,25 pg/mg olarak bildirilmiştir [37].

NNK ve NNAL'ın eş zamanlı tayini için UFLC/MS/MS (Ultra Fast) ile yöntem geliştirilmiş ve sıçan idrarına uygulanmıştır. İdrarda NNK ve NNAL'ın kantitatif tayininde Evolute® Express CX 96 kullanılarak 150 µL düşük numune hacmi ve 7.1 dakikalık kısa kromatografik çalışma süresi bildirilmiştir. Yöntemin LOD değerleri NNK ve NNAL için sırasıyla 70 ve 3 pg/mL olarak saptanmıştır [22].

TSNA miktarları ile kanser türleri arasında en uygun belirteci bulmak için yapılan bir çalışmada tükürük örnekleri kullanılmıştır. Örnekler, DCM/izo-propanol karışımı ile LLE işleminden sonra LC/MS/MS ile analiz edilmiştir. Geliştirilen yöntemin LOD değerleri, NNK, NNK ve NNAL için sırasıyla 1,2 ve 0,5 pg/mL olarak bulunmuştur [17].

Saç örneklerinde NNK miktarının izlenmesi, özellikle sigara içmeyen popülasyonda, pasif içiciliğe (SHS) maruz kalan bireylerde kanserojen riski için iyi bir gösterge olabileceği düşüncesi ile bir çalışma yapılmıştır. Sigara kullanmayan 48 gönüllünün saç örnekleri DCM ile ultrasonik ekstraksiyonda tutulmuş ve DCM/2-propanol (75:25) çözücü karışımı kullanılarak LLE ile NNK ekstrakte edilmiştir. Organik faz azot gazı altında uçurulduktan sonra ACN/metanol (95:5) ilavesi ile analizler LC/Tandem/MS'de yapılmıştır. Numune miktarları 5 ve 50 mg arasında değişen miktarlarda analiz edilmiş ve kantitatif tayin sınırı (LOQ) değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Saç örneklerinde TSNA sınıfında çalışabilecek en uygun nitrozamin NNK olarak bildirilmiştir [17]. Saç numunelerinde NNAL analizinin de kanser riski değerlendirmesi ve tütüne maruziyetle ilgili kanser önleme çalışmalarına yardımcı olabileceğini düşünülmüş ve tayin için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Çalışmada sigara kullanan deneklerin saç örnekleri alınmıştır. Saç numunesi, NaOH çözelti ile işleme tabi tutulduktan sonra C18 SPE ve SPE-MIP ile ekstrakte edilmiştir. İlâveten %1 sulu formik asit içinde ters faz ultrason destekli dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon (USA-DLLME) ile daha da zenginleştirilmiştir. Örnekler en son LC/MS/MS ile analiz edilmiştir. Geliştirilen yöntemin NNAL için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,08 ve 0,24 pg/mg saç olarak bildirilmiştir [26].

Serumda NNN ve NNK'nın eş zamanlı kantitatif analizi için yeni ve oldukça hassas izotop seyreltme ultra yüksek basınçlı (UPLC) hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisine (HILIC) bağlı tandem kütle spektrometresi HILIC-UPLC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Yöntemde, analitleri serumda bulunan endojen bileşiklerden ayırmak için "tek kapta" LLE yapılmış ve sadece 10 µL serum veya plazma numunesi kullanılmıştır (*Şekil 1*). HILIC, polar ve iyonik bileşiklerin tutulmasını arttırdığı için ters faz kromatografisine göre daha iyi bir kromatografik çözünürlük sağlamaktadır. HILIC'in diğer bir avantajı, protein çökeltme, LLE ve diğer saflaştırma tekniklerinde kullanılan organik çözücülerin kromatografik sistem üzerine doğrudan enjeksiyon imkanının olmasıdır. HILIC'in elektrosprey-MS'e (ESI-MS) bağlanması sırasında, yüksek organik içerikli mobil faz elüatındaki iyon desolvasyonunun yüksek etkinliği nedeniyle hassasiyet de artmaktadır [38-42] Yöntemin sağladığı en önemli avantaj yalnızca 10 µL serum gerektirmesidir. Fetal (bovine) sığır serumu ile validasyonu yapılan yöntemde kantitatif tayin sınırı (RSD < %20'ye dayanan LLOQ) NNK için 0,05 pmol (10 pg/mL) ve NNN için 0,06 pmol (10 pg/mL) olarak bildirilmiştir. Yöntem kan türevli matris içeren sıçan serumu, hamster serumu ve hamster plazmasına da uygulanmış ve farmakokinetik değerlendirmeler için kullanılabilmesi bildirilmiştir [18].

Farklı biyolojik örneklerde TSNA'ların tayini için LC/MS/MS ile geliştirilen yöntemlerin LOD değerleri *Çizelge 2*'de verilmiştir.

Çizelge 2. Biyolojik örneklerde TSNA'ların tayini için LC/MS/MS ile geliştirilen yöntemlerin LOD değerleri

| Matriks | LOD NNK pg/mL | LOD NNN pg/mL | LOD NAT pg/mL | LOD NAB pg/mL | LOD NNAL pg/mg | Referans |
|---------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------|
| İdrar | 2,6 | | | | 38 | [21] |
| İdrar | | | | | 0,30 | [24] |
| İdrar | | 0,8 | 0,7 | 1,1 | 2,0 | [25] |
| Tükürük | 2 | 1 | | | 0,5 | [17] |
| Tırnak | | 0.02 | | | 0,02 | [15] |
| Saç | | | | | 0,08 | [26] |
| İdrar | 0,6 | 0,6 | 0,4 | 0,4 | 10 | [20] |
| İdrar | 20 | | | | 10 | [36] |
| İdrar | 70 | | | | 3 | [22] |
| İdrar | | | | | 0,25* | [37] |
| Plazma | 1,3 | 3 | 0,9 | 2 | 3,7 | [11] |
| İdrar | | | | | 5 | [16] |
| Serum | 10* | 10 * | | | | [18] |

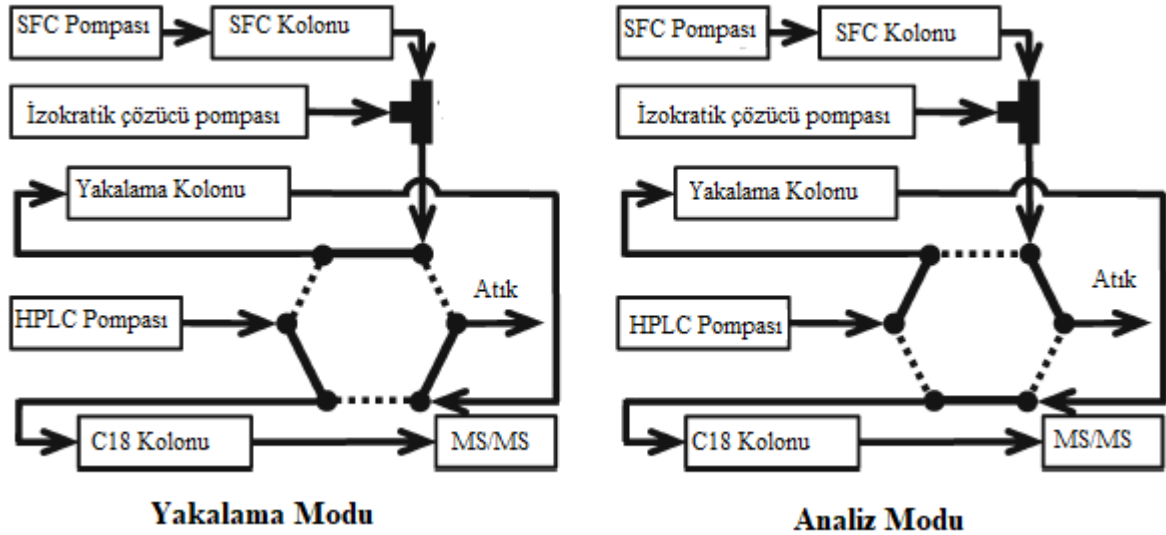
* LOQ değerleri

3.2. Süper Kritik Sıvı Kromatografisi (SFC) ile Analiz

Süper kritik CO₂'i birincil mobil faz bileşeni olarak kullanan süper kritik sıvı kromatografisinin (SFC), normal fazlı sıvı kromatografisi (NPLC) için bir alternatif olduğu düşünülmektedir. İki boyutlu LC sisteminin performansı, ayırma ortogonalitesine bağlı olduğundan SFC ve HPLC'ye dayalı iki boyutlu (2D) LC sisteminin karmaşık örneklerin belirlenmesi için umut verici bir yöntem olabileceği bildirilmiştir [43]. SFC-HPLC sisteminin en önemli avantajı, NPLC-HPLC'de karşılaşılan mobil fazlar arasındaki çözücü uyumsuzluğu probleminin üstesinden gelmesidir. Atmosferik basınca maruz kaldığında süper kritik CO₂'nin genişlemesi, 2D kolon ile tamamen uyumlu fraksiyonlara yol açmaktadır.

SFC-HPLC sisteminin TSNA analizi için çok uygun olabileceğini düşünülmüş ve bir çalışma yapılmıştır. Çalışma, TSNA'ların belirlenmesi için 2D süper kritik sıvı kromatografisi-yüksek performanslı sıvı kromatografisine bağlı tandem kütle spektrometresi (SFC-HPLC-MS/MS) ile

geliştirilmiş ve Şekil 4’de gösterilmiştir. Geliştirilen yeni yöntem sigaraya uygulanmış ancak biyolojik örneğe uygulamamıştır. 1-AA kolonu, hedef bileşikleri karmaşık sigara dumanı matrislerinden izole etmek için birinci boyutlu (1D) SFC ayırması için uygulanmıştır. Ayrıca 1D elüentlerini yakalamak için izokratik bir pompa ile birlikte bir yakalama kolonu kullanılmıştır. Daha sonra, yakalanan 1D elüentleri, ikinci boyutlu (2D) analiz için iki konumlu/altı portlu bir valf aracılığıyla C18 kolonuna aktarılmıştır. Sonuçlar matriks etkisinin ortadan kalktığını göstermiştir. Çalışma, sunulan yöntemin iyi tekrarlanabilirlik ve geri kazanımlar sergilediğini ve ana dumandaki TSNA’ların rutin analizi için hızlı ve güvenilir bir yaklaşım olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur [44].



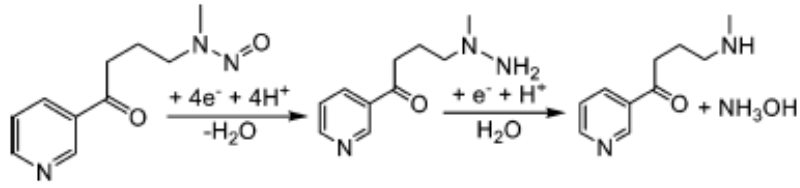
Şekil 4. SFC-HPLC-MS/MS sisteminin şematik görünümü [44]

3.3. Gaz Kromatografisi ile Analiz

Uçucu bileşikler için genellikle tercih edilen gaz kromatografisi (GC) nitrozaminler için termal enerji analizörü (TEA), MS ve azot kemilüminesans (NCD) gibi farklı dedektörler ile kullanılmaktadır. Oldukça hassas ve seçici olmalarına karşın TEA dedektörünün sık tercih edilmeme sebebi; NO ve NO₂ gruplarına duyarlı olduğundan sadece nitrozo bileşikleri için kullanılmalıdır. MS dedektörleri ise iyonlaştırıcı olarak elektron çarpması (EI) ve kimyasal iyonizasyon (CI) ile biyolojik örneklerde nitrozaminler için istenen LOD değerlerini sağladığından yaygın olarak kullanılmaktadır [5,45].

3.4. Biyosensörler ile Analiz

Elektrokimyasal yöntem, kromatografik yöntemler ile karşılaştırıldığında daha basit numune hazırlama prosedürü, daha kısa işlem süresi ve daha düşük maliyet gibi özellikleri ile avantaj sağlamaktadır. Nitrozaminler, heme demiri ile doğrudan bir koordinasyon ile sitokrom P450'nin etkileşime girdiğinde biyolojik hasar vermektedir [46]. Bu yüzden heme grubu heterojen elektrokatalizör gibi davranabilir diye düşünülmüş ve hemin fonksiyonlu elektrot üretimi çalışmaları yapılmıştır. NNN ve NNK'nın indirgenmesi için düşük potansiyellerde, elektrokatalitik aktivitesi yüksek yeni redoks elektrotları (hemin fonksiyonlu karbon nanotüplere dayanan) üretilmiştir. Bu elektrotlar, çeşitli elektrolit ortamında ve pH koşullarında test edilmiştir. Ayrıca nitrozaminlerde bulunan nitrozo grubunun asidik ortamda önce hidrazin sonra sekonder aminlere indirgendiği reaksiyon mekanizması önerilmiştir (Şekil 5) [47].



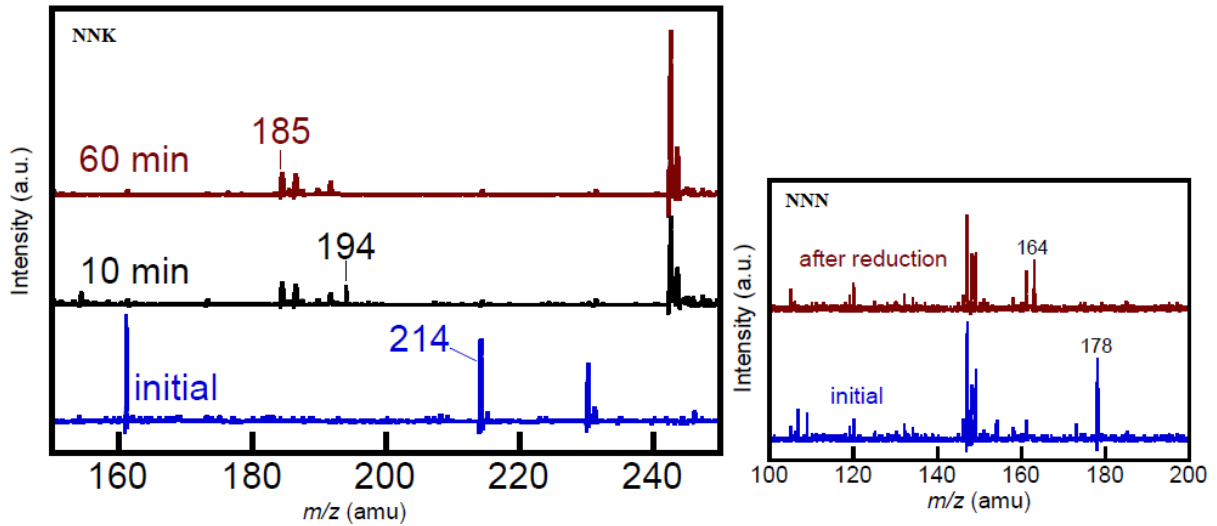
Şekil 5. Asidik ortamda NNK'nun indirgenme reaksiyonları [47]

Elektrokimyasal indirgeme sonucu oluşan ürünlerin yapı aydınlatması için Matris Destekli Lazer Desorpsiyon (MALDI)-Uçuş zamanlı (TOF) ve ESI spektrometresi kullanılmıştır. NNK ve NNN'nin elektrokimyasal indirgeme sonrası ürünlerine ait MALDI-TOF spektrumları Şekil 6'da verilmiştir. Başlangıç konsantrasyonları NNK için 1 mM ve NNN için ise 1,1 mM olup, çalışmada elektrolit olarak 0,1 M LiClO₄ (pH, HCl ile 1.5'e ayarlanmıştır), çalışma elektrodu olarak toray karbon kağıdı üzerinde hemin-CNT, referans elektrot olarak Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak Pt tel kullanılmıştır. Şekil 6'da verilen spektrumda tanımlanan katyonik fragmanlar;

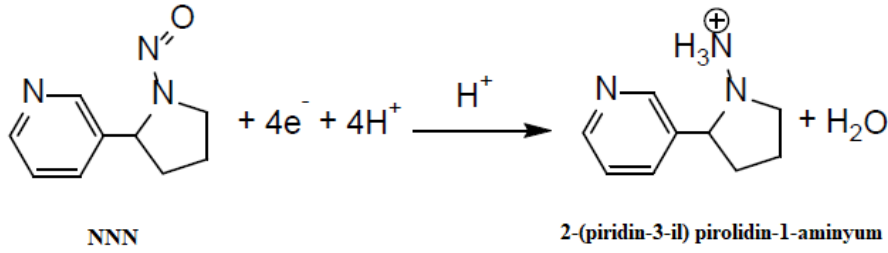
- Mavi renkli ilk spektrumda yer alan m/z 214; NNK'nın N-metil-N-(4-okso-4-(piridin-3-il)butil) nitroz amid, lityum tuzu ([M+Li]⁺ fragmanıdır.
- İkinci spektrumdaki m/z 194; 2-metil-2-(4-okso-4-(piridin-3-il)butil) hidrazin-1-ium. Bu fragman Şekil 5'de de gösterildiği gibi NNK indirgemesinin hidrazin ürünü olup kronoamperometrik indirgeme başladıktan 10 dakika sonra tespit edilmiştir.
- Üçüncü spektrumdaki m/z 185; hidrazin indirgemesinin ikincil amin ürünü olan 4-(metilamino)-1-(piridin-3-il) bütan-1-on lityum tuzudur.

Şekil 6'da NNN'nin -1.5 V sabit potansiyelde 10 dakika boyunca elektrokimyasal indirgeme reaksiyonundan sonra MALDI-TOF spektrumunda tanımlanan katyonik fragmanlar;

- Birinci spektrumda yer alan m/z 178; [NNN+H]⁺ iyonudur.
- İkinci spektrumda yer alan m/z 164; 2-(piridin-3-il) piperidin-1-aminyum indirgenme ürünüdür. Spektrum ile kanıtlanan NNN indirgenme reaksiyonu ise Şekil 7'de verilmiştir [48].

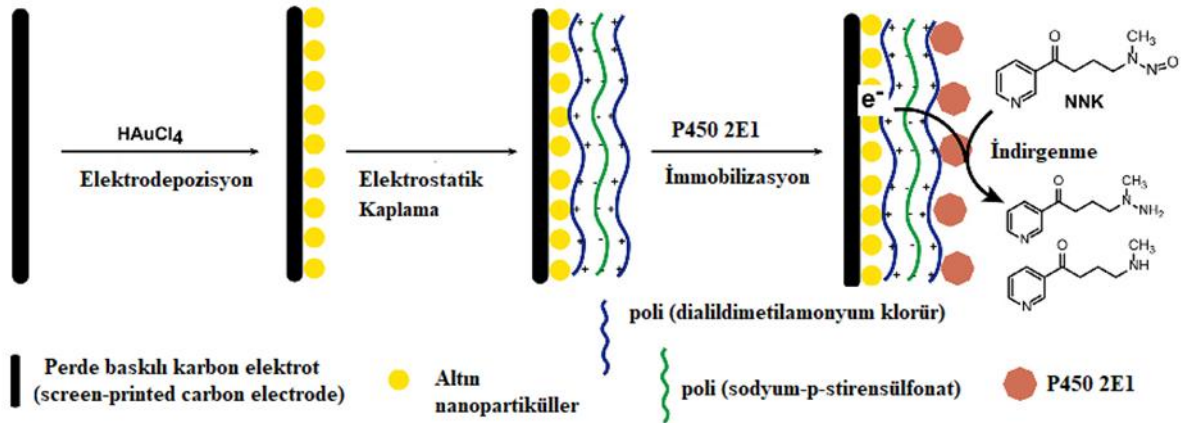


Şekil 6. NNK ve NNN'nin elektrokimyasal indirgeme sonucu oluşan ürünlerine ait MALDI-TOF spektrumları [48]



Şekil 7. Asidik ortamda NNK'nin indirgenme reaksiyonu [48]

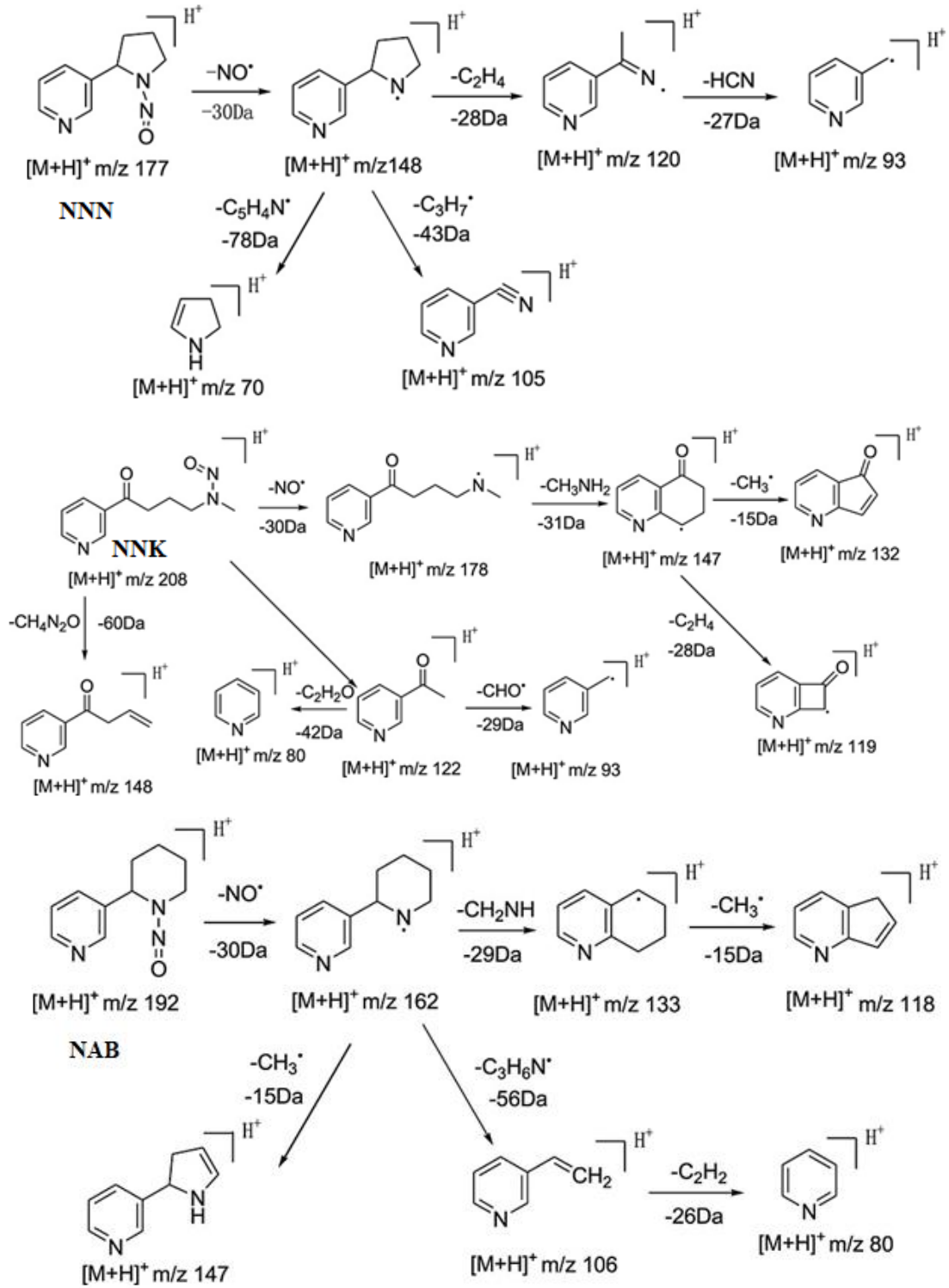
Elektrokimyasal olarak NNK'nin tespiti için, sitokrom P450 redüktaz mikrozoamları da kullanılabilir. P450 2E1, pek çok nitrozaminin oksidasyon reaksiyonlarında rol oynadığından, P450 2E1 (CYP2E1) ile NNK analizi için biyosensör geliştirilmiştir [48]. Elektrot modifikasyon işlemleri için elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılan çalışmada üretilen biyosensörün performansı da değerlendirilmiş ve geliştirilen yöntem valide edilmiştir. Biyosensörün duyarlılığı $79 \mu A \text{ cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$ ve yöntemin LOD değeri NNK için $7,71 \mu M$ olarak bulunmuştur. Biyosensör, yapay idrar numunesinde NNK tayini için başarıyla kullanılmıştır [49]. NNK'nin elektrokimyasal analizi için üretilen biyosensöre ait işlem basamakları Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. NNK'nin elektrokimyasal analizi için üretilen biyosensöre ait işlem basamakları [49]

3.5. TSNA'ların Kütle Spektrometrisindeki Parçalanma Mekanizmaları

TSNA'ların karakteristik parçalanma davranışları, elektrosprey iyonizasyon (ESI) multistage tandem MS ile incelenmiştir. Dötoro etiketli TSNA bileşikler, önerilen parçalanma mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için kullanılmıştır. Ortaya çıkan fragmanların detaylı analizi yapılmış ve piperidin veya pirolidin halkasının ana omurgayı oluşturduğu görülmüştür. Pirolidin veya piperidin halkaları, doğrudan parçalanmaya uğrayabilir ve ana halkaları etkilemeden bazı kararlı ara maddeler oluşturabilir veya piridin-2 karbon atomunda halka açılması ve ardından halka kapanması ile farklı ürünler oluşabilir. NNK, NNK ve NAB için önerilen parçalanma mekanizmaları Şekil 9'da verilmiştir [21].



Şekil 9. NNN, NNK ve NAB için önerilen parçalanma mekanizmaları [21]

İyonlaştırıcı olarak elektron bombardımanının (EI) kullanıldığı sistemlerde nitrozaminleri oluşturan aminlerin moleküler iyonları, NO gruplarının ayrılması ile oluşur ve oluşan $(M-30)^+$ pikleri nitrozo bileşikleri için karakteristiktir [5].

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Sigara dumanına maruz kalma, başta akciğer kanseri olmak üzere diğer organlar için de önde gelen risk faktörüdür, ancak sigarada bulunan kanserojen TSNA'ların tümör ve kanser gelişimindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. TSNA sınıfından özellikle kanserojen etkisi olan NNN ve NNK'nın tütün ve tütün ürünlerinde kalitatif ve kantitatif tayinleri ile ilgili çok fazla çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada özellikle biyolojik örnekler ile yapılan çalışmalar sunulmuştur. Biyolojik örneklerde TSNA analizinde matriks ortamına göre çeşitli yöntemler ve teknolojiler kullanılmıştır. Her yöntemin bir takım analitik zorlukları bulunmaktadır. Bu nedenle, farklı kullanımları ve özelliklerini göz önünde bulundurarak farklı amaçlar için en iyi yolun seçilmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda kütle spektrometresi, biyolojik örneklerde eser miktarda bulunan TSNA'ların analizinde vazgeçilmez olduğunu göstermiştir. Biyolojik örneklerde NNN ve NNK miktarlarının takibi sigara dumanı maruziyeti kaynaklı tümör ve kanser mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir. Gelecekteki çalışmalar için gerek ekstraksiyon gerekse analiz basamaklarında MIP, biyosensörler ve nanomalzemelerin kullanıldığı teknikler, karışık matris ortamlarında TSNA analiz etmede hedef bileşikler için daha seçici ve hassas olduğundan potansiyel olarak daha da geliştirilebilecek yeni alanlardır.

KAYNAKLAR

- [1] Hecht, S.S. and Hoffmann, D. (1988). Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*, 9: 875-884.
- [2] International Agency for Research on Cancer (IARC) (1978). Some N-nitroso compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Risks to Humans, 17: ISBN-109283212177.
- [3] Sugeçti, S. (2021). Pathophysiological effects of Klebsiella pneumoniae infection on Galleria mellonella as an invertebrate model organism. *Archives of Microbiology* <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02346-y>.
- [4] Xue, J., Yang, S., Seng, S. (2014). Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. *Cancers*, 6:1138-1156.
- [5] Sleiman, M., Maddalena, R.L., et al. H. (2009). Rapid and sensitive gas chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry method for the determination of tobacco-specific N-nitrosamines in secondhand smoke. *Journal of Chromatography A*, 1216(45):7899-7905.
- [6] Lin, R.K., Hsieh, Y.S, Lin, P., et al. (2010). The tobaccospecific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients. *Journal of Clinical Investigation*, 120:521-532.
- [7] Hebel, D.G.A.J, Briede, J.J., Khampang R, Kleinjans, J.C.S., de Kok, T.M.C.(2010). Radical Mechanisms in Nitrosamine- and Nitrosamide-Induced Whole-Genome Gene Expression Modulations in Caco-2 Cells. *Toxicological Sciences*, 116 (1):194-205.
- [8] Coglian, V. J., Baan, R., Straif, K., et al. (2011). Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer I*, 103(24): 1827-1839.
- [9] Kwak, S., Choi, Y.S., Na, H.G., et al. (2020). Effect of Tobacco-specific Nitrosamines on MUC5AC Expression in Human Airway Epithelial Cells. *Journal of Rhinology*, 27(1):34-40.
- [10] Stepanov, I., Carmella, S.G., Briggs, A., et al. (2009a). Presence of the carcinogen N'-nitrosornicotine in the urine of some users of oral nicotine replacement therapy products. *Cancer Research*, 69: 8236-8240.
- [11] Wang, L., Yang, C., Zhang, Q., et al. (2013). SPE-HPLC-MS/MS method for the trace analysis of tobacco-specific N-nitrosamines and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in rabbit plasma using tetraazacalix[2]arene[2]triazine-modified silica as a sorbent. *J. Sep. Sci.* 36:2664-2671.
- [12] Zhao, B., Wang, S., Wang, J., et al. (2012). Analysis of N'-nitrosornicotine and its metabolites in rabbit blood with liquid chromatography/tandem mass spectrometric method, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 899:103-108.
- [13] Lang, H., Wang, S., Zhang, Q., Zhao, B., et al. (2013). Simultaneous determination of NNK and its seven metabolites in rabbit blood by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405:2083-2089.
- [14] Gabr, R.Q, Elsherbiny, M.E., Somayaji, V., Pollak, P.T., Brocks, D.R.A. (2011). liquid chromatography-mass spectrometry method for nicotine and cotinine; utility in screening tobacco exposure in patients taking amiodarone, *Biomed. Chromatogr.*, 25:1124-1131.
- [15] Stepanov, I., Hecht, S.S. (2008). Detection and Quantitation of N'-Nitrosornicotine in Human Toenails by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 17(4):945-948.

- [16] Florek, E., Piekoszewski, W., Basior, A., et al. (2011). Effect Of Maternal Tobacco Smoking Or Exposure To Second-Hand Smoke On The Levels Of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanol (NNAL) In Urine Of Mother And The First Urine Of Newborn. *Journal Of Physiology And Pharmacology*, 62(3):377-383.
- [17] Ortuño, R.P., Martínez-Sánchez, J.M., Fu, M., Fernández, E., Pascual, J.A.(2016). Evaluation of tobacco specific nitrosamines exposure by quantification of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human hair of non-smokers. *Sci Rep*, 26(6):25043.
- [18] Loukotková, L., VonTungeln, L.S., et al. (2018). A simple and highly sensitive UPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of nicotine, cotinine, and the tobacco-specific carcinogens N'-nitrosornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in serum samples. *Journal of Chromatography B*, 1072:229–234.
- [19] Biotage, (2013). Application Note AN787: Extraction of Nicotine and Metabolites from Urine, Serum, Plasma and Whole Blood Using ISOLUTE® SLE+ Prior to LC-MS/MS Analysis, (2017) <http://www.biotage.com/literature/search?keywords%5B%5D%5B%5D=527>.
- [20] Xia, B., Xia, Y., Wong, J., et al. (2014). Quantitative Analysis of Five Tobacco Specific NNitrosamines in Urine by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 28:375–384.
- [21] Hu, A.F., Jiang, J., Zhou, G.J., Yang J. et al. (2014). Characteristic fragmentation behavior of tobacco-specific N-nitrosamines using electrospray ionization multistage tandem mass spectrometry incorporating deuterium labeling. *Rapid Commun Mass Spectr.*, 28(15):1658-64.
- [22] Sepehr, E., Woodling, K.A, Bryant, M.S.(2018). Rapid quantitation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and its metabolite 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in rat urine using ultra-fast liquid chromatography mass spectrometry (UFLC/MS/MS). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 4(8): 422–429.
- [23] Widstrand, C., BoydJohan, B., Rees, B.A.(2006). Efficient Extraction of Toxic Compounds From Complex Matrices Using Molecularly Imprinted Polymers. *American Laboratory*, 39(17).
- [24] Hou, H., Zhang, X., Tian, Y., et al. (2012). Development of a method for the determination of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in urine of nonsmokers and smokers using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.*, 7(63):17-22.
- [25] Kavvadias, D., Scherer, G., Urban, M., et al. (2009). Simultaneous determination of four tobacco-specific N-nitrosamines (TSNA) in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 877(11-12):1185-92.
- [26] Yao, L., Yang, J., Guan, Y., et al.(2012). Development, validation, and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in human hair. *Anal Bioanal Chem*, 404:2259–66.
- [27] Li, Y.Y., Wan, M.M., Zhu, J.H., (2014). Cleaning carcinogenic nitrosamine with zeolites. A review, *Environ. Chem. Lett.* 1:139–152.
- [28] Li, S.H., Sun, X.D., Wang, Y.Z., et al. (2017). Novel mesoporous composite with zeolite-like selectivity to capture tobacco specific nitrosamine NNK *Chemical Engineering Journal* (IF 10.652) Pub Date:2017-09-17, DOI: 10.1016/j.cej.2017.09.090.
- [29] Sun, X.D., Shi, C.L., Li, S.H., et al. (2018). New shape-selectivity discovered on graphene-based materials in catching tobacco specific nitrosamines. *J. Hazard. Mater.*, 358:234–242.
- [30] Xu, T.G., Shi, R., Lu, N., Zhang, J., et al. (2018). Adsorption of tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone from aqueous solution with graphene aerogel. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, 324, 012028.
- [31] Yong-Qiang P., Xiao-Jing, C., et al. (2019). Magnetic solid-phase extraction of tobacco-specific N-nitrosamines using magnetic graphene composite as sorbent. *J Sep Sci* 42:3119–25.
- [32] Jiang, H. (2020) Investigation of Carcinogenic Compounds in Tobacco Smoke. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 9:3.
- [33] Shi, C.L., Li, S.H., Sun, X.D. (2018). New activated carbon sorbent with the zeolite-like selectivity to capture tobacco-specific nitrosamines in solution. *Chemical Engineering Journal*, 339:170-179.
- [34] Xu, T.G, Shi, R. Lu, N., Zhang,J., Bai, R.S., Yang, Z.D., Zhou,J. (2018). Adsorption of tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino) -1- (3-pyridyl)-1-butanone from aqueous solution with graphene aerogel. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 324 012028.
- [35] Skarydova, L., Zverinova, M., et al. (2012). Simple Identification of Novel Carbonyl Reducing Enzymes in the Metabolism of the Tobacco Specific Carcinogen NNK *Drug Metabolism Letters*, 6:3.
- [36] Lee, H.L., Wang, C., Lin, S., Hsieh, D.P. (2007). Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometric Method for the Simultaneous Determination of Tobacco-Specific Nitrosamine NNK and its Five Metabolites. *Talanta*, 73(1): 76–80.

- [37] Martínez-Sánchez, J.M., Ballbè, M., Ortuno, R.P., et al. (2019). Secondhand exposure to aerosol from electronic cigarettes: pilot study of assessment of tobacco-specific nitrosamine (NNAL) in urine. *Gac Sanit.*, 33(6):575–578.
- [38] Dobrin, M., Choong, E., Noetzli, M., Cornuz, J. et al. (2011). Quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine and varenicline in human plasma by a sensitive and specific UPLC–tandem mass-spectrometry procedure for a clinical study on smoking cessation, *J. Chromatogr. B*, 879:3574–3582.
- [39] Baumann, F., Regenthal, R., Burgos-Guerrero L.L., et al. (2010). Determination of nicotine and cotinine in human serum by means of LC/MS, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878:107–111.
- [40] Li, P., Beck, W.D., et al. (2012). Quantitation of cotinine and its metabolites in rat plasma and brain tissue by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS), *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 907:117–125.
- [41] Hendrickx, S., et al. (2015). Recent advances in the application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of biological matrices, *Bioanalysis*, 7:2927–2945.
- [42] Isokawa, M., Kanamori, T., Funatsu, T., Tsunoda, M. (2014). Recent advances in hydrophilic interaction chromatography for quantitative analysis of endogenous and pharmaceutical compounds in plasma samples. *Bioanalysis*, 6:2421–2439.
- [43] Gilar, M., Olivova, P., Daly, A.E., Gebler, J.C. (2005). Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. *Anal Chem.*, 77:6426–34.
- [44] Zhou, Y., Zhang, H., Wang, X., et al. (2019). Development of a heart-cutting supercritical fluid chromatography-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the determination of four tobacco-specific nitrosamines in mainstream smoke. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411:2961–2969.
- [45] Lisko, J.G., Stanfill, S.B., et al. (2013). Application of GC-MS/MS for the analysis of tobacco alkaloids in cigarette filler and various tobacco species. *Analytical Chemistry*, 85:3380–3384.
- [46] Xu, N., Goodrich, L.E., Lehnert, N., et al. (2010). Five- and Six- Coordinate Adducts of Nitrosamines with Ferric Porphyrins: Structural Models for the Type II Interactions of Nitrosamines with Ferric Cytochrome P450. *Inorganic Chemistry*, 49(10):4405-4419.
- [47] Su, X., Bromberg, L., Tan, K.J., Jamison, T.F., et al. (2017). Electrochemically Mediated Reduction of Nitrosamines by Hemin-Functionalized Redox Electrodes. *Environmental Science and Technology Letters*, 4: 161-167.
- [48] Su, X., Bromberg, L., Tan, K.J., Jamison, T.F., et al. (2017). Electrochemically Mediated Reduction of Nitrosamines by Hemin-Functionalized Redox Electrodes. Supporting Information
- [49] Zhao, H., He, H., Shi, L., Cai, X., et al. (2018). Electrochemical detection of 4- (methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone using a cytochrome P450 2E1 decorated biosensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 816: 62-67.