



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**GLİPİZİD VE PRAVASTATİN MOLEKÜLLERİNİN DUYARLI
ANALİZLERİ İÇİN MİKROEKSTRAKSİYON SONRASI
KROMATOĞRAFİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

Ümmügülsüm POLAT

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. İ. Murat PALABIYIK**

**ANKARA
2024**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİPİZİD VE PRAVASTATİN MOLEKÜLLERİNİN DUYARLI
ANALİZLERİ İÇİN MİKROEKSTRAKSİYON SONRASI
KROMATOĞRAFİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Ümmügülsüm POLAT

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. İ. Murat PALABİYİK

ANKARA

2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Glipizid ve Pravastatin Moleküllerinin Duyarlı Analizleri için Mikroekstraksiyon Sonrası Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:Ümmügülsüm POLAT

Tarih:05.07.2024

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalında
Ümmügülsüm POLAT tarafından hazırlanan
“Glipizid ve Pravastatin Moleküllerinin Duyarlı Analizleri için Mikroekstraksiyon Sonrası
Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi” adlı
tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:05.07.2024

Prof.Dr.Nilay BERELİ
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof.Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Raportör

Prof.Dr. Halil İbrahim ULUSOY
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi
Üye

Prof.Dr. Sibel Ayşıl ÖZKAN
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof.Dr. İsmail Murat PALABIYIK
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Glipizid ve Pravastatin Moleküllerinin Duyarlı Analizleri için Mikroekstraksiyon Sonrası Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi

Bu çalışmada Tip 2 diyabet hastalığı tedavisinde kullanılan ikinci nesil sülfonilüre grubuna ait olan Glipizid (GLP) ve hipertansiyon ve hiperlipidemi tedavilerinde kullanılan bir HMG-CoA redüktaz inhibitörü olan Pravastatin Sodyum (PST) ilaç molekülleri için manyetik katı faz ekstraksiyonu (MKFE) ile fabrik faz ekstraksiyonuna (FFE) dayanan ayırma ve zenginleştirme yöntemi uygulanması sonrasında fotodiyot dizi dedektör bulunan bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) cihazı kullanılarak aynı zamanlı analizine dayanan yeni bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Öncelikle manyetik katı faz ekstraksiyonu (MKFE) için optimizasyon çalışmalarını içeren denemeler sonucunda Fe_3O_4 @-Melanin içeren yeni bir manyetik katı destek maddesi ilk kez bu çalışma için sentezlenmiş ve FTIR, XRD, SEM ve Raman yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Tez çalışması kapsamında geliştirilen ikinci ekstraksiyon yöntemi için Sol-gel Ti-PTHF fabrik faz denemeleri kumaş adsorban madde bu tez çalışması kapsamında temin edilip fabrik faz katı ekstraksiyonu (FFE) için kullanılmıştır. GLP ve PST'nin yapay idrar, yapay tükürük ve ilaç örneklerinden ekstraksiyonu için geliştirilen her iki yöntem için pH, desorpsiyon çözgeni seçimi, adsorpsiyon süresi ve desorpsiyon süresi gibi deneysel değişkenler adım adım incelenmiş ve optimize edilmiştir. Tez çalışmasında GLP ve PST ilaç etkin maddelerinin YPSK cihazında aynı anda analizleri geliştirilen analitik yöntemde mobil faz olarak Asetonitril : KH_2PO_4 (pH: 3, 0.02 M) (55:45) karışımı kullanılmış ve akış hızı 1.0 mL dk^{-1} olarak belirlenmiştir. Analitik ölçümler için dalga boyları PST için 238 nm ve GLP için 226 nm olarak belirlenmiştir. Önerilen yöntemin Gözlenebilirlik sınırı (GS) 3.03 ng mL^{-1} , tayin sınırı (TS), 9.09 ng mL^{-1} çalışma aralığı $20-100 \text{ ng mL}^{-1}$ ekstraksiyon yöntemlerini uygulamadan önce ve sonra şeklinde karşılaştırmalı tablolar halinde sunulmuştur. Geri kazanım değerleri hesaplanmıştır hedef molekül analizinde % BSS değerleri % 6,1' in altındadır. Geliştirilen analitik yöntem, MKFE ve FFE ekstraksiyonundan sonra GLP ve PST'nin tayini için sentetik idrar ve sentetik tükürük çözeltilerine başarıyla uygulanmış ve geri kazanım değerleri her iki molekül için de % 98,5-103,3 aralığında hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Fabrik faz ekstraksiyonu, Glipizid, Manyetik katı faz ekstraksiyonu , Pravastatin Sodyum

SUMMARY

Development of a Chromatographic Method for Sensitive Analysis of Glipizide and Pravastatin Molecules After Microextraction

In this study, Glipizide (GLP), which belongs to the second generation sulfonylurea group used in the treatment of Type 2 diabetes, and an HMG- A new analytical method has been developed for the separation and enrichment of the drug molecules of Pravastatin Sodium (PST), a CoA reductase inhibitor, based on magnetic solid phase extraction (MSPE) and fabric phase solid extraction (FPSE) followed by simultaneous analysis using a high performance liquid chromatography (HPLC-FDA) device with photodiode array detector. A new magnetic solid support material containing Fe₃O₄@-Melanin was synthesised for the first time for this study and characterised by FTIR, XRD, SEM and Raman methods as a result of experiments including optimisation studies for magnetic solid phase extraction (MSPE). For the second extraction method developed within the scope of this thesis, a sol-gel Ti-PTHF fabric phase adsorbent was obtained and used for the fabric phase solid extraction (FPSE). Experimental variables such as pH, desorption solvent selection, adsorption time and desorption time were examined and optimised step by step for both methods developed for the extraction of GLP and PST from artificial urine, artificial saliva and drug samples. In the analytical method developed for the simultaneous analyses of GLP and PST active pharmaceutical ingredients in the HPLC device a mixture of Acetonitrile : KH₂PO₄ (pH: 3, 0.02 M) (55:45) was used as the mobile phase and the flow rate was determined as 1.0 mL min⁻¹. The wavelengths for analytical measurements were determined as 238 nm for PST and 226 nm for GLP. The limits of detection (LOD) of the proposed method were 3.03 ng mL⁻¹ the limit of determination (LOQ) was 9.09 ng mL⁻¹ and the operating range was 20-100 ng mL⁻¹ before and after the extraction methods were applied. Recovery values were calculated and % RSD values were below 6.1% in target molecule analysis. The developed analytical method was successfully applied to synthetic urine and synthetic saliva solutions for the determination of GLP and PST after MSFE and FFE extraction and the recovery values were calculated in the range of 98.5-103.3 % for both molecules.

Keywords: Fabric phase extraction, Glipizide, Magnetic solid phase extraction, Pravastatin Sodium

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Glipizid ve Pravastatin Sodyum ile İlgili Genel Bilgiler	2
1.1.1. Diyabet Hastalığı	2
1.1.2. Oral Antidiyabetik İlaçlar (OAD)	3
1.1.3. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Oral Sülfonilüre Glipizid	4
1.1.3.1. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Glipizidin Fizikokimyasal Özellikleri	5
1.1.3.2. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Glipizidin Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri	6
1.1.3.3. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Glipizid İçin Literatür Çalışmaları	7
1.1.4. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Statin Grubu Pravastatin Sodyum	9
1.1.4.1. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Pravastatin Sodyumun Etki Mekanizması	10
1.1.4.2. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Pravastatin Sodyumun Fizikokimyasal Özellikleri	11
1.1.4.3. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Pravastatin Sodyum İçin Literatür Çalışmaları	13
1.1.4.4. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Pravastatin Sodyumun Tedavide Uygulanışı	17
1.2. Ekstraksiyon ve Zenginleştirme Yöntemleri	17
1.2.1. Katı Faz Ekstraksiyonu (KFE)	18
1.2.2. Katı Faz Mikroekstraksiyonu (KFME)	19
1.2.3. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu (MKFE)	22
1.2.4. Fabrik Faz Katı Ekstraksiyonu (FFE)	23
1.3. Kromatografik Ayırma Yöntemleri	27
1.3.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	28
1.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	29
1.3.2.1. YPSK Yapısı ve Kısımları	30
2. GEREÇ ve YÖNTEM	36
2.1. Kullanılan Çözeltiler ve Cihazlar	36
2.1.1. Hazırlanan Çözeltiler	36
2.1.2. YPSK Cihazı İçin Kullanılan Çözeltiler	36
2.1.3. Manyetik ve Fabrik Faz Sentezinde Kullanılan Reaktifler	36
2.1.4. Kullanılan Cihazlar	37
2.2. Glipizid ve Pravastatin Sodyum Çözeltileri İçin Doğrudan YPSK Tayin Yöntemi Geliştirilmesi	38
2.3. Geliştirilen Yöntemin Sistem Uygunluk Testi (SUT)	38
2.3.1. Teorik tabaka sayısı (N)	38

2.3.2.Kapasite faktörü (k)	39
2.3.3.Kolon ayırma gücü (R_s)	39
2.3.1.4. Asimetri faktörü (A_s)	39
2.4. Geliştirilen YPSK Metodunun Validasyonu	39
2.4.1. Özgünlük	40
2.4.2. Doğrusal Aralık	40
2.4.3. Gözlenebilme ve Tayin Sınırı (GS ve TS)	40
2.4.4. Doğruluk	41
2.4.5. Kesinlik	42
2.4.6. Sağlamlık	42
2.5. Manyetik Katı Faz Destek Maddesinin Sentezi	42
2.5.1. Manyetik Katı Faz Destek Maddesinin Karakterizasyonu	44
2.5.2. MKFE Yönteminin Prosedürü	44
2.5.3. MKFE Yönteminin Optimizasyonu	47
2.5.3.1. pH Etkisinin İncelenmesi	47
2.5.3.2. Desorpsiyon Çözücüsü Seçimi	47
2.5.3.3. Desorpsiyon Çözücüsü Hacmi Belirlenmesi	47
2.5.3.4. Adsorpsiyon (Çalkama) Süresinin Belirlenmesi	48
2.5.3.5. Desorpsiyon Süresinin Belirlenmesi	48
2.5.4. Manyetik Katı Fazın Yeniden Kullanılabilirlik ve Çözgenlerin Desorplanma (Sıyırma) Veriminin İncelenmesi	48
2.6. Fabrik Faz Destek Maddesinin Hazırlanması	49
2.6.1. Hazırlanan Fabrik Faz Destek Maddesinin Karakterizasyonu	50
2.6.2. Geliştirilen FFE Yönteminin Temel Basamakları	50
2.6.2.1. Fabrik Faz Yıkama Adımı	50
2.6.3. FFE Yönteminin Optimizasyonu	52
2.7. Yöntemlerin Uygulamaları İçin Model Çözeltilerin Hazırlanması ve Uygulanması	52
2.7.1. Sentetik İdrar Çözeltisi	52
2.7.2 Sentetik Tükürük Örneklerinin Hazırlanması	53
2.7.3. İlaç Örneklerinin Hazırlanması	53
2.8. Geliştirilen Yöntemlerin Analitik Performans Ölçütleri, Validasyon Parametreleri	53
3. BULGULAR	54
3.1. Glipizid ve Pravastatin Sodyum İçin Doğrudan Tayin Yöntemi Geliştirilmesi	54
3.2. Geliştirilen Yöntemin Sistem Uygunluk Testi (SUT)	57
3.3. Geliştirilen YPSK Metodunun Validasyon Parametreleri	57
3.3.1. Özgünlük Çalışması	58
3.3.2. Doğrusallık Çalışması	60
3.3.3. Gözlenebilme ve Tayin Sınırı (GS ve TS) Çalışması	61
3.3.5. Kesinlik	62
3.3.6. Sağlamlık	63
3.3.6.1. Enjeksiyon Hacmi	63
3.3.6.2. Kolon Sıcaklığı	64
3.3.6.3. Mobil Faz Oranı	65
3.4. MKFE Yönteminde Elde Edilen Bulgular	66
3.4.1. Kullanılan Manyetik Katı Fazın Karakterizasyonu	66
3.4.1.1. FTIR Karakterizasyonu	66
3.4.1.2.XRD Yöntemi	67
3.4.1.3. TEM Görüntüleri	68

3.4.1.4.Raman Spektrumu	70
3.4.2. MKFE Yönteminin Optimizasyonu	69
3.4.2.1 pH'ın MKFE Yöntemine Etkisi	69
3.4.2.2. Çözücü Seçiminin MKFE Yöntemine Etkisi	70
3.4.2.3 Çözücü Hacminin MKFE Yöntemine Etkisi	71
3.4.2.4 Adsorpsiyon Süresinin MKFE Yöntemi Üzerine Etkisi	72
3.4.2.5. Desorpsiyon Süresinin MKFE Yöntemi Üzerine Etkisi	73
3.4.2.6. Desorpsiyon Çözgeni ile Katı Faz Yüzeyinden Sıyırma Deneyi	74
3.4.3. Geliştirilen MKFE Yönteminin Gerçek Örnek Çözeltilerine Uygulanması	75
3.4.4. Geliştirilen MKFE Yöntemin Analitik Performans Ölçütleri, Validasyon Parametreleri	76
3.5. FFE Yönteminden Elde Edilen Bulgular	77
3.5.1. Kullanılan Fabrik Faz Katı Maddesinin Karakterizasyonu	78
3.5.1.1.Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM)	78
3.5.1.2. Fourier Dönüşümü-Kızılötesi Spektroskopisi(FTIR)	79
3.5.2. FFE Yönteminin Optimizasyonu	80
3.5.2.1. Çalışma Ortamı Ph'ının FFE Yöntemi Üzerine Etkisi	80
3.5.2.2. Desorpsiyon Çözücüsünün FFE Yöntemine Etkisi	81
3.5.2.3. Çözücü Hacminin FFE Yöntemi Üzerine Etkisi	82
3.5.2.4. Adsorpsiyon Süresinin FFE Yöntemi Üzerine Etkisi	82
3.5.2.5. Desorpsiyon Süresinin FFE Yöntemi Üzerine Etkisi	83
3.5.3. Geliştirilen FFE Yönteminin Gerçek Örnek Uygulaması	84
3.5.4. Geliştirilen FFE Yöntemin Analitik Performans Ölçütleri, Validasyon Parametreleri	85
4. TARTIŞMA	87
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	95
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	Hata!
Yer işareti tanımlanmamış.	

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Glipizid ve Pravastatin Sodyum için manyetik katı faz ve fabrik katı faz olmak üzere iki farklı ekstraksiyon yöntemi uygulamasıyla zenginleştirme adımından sonra hedef analitlerin aynı anda HPLC ile kromatografik analizi için yöntem geliştirilmesini esas alır. Gerçek numune olarak sentetik tükürük, sentetik idrar ve ilaç numuneleri kullanılır ve optimizasyon çalışmaları yapılır.

Doktora ve lisans eğitimim boyunca her daim beni destekleyen, en iyisini yapacağıma inanan ve özveriyle yetiştirmemi sağlayan, anlayış ve hoşgörü gösteren Kıymetli danışman hocam Prof.Dr.İ.Murat PALABIYIK'a,

Doktora eğitimim ve akademik hayatım boyunca her konuda bana rehberlik edip, bilgi ve donanımımı artırmamı sağlayan Kıymetli hocam Prof.Dr.Halil İbrahim ULUSOY' a yoluma ışık tuttukları için teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamda katı fazların karakterizasyon çalışmalarını yapan Sayın Doç.Dr.Erkan YILMAZ, Gökhan SARP hocalarıma ve Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya ABD ve tez çalışmamda kullanmak üzere fabrik fazları temin etmemi sağlayan sayın Prof.Dr.Abuzar KABİR'e,

Doktora ve lisans eğitimim boyunca bana katkıda bulunan mezunu olmaktan gurur duyduğum Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne ve doktora tezimin laboratuvar çalışmalarında imkân sağlayan ve her zaman destek olan Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne,

Doktora tezimde bana yol arkadaşlığı yapan kıymetli Esra Durgun ve Aslıhan Gürbüz'e, beni sevgileriyle kuşatan ve motive eden tüm dostlarıma,

Doktora eğitimim ve tez yazım sürecim boyunca üzerimdeki yükleri almaya çalışan her düştüğümde kaldıran, bana güvenen Sevgili Eşime,

Mücadele dolu bir yıl geçirmemize rağmen birlikte güçlendiğimiz Canım aileme çok teşekkür ediyorum.

Ümmügülsüm POLAT

TEMMUZ 2024

ANKARA

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACN	Asetonitril
BSS	Bağıl Standart Sapma
DM	Diabetes Mellitus
EtOH	Etanol
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FFE	Fabrik faz katı ekstraksiyonu
FTIR	Fourier Dönüşümü-Infrared Spektroskopisi
GC	Gaz Kromatografisi
GLP	Glipizid
GS	Gözlenebilme sınırı
HDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A
İPA	İsopropilalkol
KFE	Katı Faz Ekstraksiyonu
LC	Sıvı Kromatografisi
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LLE	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu
M	Molarite
MeOH	Metanol
MKFE	Manyetik katı faz ekstraksiyonu
mL	Mililitre
MS	Kütle Spektrofotometrisi
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OAD	Oral Antidiyabetik İlaçlar
PST	Pravastatin Sodyum
PTHF	Politetrahidrofuran
TEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEOS	Tetra etil orto silikat
TS	Tayin sınırı
XRD	X-Işını Kırınımı Analizi
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. Glipizidin molekül yapısı	5
Şekil 1. 2. Kolesterol Biyosentezinin Statinler Tarafından İnhibe Edilen Basamağı.	11
Şekil 1. 3. Statinlerin kimyasal yapıları	12
Şekil 1. 4. Pravastatin Sodyum molekül yapısı	13
Şekil 1. 5. Katı faz ekstraksiyon adımları	19
Şekil 1. 6. Çeşitli matris ortamlarından farklı analitlerin ekstraksiyonu için KFME uygulamalarının şematik gösterimi	20
Şekil 1. 7. Manuel KFME prosedürlerinin gerçekleştirilmesine yönelik ticari olarak temin edilebilen fiber SPME cihazının grafiksel gösterimi. Manuel fiber tutucu (a) . 1 veya 2 cm uzunluğunda polimerik kaplamayla kaplanmış iğnenin içinde yerleşik fiber bulunan fiber düzeneği (b)	21
Şekil 1. 8. KFME sürecinin çizimi	21
Şekil 1. 9. Manyetik katı faz ekstraksiyonunun temel adımları	22
Şekil 1. 10. FFE yöntemi şematik gösterimi	23
Şekil 1. 11. Fabrik faz katı maddesinin hazırlanma adımları	24
Şekil 1. 12. Selüloz substratın kimyasal yapısı	25
Şekil 1. 13. Selüloz kumaş yüzeyinde yüzeye yapıştırılmış sol-jel PEG kaplamanın şematik gösterimi	28
Şekil 1. 14. Sabit fazın türüne göre kromatografinin sınıflandırılması	31
Şekil 1. 15. HPLC cihazı kısımları	43
Şekil 2. 1. Manyetik katı faz sentez prosedürü	44
Şekil 2.2. MKFE yönteminin genel prosedürü	46
Şekil 2. 3. Manyetik katı faz ekstraksiyonu deney basamakları	49
Şekil 2. 4. Fabrik fazın görüntüleri	50
Şekil 2. 5. Fabrik faz yıkama adımı	51
Şekil 2. 6. Fabrik faz ekstraksiyon adımları	54
Şekil 3.1. GLP molekülüne ait DAD dedektörden elde edilen spektrum	55
Şekil 3. 2. Literatürden elde edilen GLP molekülüne ait spektrum	55
Şekil 3.3. PST molekülüne ait DAD dedektörden elde edilen spektrum	55
Şekil 3. 4. PST molekülüne ait literatürden alınan spektrum....	55
Şekil 3. 5. GLP ve PST moleküllerine ait ideal koşullarda elde edilen aynı anda tayin kromatogramı	57
Şekil 3. 6. Boş mobil faz çözeltisine ait kromatogram	58
Şekil 3. 7. 20 ppm Gliklazid çözeltisine molekülüne ait kromatogram	58
Şekil 3. 8. 20 ppm Glimeprid molekülüne ait kromatogram	59
Şekil 3.9. 20 ppm Metformin HCl standart çözeltisine ait kromatogram	59
Şekil 3. 10. Hedef analitler ile diğer antidiyabetiklerin birlikte olduğu kromatogram	59
Şekil 3.11. Metformin HCl standart çözeltisine ait spektrum	60
Şekil 3.12. Glipizid için YPSK-DAD ile doğrudan tayin kalibrasyon grafiği	60
Şekil 3. 13. Pravastatin Sodyum için YPSK-DAD ile doğrudan tayin kalibrasyon grafiği	61
Şekil 3.14. Enjeksiyon hacmi validasyon çalışması sonucu elde edilen kromatogram	64
Şekil 3.15. Kolon sıcaklığı validasyon çalışması sonucu elde edilen kromatogram	65
Şekil 3.16. Mobil faz için yapılan validasyon çalışması sonucu elde edilen kromatogram	65

Şekil 3. 17. Fe ₃ O ₄ @TEOS-Melanin manyetik partiküllerinin FTIR Spektrumu	67
Şekil 3.18. Fe ₃ O ₄ @TEOS-Melanin manyetik partiküllerinin XRD Spektrumu	68
Şekil 3.19. Fe ₃ O ₄ (a,b,c) ve Fe ₃ O ₄ @TEOS-Melanin ,MNT-2(d,e,f) nanomalzemelerinin Fe-SEM görüntüleri. (a,d: 1k, b,e:30k ve c,f:100k büyütme oranları)	68
Şekil 3.20. Fe ₃ O ₄ @TEOS-Melanin manyetik partiküllerinin Raman Spektrumları	69
Şekil 3.21. Önerilen yönteme pH'ın etkisi	70
Şekil 3.22. Önerilen yönteme çözücü etkisi	71
Şekil 3.23. Önerilen yönteme çözücü hacminin etkisi	72
Şekil 3.24. Önerilen yöntem için uygun adsorpsiyon süresi	73
Şekil 3.25. Önerilen yöntem için uygun desorpsiyon süresi	73
Şekil 3.26. MKFE işleminde desorpsiyon miktarı grafiği	74
Şekil 3.27. Optimum koşullar altında MKFE sonrası elde edilen kalibrasyon doğruları	76
Şekil 3.28. Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) görüntüleri. (a) 100x büyütmede bozulmamış, kaplanmamış %100 selüloz pamuklu kumaşın TEM görüntüleri; (b) 100x büyütmede sol-jel Ti-PTHF kaplı FFE membranı; (c) 500x büyütmede sol-jel Ti-PTHF kaplı FFE membranı; (d) 1.000x büyütmede sol-jel Ti-PTHF kaplı FFE membranı.	78
Şekil 3.29. (a) Metil trimetoksisilan; (b) Titanyum izopropoksit; (c) bozulmamış poli(tetrahidrofuran) polimer; (d) sol-jel Ti-PTHF kaplı FFE membranının FT-IR spektrumları.	79
Şekil 3.30. Önerilen yöntemde ortamın pH etkisi	81
Şekil 3.31. Önerilen yöntemde desorpsiyon çözücüsü etkisi	81
Şekil 3. 32. Önerilen yöntemde çözücü hacmi etkisi	82
Şekil 3.33. Önerilen yöntemde adsorpsiyon süresi etkisi	83
Şekil 3. 34. Önerilen yöntemde desorpsiyon süresi etkisi	83
Şekil 3.35. Optimum koşullar altında FFE sonrası elde edilen kalibrasyon doğruları	85

ÇİZELGELER

Çizelge 1. 1. OAD sınıflandırılması	3
Çizelge 1. 2. Glipizid molekülü fizikokimyasal özellikleri	6
Çizelge 1. 3. PST molekülünün fizikokimyasal özellikleri	13
Çizelge 1. 4. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırması	29
Çizelge 3. 1. YPSK çalışma koşulları	56
Çizelge 3.2. Kalibrasyon parametreleri	56
Çizelge 3. 3. Sistem uygunluk parametreleri	57
Çizelge 3. 4. Önerilen yöntemler için bulunan GS ve TS değerleri	61
Çizelge 3. 5. Kesinlik parametresi için % BSS değerleri	62
Çizelge 3. 6. Enjeksiyon hacmine göre rezolüsyon ve kuyruklanma faktörleri sonuçları	63
Çizelge 3.7. Kolon sıcaklığı rezolüsyon ve kuyruklanma faktörü sonuçları	64
Çizelge 3.8. Mobil faz oranına göre rezolüsyon ve kuyruklanma faktörü sonuçları	65
Çizelge 3. 9. Desorpsiyon çözgeniyle desorpsiyon deneyi için alınan veriler	74
Çizelge 3. 10. Geliştirilen MKFE yöntemin gerçek örneklerle uygulanması sonrası elde edilen sonuçlar	75
Çizelge 3.11.Önerilen MKFE Yöntemin Analitik Parametreleri	76
Çizelge 3.12. Geliştirilen FFE yöntemi gerçek örnek uygulama sonrası elde edilen sonuçlar	84
Çizelge 3.13. Önerilen FFE yöntemin analitik parametreleri	86
Çizelge 4.1. İdeal optimizasyon parametrelerinin karşılaştırmalı sonuçları	88
Çizelge 4.2. Analitik performans parametreleri karşılaştırma tablosu	89
Çizelge 4.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri için uygulanan t ve F testi sonuçları	90
Çizelge 4. 4. Geliştirilen yöntemin literatürdeki yöntemlerle karşılaştırma sonuçları	91

1. GİRİŞ

Ortalama insan ömrünün uzamasıyla birlikte dünyada yaşlı nüfusunun artışıyla birlikte bireylerde gözlenen fiziksel ve zihinsel değişiklikler, onları kronik hastalıklara karşı daha duyarlı hale getirerek çoklu ilaç kullanımına yol açmaktadır. Ülkemizde yaşlı bireylerdeki kronik hastalık oranı dünyada bildirilen orana benzerdir. Yaşlı bireylerin %90'ında en az bir, %35'inde iki, %23'ünde üç ve %14'ünde en az dört ve üstü sayıda eşlik eden kronik hastalık olduğu bildirilmiştir. İlaç tedavisinin amacı mevcut hastalıkları tedavi etmek ve yaşam kalitesini yükseltmek olduğu için tıbbi açıdan gerekli görülen her ilaç kısıtlamaya gidilmeden tedavi planına dahil edilebilir (İşli, 2022). Yaşlı ve kronik hastalıklara sahip bireylerin çok sayıda reçeteli ilaç kullanımı gereksiz ilaç tüketimine de sebep olduğu için tedavi protokollerinin yakından izlenmesini gerekli kılmaktadır. Diyabetes mellitus (DM), halk arasında şeker hastalığı olarak bilinen ve uzun süre kontrol edilemezse çoklu organ hasarına sebep olan kronik metabolik bir hastalıktır. İki tipi bulunan bu rahatsızlıkta, Tip 1 DM insülin eksikliğine bağlı iken, Tip 2 DM ise obeziteyle beraber ikincil insülin direnci ile ilişkilidir. İnsülin, Tip 1 diyabette temel tedavi yöntemidir. Tip 2 diyabet ise diyet, oral antidiyabetik ilaçlar (OAD) ve insülin takviyesi ya da bu tedavi rejimlerinin bir arada kullanılmasıyla birlikte hareketli bir yaşam ile birlikte kontrol altında tutulabilir. Sülfonilüre grubu OAD'ler olan Glizid, Glimepid, Glibenklamid, Glipizid, Tip 2 DM'de çok sık kullanılan ilaçlardır (Thulé ve Umpierrez, 2014). Hiperlipidemi hastalığı ise serumda trigliserit ve kolesterol yüksekliği ile birlikte teşhis edilen kronik bir rahatsızlıktır. Genetik veya çevresel sebeplerden kaynaklanan hiperlipidemi, yüksek ölüm ve morbidite oranına sahiptir ve kardiyovasküler hastalıklarda risk faktörlerinin başında gelir. Bu kronik hastalığın tedavisinde lipid seviyelerinin denetimi, hiperlipidemiye bağlı metabolik bozuklukların tedavisi, hipertansiyon, diyabet ve obezite gibi sorunların engellenebilmesi önemlidir. Farmakolojik tedavi başlangıcında ilk basamak Statin grubu ilaç kullanımıdır. Statinler 1980'li yıllardan beri yapılan klinik çalışmalarda, HMG CoA redüktaz inhibitörü olarak düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol düzeylerinin düşürülmesi için kullanılır ve kardiyovasküler sistemdeki bozucu etkiler böylece önemli ölçüde engellenir. Bu grup tedavisi içerisinde atorvastatin, simvastatin, lovastatin, fluvastatin, pravastatin, pitavastatin ve rosuvastatin gibi ilaç etkin maddeleri yer almaktadır (Kocijan vd., 2005). Son yıllarda genç ve yetişkin nüfusta da artış gösteren diyabet ve hiperlipidemi grubunda yer alan obez ve yaşlı hastaların tedavilerinde kombine ilaç kullanımı sıklıkla görülmekte ve tedavinin takibi önem kazanmaktadır. Bu sebepten dolayı bu rahatsızlıklarda ilaç etkin maddelerinin biyolojik

matrislerde belirlenmesi ve klinik anlamda tayinleri için güvenilir ve doğrulanmış analitik yöntemlerin geliştirilmesi farmakokinetik çalışmalarda, terapötik aralığı dar olan ilaçların terapötik takibinde, jenerik ve benzer ürünlerin ruhsatlandırılmasına yönelik biyoeşdeğerlik testlerinde ve yeni dozaj formlarının geliştirilmesinde önemlidir (Fernandes vd., 2007). Bu analizler öncesinde, ilaç etkin maddelerinin bu matrislerden seçici olarak ekstraksiyonlarının gerçekleştirilmesi analizlerde seçiciliği artırmaktadır ve çalışma ortamından kaynaklanan girişimleri en aza indirmekte ya da tamamiyle ortadan kaldırmaktadır.

1.1. Glipizid ve Pravastatin Sodyum ile İlgili Genel Bilgiler

1.1.1. Diyabet Hastalığı

Diabetes mellitus (DM) denen diyabet hastalığı, insülin salgılanması veya insülin etkisinin az olmasıyla beraber karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasının bozulmasına neden olan bir kronik hastalıktır (Tuomilehto vd., 2016). İlaç ve diyetle tedavi edilen bu rahatsızlık hücrenin insülin direncine bağlı olarak ortaya çıkar. İki tür diyabet tipi bulunur. Tip 1 diyabet (T1D), çocuklarda ve ergenlerde diyabetin en sık görülen tipidir. T1D hastaları hayatta kalmak için insüline ihtiyaç duyar. Fakat hastanın kan şekerini kendi kendine izleyebilmesi, iyi bir diyabet eğitimi ve profesyonel sağlık ekipleri rehberliği ile hastalık kontrol altına alınabilir (Ogle vd., 2022). 20-79 yaş grubundaki kişiler arasında diyabet yayılımının 2021'de %10,5 (536,6 milyon kişi) olduğu ve bu rakamın 2045'te %12,2'ye (783,2 milyon) yükseleceği tahmin edilmektedir. 2021 ile 2045 yılları arasında diyabet prevalansında en büyük artışın, % 12.2 oranıyla yüksek gelirli ülkelerde gerçekleşmesi beklenirken bunu % 21.1 ile orta gelirli ülkeler ve % 11.9 ile düşük gelirli ülkelerin takip edeceği öngörülmektedir (Wang vd., 2022). Yetişkinlerde Tip 2 diyabet (T2D) bilinen tüm diyabet vakalarının yaklaşık %90-95'ini oluşturur. Tip 2 DM, β -hücre fonksiyonunun azalmasına bağlı olarak hiperglisemi ile karakterize edilir ve genellikle periferik dokularda insüline karşı duyarlılığın azaldığı kronik bir metabolik hastalıktır. Tedavi edilmezse veya hastalık iyi yönetilemezse, uzun süreli hiperglisemi, kardiyovasküler rahatsızlıklar, nefropati, nöropati ve retinopati gibi komplikasyonların riskinde artışa yol açabilir (He vd., 2015). Tip 2 diyabetik bir hasta dengeli beslenme ve yeterli fiziksel aktiviteye rağmen yeterli iyileşmeyi sağlayamıyorsa oral ilaç tedavisine geçilmeli.

1.1.2. Oral Antidiyabetik İlaçlar (OAD)

Tip 2 DM’de çoğu kez Oral Antidiyabetik İlaçlar (OAD) ile monoterapi başlanır. T2DM’de kullanılan ilaçlar pankreastan insülin salgılanmasını artırıcı yönde etki edenler (insülin sekretogogları), karaciğer ve periferde insülin duyarlılığını düzenleyenler ve bağırsaktan glukoz emiliminde azaltıcı etki yapanlar olarak etki mekanizmasına göre gruplandırılırlar. Oral antidiyabetik ilaç sınıflandırması Tablo 1 ‘de verilmiştir (Salmanoğlu, 2020).

Çizelge 1. 1. OAD sınıflandırılması (Salmanoğlu, 2020)

1. İnsülin Salgılatıcı İlaçlar (Segretagoglar)	Sülfonilüre (Gliklazid, Glimepid, Glibenklamid, Glipizid) Glinidler (Nateglinid ,repaglinid)
2. İnsülin duyarlılığını artıran ilaçlar (Sensitizer)	Biguanidler (Metformin) Tiazolidindionlar (Pioglitazon)
3. Glikoz emilimini yavaşlatanlar	Alfa glukozidaz inhibitörleri (Akarboz) DPP-4 İnhibitörleri (Sitagliptin)
4. Amilin analogları	(Pramlintid)
5. İncretin temelli tedaviler	GLP1 Analogları (Eksenatid)
6. Sodyum glukoz ko-transporter 2 inhibitörleri (SGLT2-i)	Dapagliflozin, Kanagliflozin Empagliflozin

1.1.3. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Oral Sülfonilüre Glipizid

Sülfonilüre grubu ilaçlar, 1942 yılında ortaya çıkan ve 1960'dan bu yana sıklıkla kullanılan en eski oral antidiyabetik sınıftır ve insülin salınımını arttırarak antidiyabetik etkilerini gösterirler. Bu grupta yer alan ilaç etkin maddeleri pankreatik beta hücreleri tarafından insülin salgılanmasını uyarır ve hepatik insülin klirensini azaltır; bu nedenle etkinlikleri çalışan beta hücrelerine bağlıdır (Vaughan vd., 2020). Sülfonilüre grubu ilaç etkin maddeleri iki ana gruba ayrılır.

Birinci kuşak sülfonilüreler;

- Tolbutamid,
- Klorpropamid,
- Tolazamid

İkinci kuşak sülfonilüreler;

- Glibenklamid,
- Glipizid,
- Gliburid,
- Gliklazit,
- Glimepirid.

Son yıllarda, sülfonilürelerin yavaş salınımlı olan formları da çıkmıştır ve günde 1 kez alınması yeterli olur. Bu formlara;

Glipizid (Glucotrol XL; 5 ve 10 mg formu vardır),

Gliklazid (Diamicron MR; 30 ve 60 mg),

Glimepirid (Amaryl; 1- 4 mg) örnek olarak verilebilir (Çubuk & İnce, 2014).

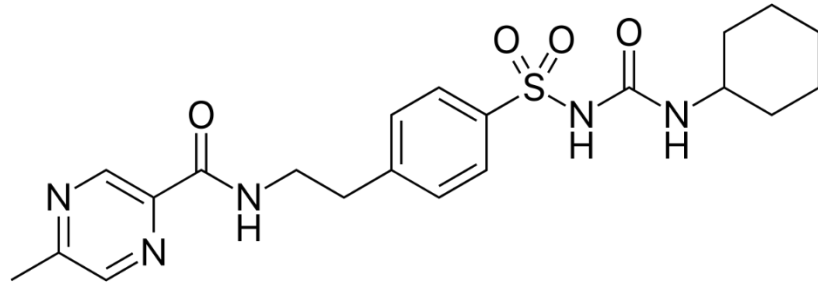
Glipizid ve glimepirid metabolitleri renal olarak atılsa da, gliburide göre daha az hipoglisemik aktivite gösterirler ve bu nedenle böbrek yetmezliği olan hastalarda daha sık kullanılırlar. Bununla birlikte, sülfonilüreler genellikle iyi tolere edilir ve tedavi sonrası artan kanıtlar yan etkilerin ilaca göre değiştiğini ve sınıfa genellenmemesi gerektiğini göstermiştir (Abrahamson, 2015; Douros vd., 2018). Sadece gliburid veya birinci nesil bir ilacı değerlendiren birkaç çalışma, yan etkileri tüm sülfonilüre sınıfına atfetmiştir (Abrahamson, 2015; V. Cheng & Kashyap, 2011).

Farklı sülfonilüre grubu etken maddeler arasında birtakım farklar bulunmaktadır. Plazmadaki insülin düzeyi artışının kan şekerini düşürme aktivitesine oranı şu şekildedir glimepirid < glipizid < gliklazid < glibenklamid şeklindedir. Glibenklamid için günde tek doz yeterli gelir. Fakat glipizid günde iki kez verilir. Glibenklamid bazal insülin salınımını glipizide göre daha fazla arttırmaktadır ve bu nedenle hipoglisemi riski glipizide göre daha fazladır (Rendell, 2004).

Sülfonilürelerin en önemli yan etkileri hipoglisemi ve kilo artışı olarak bilinmektedir. İnsülin salınımı üzerindeki etkileri plazma glukoz düzeyinden bağımsız olduğu için, hipoglisemi riski tüm sülfonilürelerde görülür (A. Y. Cheng & Fantus, 2005). Sülfonilüre grupları plazma albüminine yüksek oranda bağlanırlar bu yüzden aspirin, alkol, anabolik steroidler, kloramfenikol gibi ilaçlarla da etkileşir ve bu durumda hipoglisemik etki artabilir (Brien vd., 2000).

1.1.3.1. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Glipizidin Fizikokimyasal Özellikleri

Glipizid Şekil 1.3' de gösterilen molekül yapısına göre benzensülfonamidler olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Bunlar, bir benzen halkasına S-bağlı bir sülfonamid grubu içeren bileşiklerdir. Görünümü ise beyaz veya beyaz dışı kristal toz yapıdadır.



Şekil 1. 1. Glipizidin molekül yapısı

Çizelge 1. 2.Glipizid molekülü fizikokimyasal özellikleri (National Center for Biotechnology Information, 2018)

IUPAC Adı	: N-[2-(4-[(sikloheksilkarbamoyl)amino]sülfonil} fenil)etil]-5-metilpirazin-2-karboksamid
Moleküler formül	: C ₂₁ H ₂₇ N ₅ O ₄ S
Moleküler ağırlık	: 445,5 gr/mol
pKa	: 4.32
Erime noktası	: 208 - 209°C
Suda çözünürlüğü	: 0,016 gr/L

1.1.3.2. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Glipizidin Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri

Glipizid (GLP) etken maddesi tip 2 diyabetli yetişkinlerin tedavisi için FDA onaylı ikinci nesil bir sülfonilüredir. GLP kan glukozunu düşürücü bir ajandır. Kan glukozunu düşürücü etkinin ilk başlangıcı, uygulamadan yaklaşık 30 dakika sonra ortaya çıkar ve etki süresi yaklaşık 12 ila 24 saat sürer. Glipizid tarafından uyarılan insülin salınımının yemeğe cevap olarak ortaya çıkması önemlidir. Uzun süreli glipizid tedavisinden sonra bile açlık insülin düzeyleri artmamıştır. Fakat yemekten sonra tokluk insülin cevabı en az 6 aylık tedavi süresince artmaktadır. Glipizidin metabolizması esas olarak karaciğerde meydana gelir. Glipizidin ana tedavi edici etkileri öncelikle insülin salınımının uyarıldığı pankreasta meydana gelir. Bunun yanında, kaslar, yağ ve karaciğer hücreleri üzerinde insülin sinyal etkilerinin desteklenmesi gibi etkilere de aracılık eder. Endojen hücreler üzerindeki etkisi nedeniyle, glipizid dahil sülfonilüreler, ilacı alan hastalarda hipoglisemi ve kilo alma riski ile ilişkilidir. Glipizid iskelet kaslarına glukoz alımını artırabilir ve karaciğerde insülin etkisini güçlendirebilir. Diğer etkileri arasında karaciğer ve yağ dokusundaki lipoliz ve hepatik glukoz çıkışının inhibe edilmesi ve glukoz alımının ve oksidasyonunun artması yer alır (National Center for Biotechnology Information, 2018). Glipizid diyet ve egzersize yardımcı olarak kullanılır. Diyet, egzersiz ve ilaç uyumuna rağmen 3 ayda yeterli metabolik kontrol sağlanamayan hastalarda HbA1c hedefine ulaşmak için metformin ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Tip 2 diyabetin kontrolünde düşük maliyeti, bulunabilirliği ve etkinliği göz önüne alındığında, glipizid ve diğer sülfonilüreler doktorlar için yaygın seçeneklerdir. İkinci nesil sülfonilürelerin, birinci nesil ajanlarla karşılaştırıldığında ağırlıkça daha etkili olduğu düşünülmektedir. En önemli yan etkisi böbrek ve karaciğer bozukluklarında vücutta birikip

uzun süren hipoglisemilere neden olmasıdır. Bu yan etkiler genellikle iyi tolere edilir. Bu yüzden glipizidin biyolojik numunelerde izlenmesi önemlidir.

1.1.3.3. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Glipizid İçin Literatür Çalışmaları

Mevcut literatürde Lakshmi ve Rajesh (2011) tarafından farmasötik dozaj formlarında ve insan plazmasında glipizid, rosiglitazon, pioglitazon, glibenklamid ve glimepiridin eşzamanlı tayini için basit YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Formülasyon karışımları uygun dilüsyonlarda hazırlanmış ve plazma örnekleri asetonitril ile ekstraksiyon yoluyla hazırlanmıştır. Yöntemde GS değeri her ilaç için $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'den daha düşük bir konsantrasyonda tespit etmiştir. Gün içi ve günler arası çalışmalar için %RSD, seçilen tüm konsantrasyonlar için 4,34'ten daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, yöntem ICH'e göre doğrulanmış ve sonuçların kabul edilebilir aralıkta olduğu görülmüştür. Bu nedenle önerilen yöntem ilaçların rutin kalite kontrolü için kullanılabilir ve farmakokinetik çalışmalara da uygulanabilir.

Nagulanha ve Vandavasi (2023) basit, güvenilir bir TF-YPSK farmasötik formülasyonlardaki glipizidin safsızlıklarını tayin etmek için ICH Q2 uyarınca geliştirilmiş ve doğrulamıştır. Geri kazanım değerleri ve regresyon değerleri sırasıyla %98,7-100,5 ve $R^2 > 0,9999$ idi. Geliştirilen yöntemin stabiliteyi gösteren özellikleri, zorunlu bozunma çalışmalarından değerlendirildi. Geliştirilen yöntem glipizid dozaj formunun gerçek zamanlı numune analizi için başarıyla uygulandı.

Shirode vd., (2022) Glipizid tayini için bir TF-YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Önerilen yöntem, BDS HYPERSIL C18 analitik kolon, mobil faz metanol:su 70:30 v/v, $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ akış hızı ve 222 nm tespit dalga boyu kullanılarak ilacın ters faz modunda ayrılmasına dayanmaktadır. GLP iyi bir şekilde çözülmüş ve $t = 3.86$ dakikada korunmuştur. Yöntem $1-7 \mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında doğrusal bulunmuştur. GLP için GS ve TS sırasıyla 0.5281 ve $1.761 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Valide edilen yöntem, şirket içi formülasyon ve pazarlanan formülasyonlardan GLP'nin kantitatif tayini için başarıyla kullanılmıştır.

Mantri ve Shanmukhappa (2009) tarafından basit, spesifik ve hassas bir yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Gradient pompa, ters faz C-18 analitik kolon, 225 nm'ye ayarlanmış değişken UV-Görünür dedektör ve bir integratörden oluşan bir YPSK sistemi kullanılmıştır. Mobil faz metanol ve %0,115 w/v amonyum dihidrojen fosfat

tamponundan oluşmuş ve ortam sıcaklığında 1ml/dak hızında pompalanmıştır Glipizidin saf ve farmasötik dozaj formlarında tayini yapılmıştır. Bu TF-YPSK yöntemi doğrusallığı, kesinliği ve doğruluğu açısından doğrulanmıştır. Kalibrasyon eğrisi 10 ila 70 µg/ml aralığında değerlerde doğrusaldır. Bu yöntem için örnek hazırlama metodu sunulmamıştır.

Pani vd., (2014) tarafından çalışmada tavşan plazmasında Glipizid'in tayini için yeni, basit ve hassas bir ters faz YPSK -PDA dedektörü kullanılarak yöntem geliştirmiş ve valide etmiştir. Geliştirilen yöntem, kontrollü salımlı yüzen mikrokürelerin oral uygulamasından sonra tavşanlarda GPZ'nin plazma ilaç konsantrasyonunu belirlemek için uygulanmıştır. Kalibrasyon eğrisi 25.38-2046.45 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olarak tespit edilmiştir. Mikrokürelerden pH 7.4'te çözünen ilaç fraksiyonu absorbe edilen ilaç fraksiyonuna karşı grafiğe geçirildiğinde, in vitro ve in vivo korelasyon çalışmasında doğrusal bir korelasyon (R^2 ----0.991) elde edilmiştir.

Li vd., (2013) iç standart (IS) olarak fenasetin kullanılarak insan plazmasında metformin ve glipizidi eş zamanlı olarak belirlemek için seçici, hassas ve hızlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (YPSK-MS/MS) yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Metanol ile 200 µL plazmanın tek aşamalı protein çöktürmesinden sonra metformin, glipizid ve IS, metanol-10 mmol/L amonyum asetat (75:25, v/v) oluşan izokratik bir mobil faz ile ayrılmıştır. Doğrusal kalibrasyon eğrileri metformin için 4,10-656 ng/mL ve glipizid için 2,55-408 ng/mL konsantrasyon aralıklarında elde edilmiştir. Gün içi ve günler arası hassasiyetin bağlı standart sapması %10'un altındaydı. Sunulan yöntemin oral uygulamadan sonra sağlıklı gönüllülerde metformin hidroklorür ve glipizid tabletlerin farmakokinetik çalışması için uygun olduğu kanıtlanmıştır.

Atif vd., (2013) yayımlanan bir çalışmalarında insan plazmasında Glipizid tayini için UV dedeksiyonlu basit, hassas ve seçici bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Plazma örneklerinden ilacı ekstrakte etmek için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Glipizid'in kromatografik ayrımı C18 kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz; glasiyal asetik asit ile pH 4.25'e ayarlanmış 0.01M potasyum dihidrojen fosfat ve asetonitrilden (65:35, v/v) oluşmuştur. Kalibrasyon eğrisi 50-1600 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldı. Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri %15'in altındaydı. TS değeri 50 ng/mL ve ortalama geri kazanım %98'in üzerindiydi. Bu yöntem, biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik çalışmaları için plazma örneklerindeki Glipizid konsantrasyonunu analiz etmek üzere uygulanabilir.

Bagadane ve Jadhav (2019) tarafından yapılan bu çalışmada ise Metformin hidroklorür ve Glipizid'in bulk ve farmasötik dozaj formunda eşzamanlı tahmini için basit, doğru, ekonomik ve hassas bir TF-YPSK yöntem geliştirilmiştir. Metformin hidroklorür ve Glipizid'in ayrılması, sabit faz olarak Cosmosil C 18 kolon, izokratik modda metanol ve sudan oluşan mobil faz (60:40, orto-fosforik asit ile pH 3 ayarlanmış) ve 226 nm'de UV tespiti ile 0,8 ml / dak akış hızı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki ilaç için de % RSD % 2'den az ve kuyruk faktörü 2'den az bulunmuştur. Metformin hidroklorür ve Glipizid için teorik plaka sayısı 2000'den fazla bulunmuştur ve tüm validasyon parametreleri kabul edilebilir aralıktadır. Bu çalışmada örnek hazırlanması için bir ekstraksiyon ve zenginleştirme yöntemi sunulmamıştır.

Rao ve Vijayalakshmi (2021) yayımlanan çalışmalarında RP-UPLC tekniği ile glipizid tayini için basit, hassas ve doğru bir yöntem geliştirilmiştir. Sistem uygunluk parametreleri standardın altı tekrarlı incelenmiş ve sonuçlar kabul kriterlerinin oldukça altında çıkmıştır. Doğrusallık %25 ila %150 seviyelerinde çalışılmış ve R^2 değeri 0,999 olarak bulunmuştur. GS ve 0.05 µg/ml ve TS ise 0.14 µg/ml'dir. Saflık eşiği kabul edilebilir aralıktaydı.

Tez kapsamında gerçekleştirilen literatür çalışmaları, insan serumunun yanı sıra plazma veya idrarda Glipizidin belirlenmesi için Gaz Kromatografisi (GC), Ters faz YPSK (RP-YPSK) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) gibi analitik yöntemlerin geliştirildiğini ortaya koymaktadır. GC yöntemi, termal olarak stabil bir ürün oluşturmak için türevlendirme işlemi gerektirir ve bu nedenle zaman alıcıdır. Bunun yanı sıra, yapısal olarak benzer sülfonilüreler aynı türevleri oluşturabileceğinden GC yöntemi özgünlükten yoksundur (Atif vd.,2013). Glipizid farmasötik ilaç ve biyoljik sıvıdan tayini için literatürde en çok kullanılan yöntem ise basit, hassas, hızlı ve güvenilir olduğu için YPSK'dır.

1.1.4. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Statin Grubu Pravastatin Sodyum

Pravastatin sodyum (PST), kolesterol biyosentezinde sınırlayıcı bir enzim olan 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz güçlü ve spesifik bir inhibitörüdür HMG-KoA redüktaz inhibitörlerine Statinler adı verilir (Miyazaki & Koga, 2002). Statinler, dünya çapında en yaygın olarak reçete edilen ilaç sınıfına aittir. 50 yaş üzeri hemen hemen her hastada kolesterol seviyelerini düşürmekten kardiyovasküler hastalıkları önlemeye kadar kullanımı genişletilmiştir (Davignon, 2004). İlacın başarısı esas olarak lipit düşürücü etkisinin ötesindedir statinler antiinflamatuvar ve antioksidan özellikler içerir ve damar fonksiyon

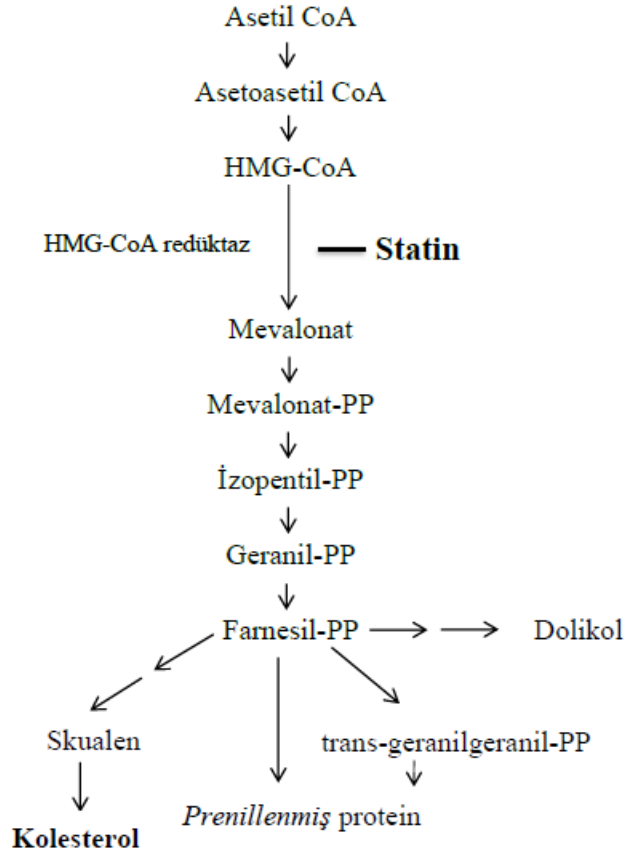
bozukluklarını azaltır (Treatment ve Ctt, 2012). İlk madde olan lovastatinin piyasaya sürülmesinden ve 1987’de FDA onayı almasından bu yana bir dizi HMG-CoA redüktaz inhibitörü klinik tedaviye dahil edilmiştir. Bu bileşikler hiperkolesterolemi tedavisinde ve kardiyovasküler hastalıkların mortalite ve morbiditesini azaltmada kullanılır. Birçok farmakokinetik çalışma yapılmıştır ve farklı HMG-CoA redüktaz inhibitörleri karşılaştırılmıştır. Statinler metabolizmalarına göre hidrofilik statinler ve lipofilik statinler olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Hidrofilik statinler; Pravastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve fluvastatindir.

Lipofilik statinler; Lovastatin, simvastatin ve atorvastatindir (Bergt vd., 2017). Statinler genelde iyi tolere edilebilen ilaçlardır. Pravastatin dekalin halkasına bağlı hidroksil grubu nedeniyle diğer HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinden daha yüksek bir hidrofilikliğe sahiptir ve en iyilerden biri olarak tanımlanır (Lennerniis ve Fager, 1997; Önal ve Sagirli, 2006). PST insanlarda LDL denilen düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol konsantrasyonunu azalttığı ve HDL olarak bilinen yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol konsantrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Miyazaki ve Koga, 2002).

1.1.4.1. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Pravastatin Sodyumun Etki Mekanizması

Statinler kolesterol biyosentezinin hız sınırlayıcı adımını katalize eden HMG-CoA redüktazı yarışmalı şekilde inhibe ederler (Buse, 2003).



Şekil 1. 2. Kolesterol Biyosentezinin Statinler Tarafından İnhibe Edilen Basamağı (Schachter, 2004).

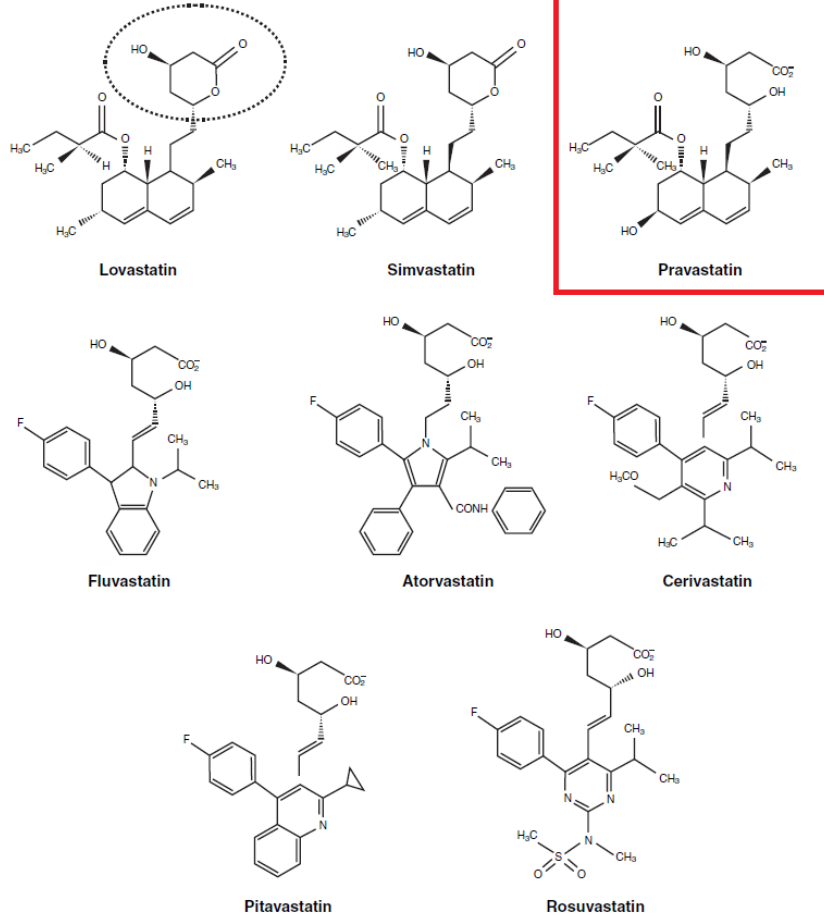
HMG-CoA redüktaz, HMG-CoA'nın yeni kolesterol sentezinde hız sınırlayıcı adım olan mevalonata dönüşümünü katalize eder. Bu enzimin statinler tarafından rekabetçi inhibisyonu, hepatosit kolesterol sentezini azaltır (Şekil 1.2). Hücre içi kolesterol konsantrasyonundaki buna bağlı azalma, hepatosit hücre yüzeyinde LDL-reseptör ekspresyonunu indükler, bu da kandan LDL-C ekstraksiyonunun artmasına ve dolaşımdaki LDL-C konsantrasyonlarının azalmasına neden olur. Statinlerin ayrıca, yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (HDL-C) konsantrasyonundaki artışlar ve trigliserit konsantrasyonundaki azalmalar dahil olmak üzere diğer lipit parametreleri üzerinde de yararlı etkileri vardır (Maron vd., 2000). LDL seviyesini en çok azaltabilen ilaçlar statinlerdir. (Canseven, 2016).

1.1.4.2. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Pravastatin Sodyumun Fizikokimyasal Özellikleri

Statinlerin moleküllerinin kimyasal yapıları Şekil 1.3'de gösterilmiştir. Bu yapılar genel olarak 3 kısımdan oluşabilir (Rao K. vd., 2011).

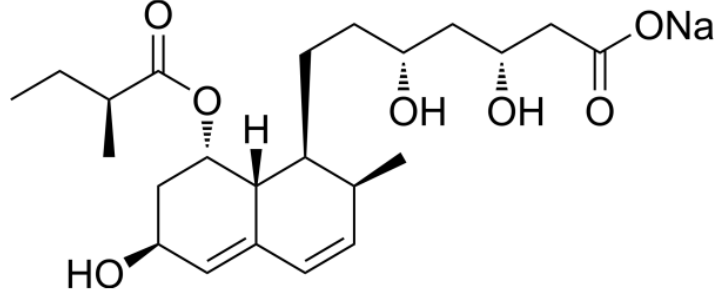
- enzim substratı olan HMG-CoA'nın bir analogu,
- statin molekülünün enzime bağlanmasını sağlayan bir hidrofobik halka,
- ilaçların çözünürlükleri yani farmakokinetik özelliklerinin tanımlayan halkalar üzerindeki yan gruplar olarak ayrılır.

HMG-CoA analogue



Şekil 1. 3. Statinlerin kimyasal yapıları (Schachter, 2004).

HMG-CoA redüktazın statin inhibisyonu için yapısal mekanizma, altı farklı statine bağlı enzimin katalitik kısmının kristal yapılarının çözülmesiyle aydınlatılmıştır. Yapılar, statinlerin enzimin aktif bölgesine bağlanarak etki gösterdiğini ve substratın enzimin substrata bağlanmasını sterik olarak engellediği görülür. Altı statin-enzim kompleksinin karşılaştırılması ile bağlanma biçimlerinde ince farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur (Schachter, 2004). Bu tez çalışmasındaki hedef molekül olan Pravastatin Sodyum molekül yapısı ve fizikokimyasal özellikleri şöyledir;



Şekil 1. 4. Pravastatin Sodyum molekül yapısı (National Center for Biotechnology Information, 1996)

Çizelge 1. 3. PST molekülünün fizikokimyasal özellikleri

IUPAC Adı : (3R,5R)-3,5-dihidroksi-7-[(1S,2S,6S,8S,8R)-6 - hidroksi - 2 - metil - 8 - [[(2S) - 2 - metilbütanoil] oksi]-1,2,7,8,8aR,heksahidro naftalen-1-il]-heptanoik asit	
Moleküler formül :	C ₂₃ H ₃₆ O ₇ Na
Moleküler ağırlık :	446.52 gr/mol
pKa :	4.32
Erime noktası :	208 - 209°C
Suda çözünürlüğü :	0,016 gr/L

PST beyaz, sarımsı kristal toz formunda görünür su ve metanolde serbestçe çözünür, kloroform, eter, aseton ve asetonitrilde nispeten çözünmez (Al-badr & Mostafa, 2014).

1.1.4.3. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Pravastatin Sodyum İçin Literatür Çalışmaları

Prasanthi vd., (2021) tarafından yayımlanan çalışmada Pravastatinin saf ve tablet dozaj formunda tayini için basit, hızlı, kesin, doğru, hassas ve stabiliteyi gösteren bir RP-YPSK yöntemi geliştirilmiştir. pH'ı 3'e ayarlanmış %0,1 formik asit ve 50:50 v/v oranında metanol içeren mobil faz ile Zorbax ODS sabit faz kullanılarak geliştirilmiştir. Pravastatin piki 238 nm'de izlenmiş ve alıkonma süresi 4,44 dakika olmuştur. Önerilen yöntemi özgünlük, kesinlik, doğrusalılık, doğruluk, sistem uygunluğu ve sağlamlık açısından doğrulamak için ICH yönergeleri takip edilmiştir. Yöntemin 10-50 µg/mL aralığında doğrusal olduğu R²=0.997 olduğu bulunmuştur. Gün içi ve günler arası hassasiyet için, Pravastatin için %RSD %1,05 ve %0,917'dir. Yüzde ortalama geri kazanım %98,36 olarak bulunmuştur. GS ve TS değerleri

sırasıyla 0,231 ve 0,701 µg/mL'dir. Pravastatin stabilitesi çeşitli zorlanmış bozunma koşulları altında incelenmiş ve asidik ve bazik koşullarda kolayca bozunduğu görülmüştür. Geliştirilen yöntemin, farmasötik formülasyonlardaki Pravastatin'in rutin kalite kontrol analizleri için uygun bir uygulama olduğu görülmüştür.

Shinde vd., (2019) tarafından yayımlanan çalışmada tablet dozaj formunda pravastatin sodyum tayini için basit, doğru, hassas ve stabilite gösteren bir UPLC yöntemi geliştirilmiştir. Ayırma işlemi C18 kolonda, mobil faz olarak pH 5.5 tampon: metanol karışımından oluşan 30:70 v/v oranında mobil faz ile 0.2 ml/dak akış hızında gerçekleştirilmiş ve tespit 238nm'de UV-görünür dedektör kullanılarak yapılmıştır. Alıkonma süresi 1,5 dakika olarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrileri Determinasyon Katsayısı (r^2) 0.999 ile doğrulanmıştır. Pravastatin sodyum tabletin yüzde tayini %98,4 olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemler ICH kılavuzlarına göre doğrulanmıştır.

Sithole vd., (2021) yayımladıkları bir çalışmada yeni bir YPSK yöntemi geliştirmiş ve şu anda mevcut olan tüm statinleri (atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, simvastatin) eş zamanlı olarak analiz etmek için doğrulanmıştır. Gradyan koşulları %25 asetonitril ile başlamış, 1.0 dakika sonra doğrusal olarak %90'a yükselmiş, 6.5 dakikaya kadar % 90'da tutulmuş ve son olarak başlangıç koşullarına yeniden dengelenmiştir. Mobil faz asetonitril/su ve 0.005 M (%0.2) oktan sülfonik asit-Na'dan (pH 3.5) oluşmuştur. Akış hızı 10 µl enjeksiyon hacmi ile 1,0 ml/dak olarak ayarlanmıştır. YPSK yöntemi 0.2-206.4 µg/ml konsantrasyon aralığında doğrusallık ($R^2 = 0.9999$) göstermiştir. Tespit limiti (GS) ve miktar belirleme limiti (TS) değerleri sırasıyla $\leq 15\%$ ve $\leq 20\%$ olan izin verilen sınırdadır. Yöntem validasyonu için tüm parametrelerin uygun bir şekilde incelenmesinin ardından YPSK yönteminin başarılı bir şekilde valide edildiği ve nano-emülsiyonların ve nano-emülsjellerin formülasyonu sırasında kullanılan diğer yardımcı maddelerle birlikte bile statinleri eşzamanlı olarak ölçmek için doğru olduğu kanıtlanmıştır.

Sharma vd., (2023) yayımladığı bir çalışmada Nebivolol Hidroklorür β_1 reseptör blokörüdür ve pravastatin sodyum farmakolojik etkisini kolesterol sentezinin inhibisyonu yoluyla gösterir. Her iki ilaç da terapötik olarak uyumludur ve tek doz formülasyonda uygulanabilir. Literatür incelendiğinde, seçilen ilaç kombinasyonu için etkili bir strateji bulunmadığı görülmüştür. Sonuç olarak RP-HPLC kullanılarak ilaçlarda Pravastatin sodyum ve Nebivolol hidroklorürün eş zamanlı olarak tahmin edilmesi için basit, etkili, hassas, spesifik ve hızlı bir yöntem oluşturulmaya çalışılmıştır. 257 nm'de C-18 kolon, 20:80 oranında

asetonitril ve su mobil fazı en uygun kromatografik koşullar olarak bulunmuştur. Pravastatin sodyum ve Nebivolol hidroklorürün alıkonma süreleri sırasıyla 2,092 ve 3,623 dakika olup ortalama geri kazanım yüzdeleri sırasıyla %99,38 ve %99,54'tür. Önerilen tekniğin ICH kılavuzlarına uygun olduğu görülmüştür.

Maree vd., (2020) tarafından transdermal ilaç uygulaması sırasında kullanılan çeşitli statinleri (atorvastatin, fluvastatin, pitavastatin ve pravastatin) belirlemek ve miktarını tespit etmek için bir YPSK yöntemi geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Yöntemin en etkili olduğu Restek Ultra C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm kolon, 1.0 ml/dak akış hızı, 240 nm'de UV tespiti ve 10 µl enjeksiyon hacmi ile kanıtlanmıştır. Kullanılan mobil faz % 0,1 ortofosforik asit içeren asetonitril/ su olup %30 asetonitril ile başlanmış, 10 dakikaya kadar doğrusal olarak %70'e (4 dakika sonra) çıkarılmış ve ardından başlangıç koşullarına yeniden dengelenmiştir. Bu YPSK yöntemi 0.05-200.00 µg/ml konsantrasyon aralığında doğrusallık göstermiş ve ortalama %98-103 geri kazanım sağlamıştır. Tespit sınırı (GS) ve miktar belirleme sınırı (TS), statinlerin atorvastatin (0,013-0,035 µg/ml'de ölçülebilir) hariç 0,004-0,006 µg/ml konsantrasyonlarda tanımlanabildiğini göstermiştir. Yöntem validasyonu sırasında gerçekleştirilen spesifiklik, yöntemin diğer yardımcı maddelerle birlikte transdermal formülasyonlara dahil edildiğinde statinlerin doğru tespiti ve miktar tayini için uygun olduğunu doğrulamıştır.

Maslarska, (2014) tarafından Pravastatin sodyumun tabletlerde tayini için basit, doğru, hızlı ve hassas bir YPSK yöntemi başarıyla geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Mobil faz oranı 455: 545: 2: 1.2 v/v oranında metanol : su : trietilamin : glasiyal asetik asitten oluşan bir mobil faz kullanılarak bir ters faz C 18 kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 2 mL/dak ve tespit dalga boyu 238 nm idi. Doğrusallık, 0,9994 Determinasyon Katsayısı ile 25-200 µg/mL linear aralığında gözlenmiştir. Önerilen yöntem doğrusallığı, doğruluğu ve kesinliği açısından optimize edilmiş ve doğrulanmıştır. Bu yöntem, tablet formülasyonundaki Pravastatin sodyumun rutin kalite kontrol analizi için kullanılabilir.

Haandel vd., (2016) İnsan plazmasında pravastatin ve ana metabolitleri olan 3'-hidroksi-pravastatin, pravalakton ve 3'-hidroksi-pravalaktonun eşzamanlı kantitasyonu için ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrik (UYPSK-MS/MS) bir yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir. EDTA içindeki plazma numuneleri, analitleri stabilize etmek için pH 4.5 (0.1 M tampon) içinde seyreltilmiş ve elüsyon plakalarında hidrofilik lipofilik denge (HLB) katı faz ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Kromatografik ayırma Cortecs™ C18 kolonunda (2.1 × 100 mm, 1.8 µm), 0.4 mL/dak akış hızında asetonitril

ve 10 mM metilamonyum asetat tamponu (pH 4.5) karışımı ile gradyan elüsyon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrometrik tespit, pozitif/negatif elektrospay iyonizasyon (ESI) arasında geçiş yapan çoklu reaksiyon izleme kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yöntem, 0,5-200 nM konsantrasyon aralığındaki tüm analitler için doğrusaldır ve tüm kalite kontrol seviyelerinde gün içi ve günler arası kesinlik $\leq 5,2$ ve doğruluk (bağıl hata olarak) $\leq 8,0$ 'dir. Yöntem 20-40 mg oral dozdan sonra çocuklarda pravastatin ve metabolitlerinin farmakokinetik özelliklerinin araştırılmasına başarıyla uygulanmıştır.

Athota vd., (2017) yayımladığı bir çalışmada aspirin ve pravastatinin bulk ve farmasötik dozaj formlarında eşzamanlı tayini için stabilite belirleyici bir YPSK yöntemi geliştirdi ve doğrulamışlardır. Aspirin pravastatin ve bunların bozunma ürünlerinin kromatografik ayrımı Phenomex C18 kolonunda, mobil faz olarak su, asetonitril ve asetik asit (40:59:01, v/v/v) karışımı ile 1,5 mL/dak akış hızında izokratik elüsyon modunda gerçekleştirilmiştir. Yöntem aspirin ve pravastatin için sırasıyla 20,5- 61,5 µg/mL ve 10-30 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık sergilemiştir. Tespit ve miktar belirleme limitleri aspirin için sırasıyla 0,204µg/mL ve 0,680 µg/mL ve pravastatin için 0,077 µg/mL ve 0,256 µg/mL'dir. Geliştirilen yöntem doğruluk, kesinlik, seçicilik, özgüllük ve sağlamlık açısından valide edilmiştir. İncelenen tüm parametreler kabul sınırları içinde kalmıştır. Önerilen yöntemin kararlılık gösterme gücü, ilaçların hidrolitik (asit ve baz), oksidatif, fotolitik ve kuru ısı stresi koşullarına maruz bırakılmasıyla kanıtlanmıştır. Geliştirilen yöntemin, stres bozunma ürünlerinin varlığında aspirin ve pravastatinin eşzamanlı olarak rutin analizi için uygun olduğu görülmüştür.

PST için literatürde kullanılan bazı analitik yöntemler Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK), floresans dedektörlü YPSK ve sıvı kromatografisi-tandem kütle(LC/MS/MS) dahil olmak üzere, biyolojik sıvılarda pravastatin sodyumun tayini ve miktarının belirlenmesi için UV-Spektrometri, polarografik ve elektroanalitik yöntemler rapor edilmiştir (Bauer vd., 2005; Zhu & Neirinck, 2003). Bu yöntemler çok hassastır ancak idrarda değil yalnızca plazmada miktar belirlemeyi tanımlamışlardır. Diğer yazarlar radyoaktif işaretli pravastatin kullanan plazma ve idrar yöntemleri yayınlamıştır (Ertürk vd., 2003). Bu yöntemler özel ekipman ve güvenlik koşulları gerektirir. Birkaç yayında LC/MS ve YPSK belirlenmesi açıklanmaktadır ancak kütle seçici saptama maliyetlidir ve sıklıkla rutin analiz için mevcut değildir YPSK daha basit ve hızlı, seçici bir yöntem olarak kullanılmıştır.

1.1.4.4. Doktora Tezi Kapsamında İncelenen Pravastin Sodyumun Tedavide Uygulanışı

Pravastatin, özellikle tip IIa ve IIb hiperlipoproteinemilerde olmak üzere hiperkolesteroleminin tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca iskemik kalp hastalığının hem birincil hem de ikincil önlenmesi amacıyla hiperkolesterolemik hastalara profilaktik olarak da verilmektedir. Ayrıca felç riskini azaltmak için daha önce miyokard enfarktüsü geçirmiş hastalarda da kullanılır. Pravastatin, yatmadan önce günde bir kez 10-40 mg'lık olağan dozlarda sodyum tuzu olarak ağızdan verilir. Doz 4 haftadan az olmayan aralıklarla ayarlanabilir (Shinde vd., 2019).

1.2. Ekstraksiyon ve Zenginleştirme Yöntemleri

Son yıllarda enstrümental analizde hızlı, kesin, doğru ve duyarlı metodolojilerin geliştirilmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Biyolojik, çevresel numuneler ve farmasötik ürünlerdeki analitlerin belirlemesi için yüksek verimli analitik enstrümantasyonların geliştirilmesindeki ilerlemelere rağmen, numune hazırlamak için bir ön işlemin hala kullanılması gerekmektedir (Sarafraz-yazdi & Amiri, 2010). Numune hazırlama adımı, son derece düşük konsantrasyonlarda analitlerle ve karmaşık matrislerle çalışırken daha önemli bir adım haline gelir. Bu yüzden bazı ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri büyük miktarlarda toksik çözügen tükettiğinden ve bu nedenle yeşil analitik kimyaya uygun olmadığından dolayı yeni mikroekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir (Jalili vd., 2020). Genellikle örnek hazırlama yöntemleri pratik, kullanımı kolay, uygun fiyatlı ve birçok analitik cihaza uyumlu olması beklenir. Bu konudaki yeni beklentiler organik çözücü tüketimini azaltmak, örnek hazırlama basamağını daha basit hale getirme ve mikro düzeyde çalışmak şeklindedir. Son yıllarda bu avantajlarından dolayı mikroekstraksiyon yöntemlerine ilgi artmıştır (Dadfarnia et al., 2010; Sarafraz-yazdi & Amiri, 2010). Bu tez çalışmasında da eser miktarda örnekte hem ayırma hem zenginleştirmeyi sağlayan bir mikro ekstraksiyon temelli yöntemin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Uygulanan mikroekstraksiyon adımından sonra derişimi artan analitlerin hassasiyeti yüksek analitik cihazlarla doğrudan analizi kolay bir şekilde sağlanmaktadır. Numunedeki matriks ortamından ayrılan analitin daha büyük hacimden daha küçük hacimde solvente geçirilmesi ile gerçekleşen işleme zenginleştirme denir. Günümüzde numune hazırlama için sıklıkla kullanılan Mikroekstraksiyon Yöntemleri şunlardır;

- Katı faz mikroekstraksiyon (KFME) (Keçili vd., 2019; Kudlejova vd., 2012)

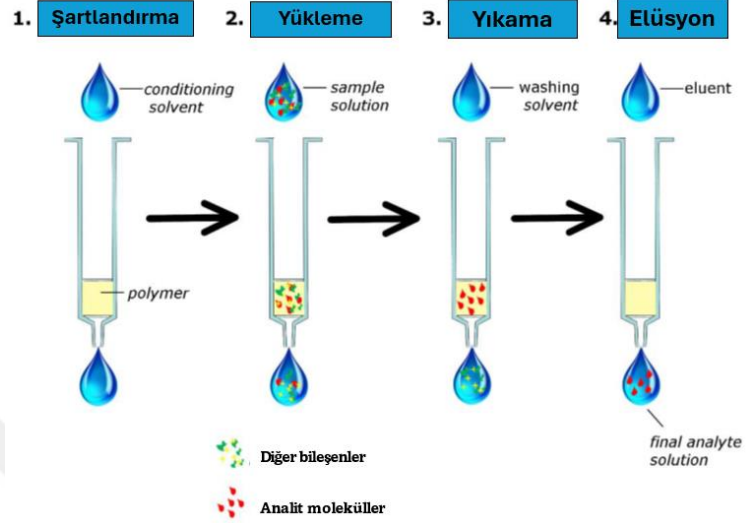
- Manyetik Karıştırma Çubuğu ile Ekstraksiyon (MKE) (Kabir vd., 2017)
- Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu (MKFE) (Liang vd., 2022)
- Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (SFME) (Sarafraz-yazdi & Amiri, 2010b)
- Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (DSSME) (Chen vd., 2018)
- Oyuk Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (Sarafraz-yazdi & Amiri, 2010a)
- Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon (Dadfarnia vd., 2010)
- Süperkritik akışkan ekstraksiyon (Halvorsen vd., 2000)
- Soxhlet ekstraksiyon (SOX) (Andreu & Pic, 2004; Pareja vd., 2011)
- Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE) (Kori, 2021; Madej, 2009; Park vd., 2012)
- Fabrik temelli katı faz ekstraksiyon (FKFE) (Kabir vd., 2017a)

Bu tez çalışmasında özgün olarak sentezlenen maddelerin kullanıldığı Manyetik katı faz ekstraksiyon (MKFE) ve Fabrik katı faz ekstraksiyon (FKFE) yöntemleri kullanılmıştır.

1.2.1. Katı Faz Ekstraksiyonu (KFE)

Numune hazırlama; doğruluk, kesinlik ve miktar belirleme limitleri üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir ve özellikle eser miktar belirleme amaçlandığında analitik sürecin hız belirleyici adımıdır (Zwir-Ferenc ve Biziuk, 2006). Bununla birlikte bu adımda meydana gelen tüm hatalar en iyi ayırma veya tespit yöntemiyle bile düzeltilemeyeceğinden bu sürecin önemi göz ardı edilemez. Kromatografik yöntemlerin başarılı bir şekilde uygulanmasından önce, analitleri girişim yapan matris bileşenlerinden ayırmak ve zenginleştirmek için ekstraksiyon genellikle gereklidir. Bunun için uzun yıllar boyunca farklı ekstraksiyon teknikleri uygulanmaktadır (Buszewski & Szultka, 2012). Katı faz ekstraksiyonu, düşük organik solvent tüketimi, basitlik, hızlılık ve gelişmiş numune temizleme gibi diğer geleneksel numune hazırlama tekniklerine göre avantajlara sahip olan kapsamlı bir numune hazırlama tekniğidir. SPE'nin bu avantajları onu çevresel, klinik, biyolojik ve gıda çalışmaları gibi farklı biyo/analitik araştırma alanlarında çok çekici bir teknik haline getirmiştir (Boyacı vd., 2015). KFE'nin genel konfigürasyonu genellikle ekstraktif bir sorbent içeren kısa bir kolon/kartuş/membran kullanan dolgu yatak sistemidir (Boyacı vd., 2018). Katı faz ekstraksiyonunda numune işleme Şekil 1.5' deki gibi dört farklı adımdan oluşur. Başlangıçta, sorbent, analitin tutulmasının tekrarlanabilirliğini geliştirmek ve elüsyon aşamasında sorbent safsızlıklarının taşınmasını azaltmak için çözücü ile şartlandırılır. Şartlandırıcı çözücü daha sonra numune çözücüsüyle değiştirilir ve numune kontrollü bir akış hızında numune alma cihazından geçirilir. İsteğe bağlı olarak numune işlendikten sonra sorbent, analitleri yerinden oynatmadan istenmeyen matris bileşenlerini sorbentten uzaklaştırmak için zayıf bir çözücü ile

yıkamır. Son olarak, ilgilenilen analitler daha sonraki tayin için sorbentten küçük bir hacimde güçlü çözücü içinde elüe edilir (Poole, 2003; Poole vd., 2000).



Şekil 1. 5. Katı faz ekstraksiyon adımları

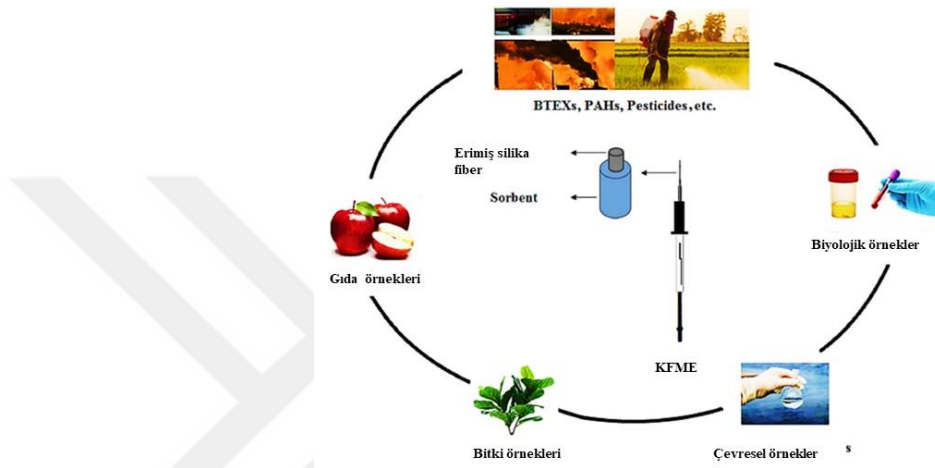
(Sandoval, 2017)

Biyolojik matrislerde ilaçların belirlenmesinde numune hazırlama gerektiğinde KFE dışında sıvı sıvı ekstraksiyonu (LLE) ve protein çöktürme gibi geleneksel teknikler kullanılır. Ancak bu teknikler zahmetlidir ve analisti organik çözücülerle temasa maruz bırakır. Ayrıca organik çözücülerin kullanımı atık oluşumu nedeniyle çevresel bir sorun teşkil etmektedir. KFE, daha geleneksel numune hazırlama tekniklerine kıyasla birçok avantaja sahiptir: yüksek analit geri kazanımı, daha düşük çözücü ve reaktif tüketimi, yüksek oranda saflaştırılmış ekstraktlar, geniş polarite aralığındaki analitleri aynı anda ekstrakte etme yeteneği, otomasyon kolaylığı, enstrümantal analize uygunluk ve organik çözücüde azalma ayrıca daha seçici olması ve daha temiz örnekler üretmesi avantajları olarak sayılabilmektedir (Vasconcelos vd., 2020). Son yıllarda katı faz temelli ve mikroekstraksiyon denilen daha hızlı, daha seçici ve uygulaması kolay bir çok yöntem kullanılmaya başlanmıştır ve çoğu yeni geliştirilen yöntemlerin temeli KFE 'ye dayanmaktadır.

1.2.2. Katı Faz Mikroekstraksiyonu (KFME)

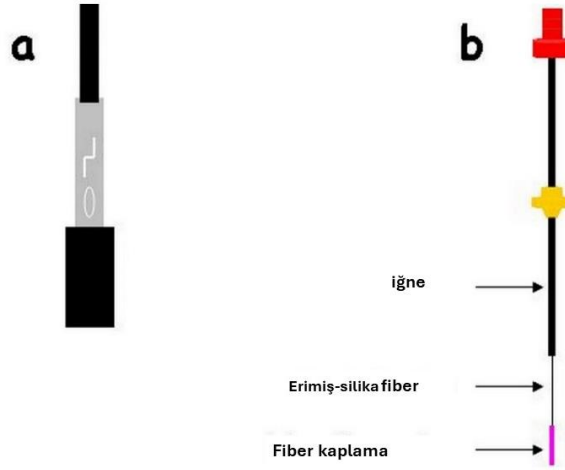
Katı faz mikro ekstraksiyonu (KFME) numune alma, konsantrasyon ve ekstraksiyonu tek bir adımda birleştiren ve kromatografik sistemler gibi analitik cihazlara doğrudan uygulanabilen modern, karmaşık olmayan ve yeşil kimyaya uygun bir numune hazırlama

teknikidir (Spietelun vd., 2013). KFME ilk kez Pawliszyn ve Arthur tarafından 1990 yılında önerilmiş ve pratikte uygulanmış ve 1993 yılında ticari olarak kullanıma sunulmuştur (Risticovic vd., 2010). Bu tekniğin avantajları arasında basitlik, hızlılık, iyileştirilmiş numune temizliği, doğru analiz ve düşük organik solvent tüketimi (solventsiz veya solvent minimuma indirilmiş) yer alır (Boyacı vd., 2018). Bu teknik tarımdan tıbbı kadar çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Şekil 1.6. KFME tekniğinin uygulama alanları ve uygulandığı analitlerin bir kısmını göstermektedir.



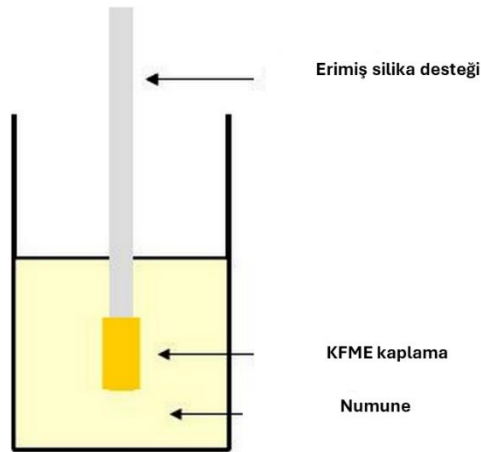
Şekil 1. 6. Çeşitli matris ortamlarından farklı analitlerin ekstraksiyonu için KFME uygulamalarının şematik gösterimi (Jalili vd., 2020).

Bir KFME yöntemi geliştirirken, fiber kaplamanın seçimi, numune alma modunun seçimi, çalkalama koşullarının optimizasyonu, numune hacminin seçimi ve ekstraksiyon ve desorpsiyon koşullarının optimizasyonu dahil olmak üzere çeşitli adımların uygun şekilde takip edilmesi gerektiği iyi bilinmektedir. Fiber-KFME cihazı, bir fiber tutucudan (Şekil 1.7a) (manuel veya otomatik KFME işlemlerini desteklemek için iki farklı formatta mevcuttur) ve modifiye edilmiş bir şırıngaya benzeyen bir iğnenin içinde yerleşik bir fiber/katı desteğine sahip fiber düzeneğinden (Şekil 1.7b) oluşur (O'Reilly vd., 2005). İğne, fiberi numune şişelerinin bölmelerine veya kromatografik enjektörlere nüfuz etmesi sırasında meydana gelebilecek hasardan korur. Erimiş silika fiber, uygun bir polimerik sabit fazdan oluşan ince bir tabaka ile kaplanır; bu, analitlerin numune matrisinden adsorpsiyon işlemleri sırasında konsantre edilerek ekstraksiyonuna ve zenginleştirilmesine olanak tanır (Pragst, 2007).



Şekil 1. 7. Manuel KFME prosedürlerinin gerçekleştirilmesine yönelik ticari olarak temin edilebilen fiber SPME cihazının grafiksel gösterimi. Manuel fiber tutucu (a) . 1 veya 2 cm uzunluğunda polimerik kaplamayla kaplanmış iğnenin içinde yerleşik fiber bulunan fiber düzenneği (b)

(Risticovic vd., 2010)



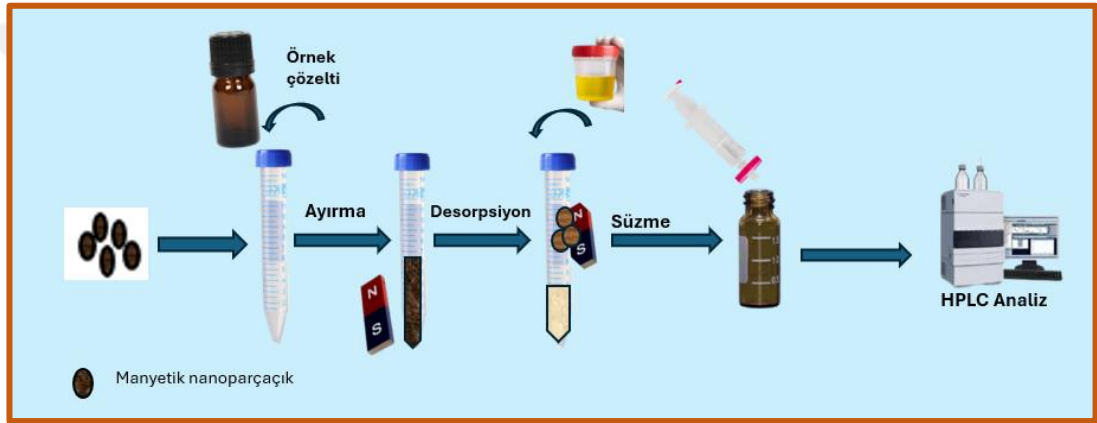
Şekil 1. 8. KFME sürecinin çizimi

(Risticovic vd., 2010)

KFME'nin en çarpıcı avantajları basitlik, hızlilik, solvent eliminasyonu, yüksek hassasiyet, küçük örnek hacmi, düşük maliyet ve basit otomasyondur. Geleneksel numune hazırlama teknikleriyle küçük numune hacimlerini kullanmak çok zordur. Bu, sınırlı numune boyutları analitik kimya uygulamaları için özellikle önemlidir. SPME kurulumu küçük ve kullanışlı olduğundan, çok küçük numunelerden analitlerin ekstrakte edilmesi için kaplanmış fiberler kullanılabilir. KFME ayrıca yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ve LC-MS ile analizi için de kullanıma sunulmuştur böylece zayıf uçucu veya termal açıdan kararsız bileşikler analiz edilebilmiştir (Kataoka vd., 2000).

1.2.3. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu (MKFE)

Biyolojik sıvılarda ilaç analizi genellikle dört ana adımı içerir: hedef maddenin biyolojik matriksten ekstraksiyonu, etkileşimlerin ayrılması, tespit ve veri işleme. Ancak plazma, idrar gibi biyolojik numunelerdeki analizler bu matrislerin karmaşıklığı nedeniyle zordur. Plazma, serum ve sütteki proteinler ve idrardaki inorganik tuzlar gibi endojen etkileşimlerin varlığı analitik ayırma adımından önce numune işleminin yapılmasını gerektirir. Ayrıca, analitlerin çok düşük konsantrasyonlarda mevcut olması yaygındır. Bu bağlamda numune hazırlama öncelikli bir konu haline gelir (Vasconcelos ve Fernandes, 2017).



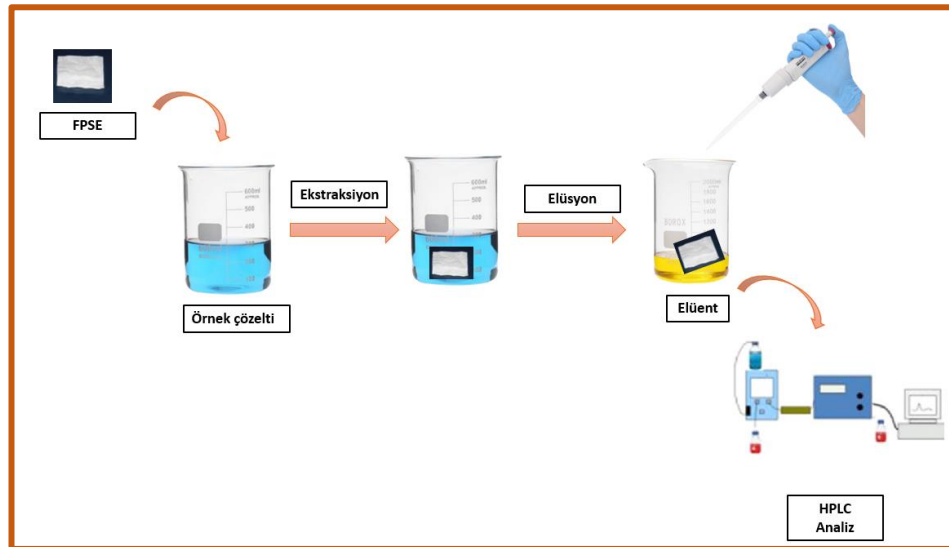
Şekil 1. 9. Manyetik katı faz ekstraksiyonunun temel adımları

MKFE üzerine bir çalışma yapan ilk grup olan Safarikova ve Safarik (Mirka Šafaříková ve Ivo Šafařík, 1999) manyetik sorbentlerin kullanımına dayanan KFE için yeni bir prosedür geliştirmişler ve bu yöntemi manyetik katı faz ekstraksiyonu olarak adlandırmışlardır. KFE'deki farklı yaklaşımlar arasında harici bir mıknatısla ayrılabilir malzemelerin kullanımı bu formatın geleneksel paketlenmiş KFE'ye göre avantajları nedeniyle giderek daha popüler hale gelmektedir. İlaç analizlerinde kullanılmasının dışında MKFE'nin ağır metal iyonlarının, çevresel analizlerde organik kirleticilerin, pestisitlerin ve seçilmiş kirleticilerin zenginleştirilmesinde ve gıda güvenliği analizlerinde ön numune hazırlama ve türlendirilme işlemlerinde kullanım alanları bulunduğu görülmektedir (Yin vd., 2021). MKFE yönteminde bir numune çözeltisine dağılmış ve bir manyetik alanın uygulanmasıyla kolay ve hızlı bir şekilde geri kazanılan manyetik bir malzeme yer almaktadır. MKFE'nin geleneksel KFE yöntemlerine göre sorbent paketleme sorunları, yüksek geri basınç veya tıkanma gibi yaygın sorunların iyileştirilmesine olanak sağlama gibi avantajları bulunmaktadır (Maya vd., 2017). Bu yöntem

yüksek adsorpsiyon kapasitesi, yeniden kullanılabilirlik, basit ve hızlı deneysel işlem, yüksek verimlilik ve ekstraksiyon aşamaları için pahalı laboratuvar ekipmanlarına gerek olmaması gibi birçok avantajı nedeniyle son yıllarda önemli bir numune hazırlama yöntemi olarak analitik kimyacıların ilgi odağı olmuştur. Adsorbanların manyetik doğası ve manyetik ayırmaların seçiciliği nedeniyle bu teknik aynı zamanda numunelerden analitlerin zenginleştirilmesi için de kullanılmıştır

1.2.4. Fabrik Faz Katı Ekstraksiyonu (FFE)

Fabrik fazı katı ekstraksiyon (FFE), biyoloji, adli tıp, gıda, ilaç, biyoanalitik, toksikoloji, ulusal güvenlik ve halk sağlığı alanlarında çok çeşitli analitler için güçlü bir numune alma ve numune hazırlama yöntemi olarak sunulmuştur. FFE membranı , esnek bir kumaş substrat ve substratın yüzeyinde hareketsiz hale getirilmiş sol-jel türevli, yüksek verimli bir sorbent kaplamadan oluşur ve doğal veya sentetik bir kumaş alt tabaka üzerinde ultra ince bir kaplama oluşturmak için sol-jel kaplama tekniği kullanılır. 2014 yılında Kabir ve Furton, hem KFE'yi hem de katı faz mikro ekstraksiyonu (SPME) işlemini tek bir numune hazırlama tekniğinde yenilikçi bir şekilde birleştiren Şekil 1.10'da verilen fabrik fazı sorptif ekstraksiyonu (FFE) olarak adlandırılan yeşil bir yeni nesil numune hazırlama yöntemi geliştirmişlerdir (Kabir vd., 2017)



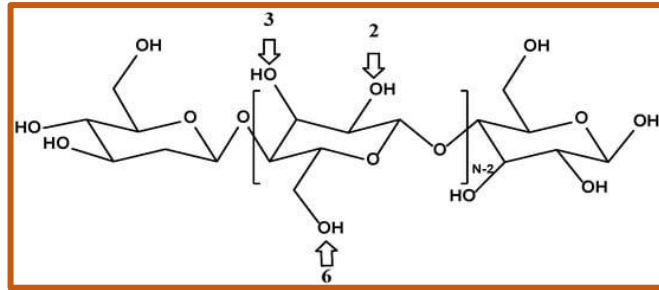
Şekil 1. 10. FFE yöntemi şematik gösterimi

FFE’de doğal veya sentetik bir kumaş alt tabaka üzerinde ultra ince bir kaplama oluşturmak için sol-jel kaplama tekniği kullanılır. FFE filtreleme, protein çöktürme veya santrifüjleme gibi ortam hatalarını azaltmak için numunenin ön ayırmasını gerektirmez. FFE’de öncelikle numune ortamla temas ettirilir ve analiz edilecek madde adsorban üzerinde tutulur ardından FFE membranı organik çözücüye daldırılır ve geri ekstrakte edilir. FFE’de kullanılan kumaş substratı %100 pamuk selüloz (hidrofilik) veya cam elyafı (nötr) veya polyester (hidrofobik) olabilir. Bu substratlarının esnekliğini, geçirgenliğini ve zengin yüzey kimyasını başarıyla kullanmış ve bu da hızlı ve yüksek verimli analit ekstraksiyonu için çok yüksek, kolayca erişilebilir aktif ekstraksiyon yüzeyi ile substrata kimyasal olarak bağlanmış bir mikroekstraksiyon sorbenti elde edilmesini sağlamıştır. FFE, doğal/sentetik kumaş substratlarının esnekliğini, geçirgenliğini ve zengin yüzey kimyasını başarılı bir şekilde kullanmış ve bunun sonucunda hızlı ve yüksek verimli analit ekstraksiyonu için çok yüksek, kolayca erişilebilir bir aktif ekstraksiyon yüzeyine sahip substrata kimyasal olarak bağlanan bir mikro ekstraksiyon sorbenti elde edilmiştir. FFE olağanüstü derecede yüksek bir birincil temas yüzey alanı ve proteinler, parçacıklar içeren aşırı derecede karmaşık numune matrislerinden bile hedef analitleri doğrudan zenginleştirme yeteneği de dahil olmak üzere solvent en aza indirilmiş numune hazırlama tekniklerinde büyük avantajlar sağlamıştır (Kabir vd., 2017).



Şekil 1. 11.Fabrik faz katı maddesinin hazırlanma adımları (Kabir vd., 2017)

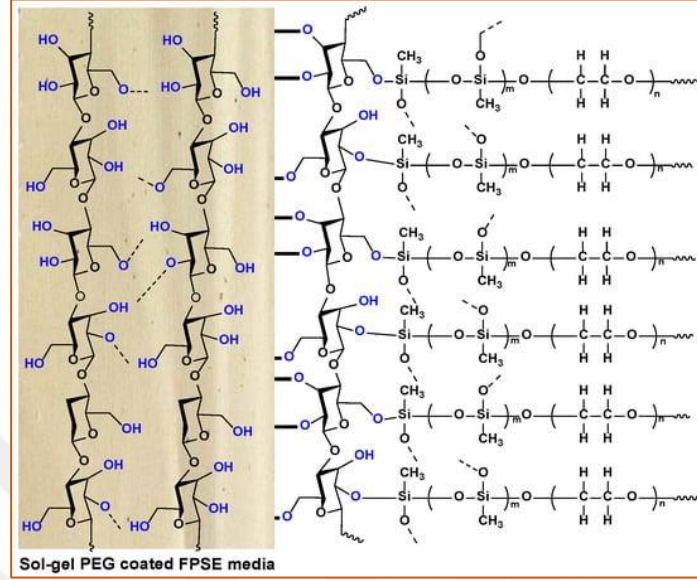
FFE'deki adımlar Kabir vd., tarafından yapılmıştır ve 5 cm²'lik bir fabrik faz parçası (2,5 cm x 2,0 cm) sol-jel PEG kaplı fazın temizliğini sağlamak için 5 dakika boyunca 1 mL metanol: asetonitril (50:50, v/v) içerisine daldırıldı ve daha sonra organik çözücüyü çıkarmak için havayla kurutuldu. Temiz fabrik fazı daha sonra ilgilenilen analitler ile emdirilmiş numuneyi içeren numune alma şişesine (10 mL) daldırıldı. Son olarak önceden belirlenmiş bir süre boyunca analitlerin numune boyunca difüzyonunu desteklemek için numune alma şişesi manyetik bir karıştırıcının üstüne yerleştirildi. Bundan sonra fabrik faz numune alma şişesinden çıkarıldı, çalkalandı ve kurutuldu. Ekstrakte edilen analitler uygun bir solvent sistemine geri ekstrakte edildi. Solvent sisteminin 500 µL'si 1 mL'lik bir cam şişeye aktarıldı. Ekstrakte edilen analitleri içeren kuru FFE cihazı solvent karışımına daldırıldı. Geri ekstraksiyon için FFE cihazının önceden belirlenmiş bir süre boyunca solvent sistemine batırılmış halde tutulmasıyla gerçekleştirildi ve herhangi bir harici difüzyon mekanizması (karıştırma/sonikasyon) uygulanmadı. Ekstrakte edilen analitleri içeren geri ekstraksiyon solüsyonu daha sonra kalan partikülleri çökelmeye zorlamak amacıyla santrifüjleme için bir ependorf tüpüne aktarıldı. Son olarak parçacık içermeyen önceden konsantre edilmiş analit çözeltisi kromatografik analiz için bir YPSK numune şişesine aktarıldı. FFE de kullanılan kumaşın yapısı selülozdur ve Şekil 1.11' de gösterilen hidrofilik doğrusal bir polimerdir. Sol-jel kaplama işlemi sırasında polikondensasyona katılabilen üç hidroksil fonksiyonel grubu içerir. Sol-jel sorbent kaplama için uygun potansiyel bir substrattır.



Şekil 1. 12.Selüloz substratın kimyasal yapısı (Kabir vd,2017)

Sol-jel kaplama işlemi, alt tabakaya kimyasal olarak bağlanmış, oldukça gözenekli ve eşit şekilde dağıtılmış, ultra ince üç boyutlu hibrit inorganik-organik sorbent ağıyla sonuçlanır. Kaplama bireysel selüloz mikrofibrilleri üzerinde meydana geldiğinden, sorbent yüklemesi nispeten yüksektir ve kaplama kalınlığı düşüktür. Şekil 1.12'de sol-jel PEG kaplı FFE ortamının şematik gösterimini göstermektedir. Kumaş substrat üzerindeki sol-jel PEG

kaplama çıplak gözle görülemese de, sorbent kaplamanın yapısı taramalı elektron mikroskobu veya benzeri görüntüleme cihazında daha yüksek büyütmede görüntülenebilir.



Şekil 1. 13. Selüloz kumaş yüzeyinde yüzeye yapıştırılmış sol-jel PEG kaplamanın şematik gösterimi. (Samanidou ve Kabir, 2022).

FFE'nin avantajları şunlardır;

- (i) Basit, ucuz, hızlıdır ve az miktarda çözücü kullanımı sağlar.
- (ii) FFE ortamı, numune hazırlama için orijinal numune matrisini tutan kaba doğrudan yerleştirilebilir.
- (iii) Analitlerin sıvı numuneye ve FFE ortamına difüzyonu sonikasyon, manyetik karıştırma ile artırılabilir.
- (iv) Geri ekstraksiyon için herhangi bir organik çözücü kullanılabilir.
- (v) Numune hazırlama adımlarının sayısını en aza indirir, böylece potansiyel hata kaynaklarını ve numune hazırlama maliyetini azaltır.
- (vi) Sol – jel kaplamada sorbentler kolaylıkla değiştirilebilir.
- (vii) Analit için son derece yüksek zenginleştirme faktörü gösterir; ve
- (viii) Sorbent fazının kimyasal olarak bağlanması, FFE ortamına yüksek kimyasal direnç sağlar (Ares-Fuentes vd.,2022).

Çok kısa bir süre içinde FFE; farmasötik, çevresel, gıda, biyolojik ve toksikolojik numuneler dahil olmak üzere çok çeşitli numune matrislerinde uygulama alanı buldu. Sol-jel kaplama teknolojisinin son derece gözenekli kumaş alt tabakaya benzersiz entegrasyonu, karmaşık çevresel numunelerden hedef analitleri yüksek verimlilikle çıkarabilen verimli bir numune hazırlama yöntemi ile sonuçlandı. Sol-jel ekstraksiyon sorbentleri ve konakçı substratlar arasındaki güçlü kimyasal bağ, FFE yöntemine mükemmel çözücü ve kimyasal stabilite sağlar. FFE ortamındaki yüksek sorbent yüklemesi, çok yüksek numune kapasitesi sağladı. Sol-jel sorbentin doğası gereği gözenekli yapısı ve kumaşın geçirgenliği, denge ekstraksiyon süresini önemli ölçüde saatlerden dakikalara düşürerek, FFE'yi sahada kullanılabilir mükemmel bir numune hazırlama tekniği haline getirmiştir. Ekstraksiyon öncesinde numune temizleme gerekliliğini ortadan kaldırdı (Zilfidou vd.,2018).

1.3. Kromatografik Ayırma Yöntemleri

Rus İtalyan botanikçi Mikhail Tsweet, filtre kağıdı ekstraksiyonu ile ilgili gözlemlerini 1890'larda petrol bileşenlerini ayırmak için geliştirilen yeni kolon fraksiyonlama metodlarına uygulamıştır ve iyi toz edilmiş bir absorban ile doldurulan kolondan bitki ekstratlarını organik çözücüler geçirildiğinde renkli halkaların kolonda sırayla ayrıldığını görmüştür. Yunanca da chroma kelimesi renk ve graphein kelimesi ise yazmak anlamına gelmektedir Bu nedenle yöntem kromatografi olarak adlandırılmıştır. (Brena vd., 1996). Kromatografinin üç temel bileşeni vardır bunlar; Sabit faz(durgun faz) : Bu faz her zaman “katı yada “katı bir desteğin yüzeyine adsorbe edilmiş bir sıvı tabakadan” meydana gelir. Hareketli faz(mobil faz) : Bu faz her zaman “sıvı” veya “gaz halindeki bileşenden” oluşur. Analit: Ayrılmış moleküllerden oluşur. Kromatografi, moleküllerin çeşitli özelliklerine bağlı olarak sabit faz ve hareketli faz arasında dağılarak birbirinden ayrılması prensibine dayanır. Kromatografide sabit faz olarak katı faz yada katı fazın yüzeyine kaplanmış sıvı faz kullanılır. Bileşenlerin ayrılmasında etkili olan faktörler arasında sabit veya hareketli faza olan ilgisi, polaritesi veya çözünürlük oranları yer almaktadır. Adsorpsiyon (tutunma) ve partiyon (dağılma) sabit faz türüne göre iki farklı yöntemdir ve moleküllerin polarlığı yada çözünürlük farklılıklardan dolayı karışımındaki yer alan bileşenlerin bir kısmı sabit fazda daha uzun süre kalarak kromatografi sisteminde yavaş hareket eder ve kolondan geç ayrılır bazıları ise hızlı bir şekilde mobil faza geçerek kolonu daha çabuk terk eder.

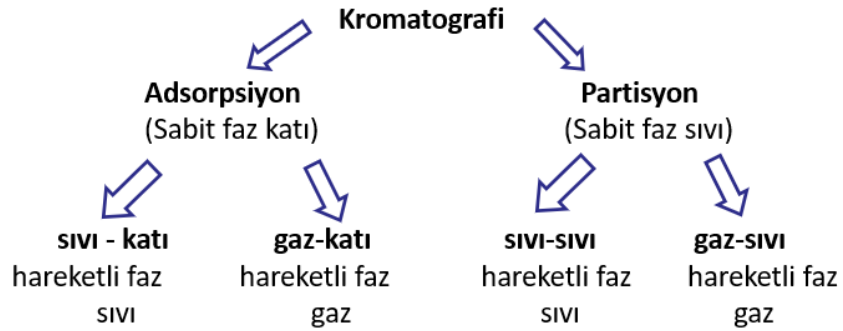
Bazı kromatografi türleri ;

- Kolon kromatografisi

- İyon deęiřtirme kromatografisi
- Jel geçirgenliği (moleküler eleme) kromatografisi
- Afinite kromatografisi
- Kağıt kromatografisi
- İnce tabaka kromatografisi
- Gaz kromatografisi
- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YPSK) (Stock ve Rice, 2013).

1.3.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografide ayırma yönteminin farklı özelliklerine göre birçok sınıflandırma şekli vardır. Kromatografi kullanılan sabit fazın türüne göre katı ise adsorpsiyon kromatografi ve sabit faz sıvı ise partisyon (dağılma) kromatografi olarak iki grup altında toplanabilir. Adsorpsiyon kromatografisinde adsorbana tutunma glerinde farklılıklar, partisyonda ise birbirine karışmayan iki farklı sıvının dağılmalarının farklılığı sayesinde birbirlerinden ayrılırlar.



şekil 1. 14. Sabit fazın türüne göre kromatografinin sınıflandırılması

Bu özelliklere göre de kromatografik yöntemler;

- Ayrılma Mekanizmaları,
- Uygulama Biçimi,
- Sabit faz Tipine göre farklı guplarda toplanırlar.

Çizelge 1. 4. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırması

Ayrılma Mekanizmalarına Göre	Uygulama Biçimine Göre	Faz Tiplerine Göre
Adsorpsiyon kromatografisi	Düzlemsel kromatografi ❖ Kağıt kromatografi ❖ İnce tabaka kromatografisi (İTK)	Sıvı kromatografisi ❖ Sıvı-Katı kromatografisi ❖ Sıvı-Sıvı kromatografisi
Dağılma kromatografisi	Kolon kromatografisi ❖ Gaz kromatografisi (GC) ❖ Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YPSK)	Gaz kromatografisi ❖ Gaz-Katı kromatografisi ❖ Gaz-Sıvı kromatografisi
İyon değişirme kromatografisi		Süperkritik akışkan kromatografisi
Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi		
İyon çifti kromatografisi		

Mobil faz sıvı ise sıvı kromatografisi (LC), gaz ise gaz kromatografisi (GC) olarak adlandırılır mobil faz süperkritik akışkan kullanılırsa Süperkritik akışkan kromatografisi adını alır (Coskun, 2016). Bu tez çalışmasında da kullanılan ve genellikle avantajlarından dolayı çok tercih edilen YPSK yöntemidir.

1.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK), biyoteknoloji ve farmasötik endüstri alanında analitlerin teşhis edilmesi, karakterize edilmesi ve saflaştırılması için kullanılan önemli yöntemlerin başında gelmektedir. Bu metod farklı alıkonma zamanlarına sahip çözünür moleküllerin kromatografik kolondan yüksek basınç altında bir hareketli faz ile sürüklenerek

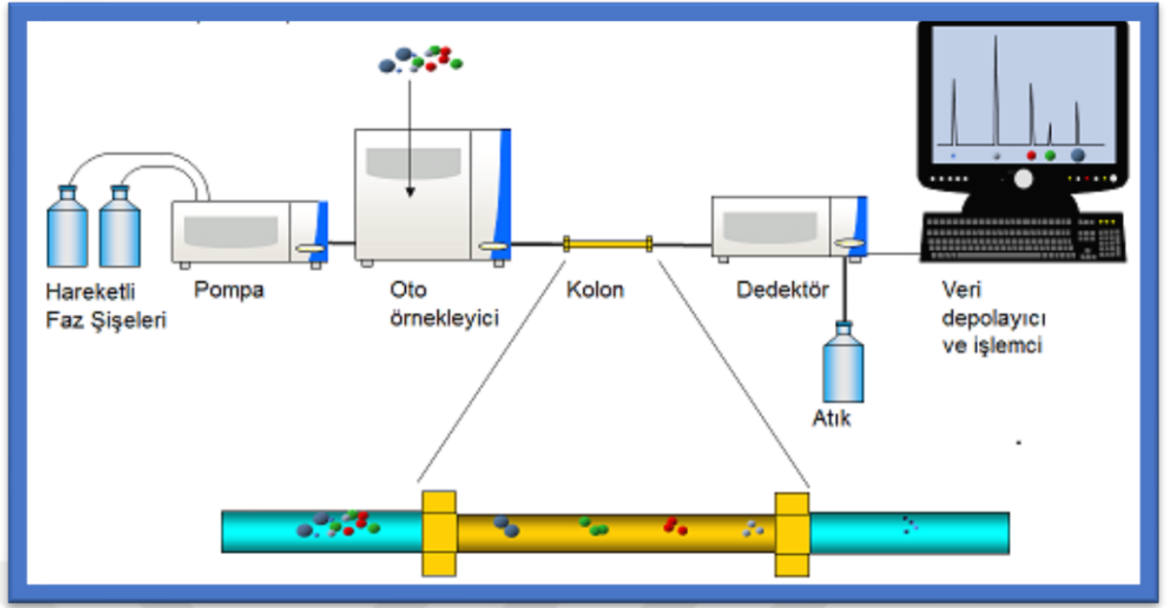
ayrılmasını ve teşhis edilmesini sağlamaktadır. YPSK'nin avantajları arasında; uzun kolon kullanımı, yüksek kesinlik, hassasiyet, hızlı ve otomasyonun kolaylığı, uçucu olmayan yada sıcaklıkla hemen bozunabilen türlerin ayrılmasına uygunluğu bulunmaktadır. YPSK tekniği sayesinde birçok molekülün yapısal ve fonksiyonel analizini yapmak ve saflaştırmak kısa zaman içinde mümkün olur. Bu teknik karbonhidratların, steroidlerin, lipidlerin, amino asitlerin, nükleik asitlerin, proteinlerin, antibiyotiklerin ve diğer moleküllerin ayrılması ve tanımlanmasında çok iyi sonuçlar verir (Konaç, 2017). YPSK özellikle son yıllarda ve uzun yıllar boyunca da en çok olarak kullanılan analitik cihazlardan bir tanesidir. YPSK'de analiz edilmek üzere hazırlanan karışımdaki bileşenlerin ayrılmasında sıvı mobil faz ve sabit faz kullanılır. Çözelti ortamında yer alan bileşenler ilk olarak bir solventte çözülürler ve daha sonra yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanırlar. Kolon sabit faz olarak kullanılır Oktadesil (C18), silikajel sabit faza örnektir. Mobil fazın polaritesine göre kromatografi yöntemi iki tiptir; Mobil faz polar ve kolon tipi apolar kullanıldıysa ise **ters faz kromatografi** adını alır ve çok sık kullanılan türüdür. Mobil faz apolar ve kolon türü polar ise **normal faz kromatografi** denir. Ters faz kromatografi yönteminde polaritesi yüksek olan düşük olanlara göre kolondan önce çıkar ve hareketli fazın polaritesindeki artış olursa çıkış zamanı azalır. Polar hareketli fazın daha az polar çözücülerle değiştirilmesi hareketli faza olan ilgiyi azaltır ve maddeler kolonda daha çok tutulurlar (Eser ve Sepici Dinçel, 2018).

1.3.2.1. YPSK Yapısı ve Kısımları

Modern YPSK'de 3–10 µm'lik dolgu parçacıklarıyla iyi akış hızlarına ulaşmak için birkaç yüz atmlik pompalama basıncı lazımdır. Bu yüksek basınçlardan dolayı YPSK özel bir donanım ve karmaşık bir sistem gerektirir.

Tipik bir YPSK, Şekil 1.14'den görüldüğü gibi temel olarak

- ✓ Çözücü (Hareketli Faz) Hazneleri
- ✓ Pompalama Sistemi
- ✓ Kolon
- ✓ Örnekleyici
- ✓ Kolon Fırını
- ✓ Dedektörden oluşmaktadır.



Şekil 1. 15. YPSK cihazı kısımları (Okan Ongan, 2015)

Çözücü (Hareketli Faz) Haznesi

Hareketli fazın konulduğu kısım bir sıvı kromatografi cihazında tipik olarak genellikle silindirik şişelerdir. Hazne, pompaya olan bağlantısı hareketli fazla reaksiyona girmeyecek veya onu kirletmeyecek malzemelerden yapılmalıdır: Teflon, cam veya paslanmaz çelik gibi malzemelerdir. En çok cam şişeler kullanılır ve ölçeklidir. Mobil fazın kirlenmesini önlemek için mobil faz şişelerinde bir kapak bulunmalıdır. Kapaklarda havanın rezervuara girmesine izin veren başka bir delik bulunur aksi takdirde hareketli fazın pompa tarafından çıkarılmasında vakum oluşacaktır.

Çözeltide yer alan çözünmüş gazlar veya parçacıklar akış hızlarını değiştirip dedektör performansını etkileyebilmektedir. Çözünmüş gazları gidermek için vakum pompası, damıtma, ısıtma veya inert gaz kabarcıkları üfleyici kullanabilmektedir. Filtreleme sistemleri pompaya gelebilecek olan genellikle toz ve tanecikli maddelerin enjeksiyon sistemlerine zarar vermesini ve kolonu tıkamasını engellemek için kullanılmaktadır. Bunlar sistemin ana parçası değildir, fakat kullanılması cihaz için yararlıdır (Dong, 2006).

Pompalama Sistemleri

Sistemde numune ve mobil fazın enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışını ve hareketli sıvının sistem içerisinde dolaşmasını sağlayan kısımdır.

Bir YPSK pompası için ;

- Kullanılacak çözücülere karşı inert malzemelerden imal edilmeli,
- Yüksek akış hızları sağlayabilmeli (10 mL/dak'ya kadar),
- Hassas ve doğru akış olmalı (<%0,5 varyasyon),
- Yüksek basınç sağlamalı (400 atm'ye kadar),
- Darbesiz (puls içermeyen) akış sağlamalıdır.

Numune Enjeksiyon Sistemleri

YPSK yönteminde kesinlik parametresini belirleyen en önemli faktör numunenin kolona verilmesinin tekrarlanabilir olmasıdır. Numune enjeksiyon sistemleri manuel ve otomatik örnekleyiciler olarak ikiye ayrılırlar. Manuel örnekleyici sistemler uzun zaman aldığı için ve tekrarlanabilirliği az olduğundan dolayı daha az tercih edilir. Oto örnekleyiciler sayesinde ise tekrarlanabilirliği daha yüksek olan pratik numune enjeksiyon sistemi sağlanmıştır. Bu sistemin diğer bir avantajı kısa sürede birden fazla örneğin çalışılabilmesi, kişisel hataların azaltılması ve bilgisayar kontrollü olduğundan örnekleme sırasının kontrol edilebilmesidir. Günümüzde birden fazla örneği sırayla yerleştirilebilecek yeni otosampler sistemleri kullanımı artmaktadır (Moldoveanu ve David, 2022a).

YPSK Kolonları

Kolonlar; sabit fazdır. Sıvı kromatografide düzgün iç çaplı ve paslanmaz çelikten oluşan kolonlar kullanılır. Genellikle çoğu 10-30 cm uzunluğundadır ve iç çapları 4-10 mm kalınlığında olan kolonlar kullanılır. Kolonlarda yer alan dolgu malzemeleri silis, alumina ve reçine gibi mikrotaneciklerdir. Analitik kolondan önce bir emniyet kolonu denilen koruma kolonu kullanılır. Bu kolonun kullanılma amaçları ;

- Solventlerden sadece partikül madde ve kirleticileri uzaklaştırarak analitik kolonun ömrünü uzatmak,
- Hareketli fazı sabit faz ile doyurmak, böylece çözücünün analitik kolondan kayıpları en aza indirmek,
- Kirlendiğinde yeniden değiştirilebildiği için, daha pahalı olan analitik kolonları korumaktır.

Analitik kolonların kullanılan malzemelerin polaritesine göre sınıflandırılması tabloda verilmiştir. Kullanılan kolonun tipine göre maddelerin kolondan ayrılma zamanı değişiklik gösterir bu da analizler için çok önemlidir.

Sabit fazın polaritesine bağlı olarak normal ve ters faz kromatografisi olarak ayrılır. Ters faz kromatografide sabit fazın polaritesi yüksek (hidrofilik) iken normal faz kromatografisinde sabit fazın polaritesi düşük (hidrofobik) olur ve bileşenlerin ayrımı sabit faza ilgisine göre gerçekleşir. Ters faz (RP-YPSK) ayırma kolonlarına örnek olarak sabit faz türleri ; Oktadesil (C18) gruba bağlı silika jel (ODS) dir. RP-YPSK yönteminde hidrofobik maddeler (yani, düşük polariteye sahip maddeler) sabit faz tarafından tutulur ve böylece diğerlerine nispetle alıkonma süreleri daha uzundur. Günümüzde analizlerde en çok tercih edilen sabit fazın polaritesinin yüksek olan RP-YPSK'dir. C18 ve C8 en çok kullanılanlar arasındadır. Bu kolonlar ayırma gücü yüksek ve mekanik dayanıklılık sağlamaktadır. Normal faz analitik kolonlarında sabit faz olarak ; Silika jel: -Si-OH kullanılır. Bu kolonda hidrofilik maddeler (yani daha yüksek polariteye sahip maddeler) sabit faz tarafından güçlü bir şekilde tutulur ve böylece nispeten uzun alıkonma sürelerine sahiptir. Modern LC yada YPSK cihazlarda sıcaklık ayarının yapan termostat sistemleri veya kolon sıcaklığının sabit tutulmasını sağlayan kolon fırını vardır (Moldoveanu ve David, 2022b).

Dedektör

Dedektör, fiziksel veya kimyasal bir özelliği konsantrasyona karşılık gelen ölçülebilir bir sinyale dönüştürmekten sorumlu bileşendir. Dedektörden geçen maddeler bir kaydedici sayesinde kaydedilir. İdeal bir dedektör için istenen özellikler;

- Yüksek hassasiyet ve tekrarlanabilirlik,
- Tüm çözünen maddelere yanıt verir veya çalışılan analite göre özgülük;
- Sıcaklık, mobil faz akışındaki değişikliklerden ve hareketli fazdan bağımsız olan cihaz yanıtı,
- Güvenli, kolay ve hızlı kullanım,
- Analizlenecek maddeyi tahrip etmemek,
- Nitel ve nicel anlamda kullanılabilimleri

Dedektörlerden hiçbirisi bu özelliklerin tümüne sahip olmadığından zamanla belirli bir zorluğa cevap vermek üzere çok sayıda dedektör tasarlandı, üretildi. Bunlar arasında kullanım

kolaylığı, öngörülebilirlik ve tekrarlanabilirlik en önemli ve en çok beklenen özelliklerindendir.

Yaygın kullanılan dedektörler;

- UV-Dedektör (DAD)
- Kütle Dedektörü (MS)
- Floresan Dedektör (FID)
- Elektrokimyasal
- Kırma indisi
- İletkenlik
- Fotoiyonlaşma
- FTIR

Bunların arasından en sık kullanılan ise UV-Dedektör ve Kütle Dedektörleridir. Bu çalışmada UV-DAD Dedektör kullanılmıştır (Swartz, 2010).

UV(DAD) Dedektörleri

Günümüzde kullanılan en yaygın YPSK dedektörüdür çünkü ölçülen birçok bileşik UV ışığı absorbe edebilen kromofor gruplara sahiptirler. Bu dalga boylarında olefinler, aromatik bileşikler ve çift veya üçlü bağ içeren moleküller gibi pek çok tür absorpsiyon bantlarına sahiptir. Bazı organik çözücüler UV ışığını absorbe ettiğinden, algılama aralığında absorbe etmeyen çözücülerin kullanılmasına dikkat edilmelidir. Bununla birlikte LC'de kullanılan su ve asetonitril gibi birçok çözücü UV ışığı için geçirgendir (Konanç, 2017). Üç farklı tipte UV dedektörü vardır. Farklı dalga boylarına dayanan sabit dalga boyu dedektörleri, değişken dalga boyu dedektörleri ve geniş spektrumlu bir lambadan üretilen bir veya daha fazla dalga boyuna dayanan fotodiyot dizi dedektörleri. İlk YPSK sistemlerinde kullanılan sabit dalga boyu dedektörler ucuz ve basittir, ancak günümüzde sınırlı kullanımdadır. Günümüzde en yaygın olarak birçok değişken dalga boyu ve fotodiyot dizili dedektör kullanılmaktadır. Diyot dizi dedektöründe numune, lamba tarafından üretilen tüm dalga boylarındaki ışığa aynı anda maruz bırakılır. Emisyon kaynağından gelen ışıklar kromatik bir mercekle sistemi ile toplam ışık dedektör hücresinden holografik bir ızgaraya geçer ve daha sonra 100'lerce diyot içeren bir diyot dizisine düşer. Kromatogram, çalışmanın sonunda söz konusu diyot üzerine düşen UV

dalga boyu kullanılarak alınır. DAD, analitin farklı dalga boylarındaki tepkisini tek bir çalışmada görmeye yardımcı olur ve böylece zaman ve enerji tasarrufu sağlar. Bu dedektörün çalışma programı; fotonlarla belli bir elektrik alan etkisinde elektrotlarda toplanmasına ilkesini kapsar. Fenolik bileşikler, antibiyotikler, pesitisit gibi pek çok kimyasal maddelerle yapılan çalışmalar için UV veya DAD dedektör kullanılabilir (Dinç ve Şenol, 1998; Stevenson, 2020).

Gerçekleştirilen tez çalışmasının temel amacı yaygın olarak kullanılan ve birlikte reçete edilebilen sülfonilüre grubu oral antidiyabetik ilaç olan GLP ve statin grubundan antihiperlipidemik PST ilaç etkin maddelerinin düşük derişimlerdeki miktarlarını analiz edebilmek için; bu maddelerin sentetik idrar ve tükürük örneklerinden ve bulundukları farmasötik preparatlarından seçici olarak MKFE ve FFE teknikleri yardımıyla ekstrakte edildikten sonra sentezlenen katı faz maddelerinin karakterizasyonlarını FTIR, SEM, XRD ve Raman yöntemleri ile yapmak ve ekstraksiyon adımında pH, solvent seçimi ve hacmi, adsorpsiyon ve desorpsiyon süresini belirlemek üzere gerekli optimizasyon parametrelerini çalışmak sonrasında eş anlı miktar tayinlerinin yapılabilmesi için bir YPSK yönteminin geliştirilmesine dayanmaktadır. Ekstraksiyon yöntemlerinde manyetik katı faz ekstraksiyon destek maddesi olarak $Fe_3O_4@$ -Melanin ilk defa bu çalışma için sentezlenmiş ve kullanılmıştır. Fabrik katı faz destek maddesi olarak Sol-gel Ti-PTHF fabrik faz denen kumaş adsorban madde ise hedef analitler için ilk defa kullanılmıştır. Bu kullanılan katı fazların seçici olarak bu çalışmada kullanılarak özgünlük sağlaması amaçlanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları sayesinde sentezlenen maddelerin yapısı aydınlatılmış böylece hedeflenen yapıya ulaşıldığını ispatlanmış olur. Geliştirilen YPSK metodunu hedef analitlerin eş anlı tayinlerini sağlamak ve kabul edilebilir analitik performans parametrelerine ulaşıldığını göstermek amacıyla metodun validasyon çalışmaları yapılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Çözeltiler ve Cihazlar

Deneylerde kullanılan ve hazırlanan çözeltiler analitik saflıktadır. Hazırlanan tüm çözeltiler MP Minipure Dest Up cihazından elde edilen ultra saf su ile hazırlanmıştır.

2.1.1. Hazırlanan Çözeltiler

pH 2.0-12.0 Britton Robinson (BR) tampon Çözeltisi : 2.47 g H_3BO_3 (Merck), 0.02 M 2.67 mL H_3PO_4 (Merck) ve 0.02 M 2.32 mL CH_3COOH (Merck) asitlerini içeren stok BR çözeltileri hazırlandı. Uygun pH aralıklarında istenen tampon çözeltilerin hazırlanması için bir Mettler Toledo markalı pH metre yardımıyla kontrol edilerek 0.1 M NaOH eklenerek istenilen pH'a göre ayarlandı. Ardından ışıktan ve ısıdan korunarak uygun koşullarda saklandı.

Glipizid ve Pravastatin Na çalışma çözeltileri, 50 ppm: Analitik saflıkta hazırlanmış olan 1000 ppm'lik etken maddelerin ana stok çözeltilerden yararlanılarak sırasıyla 5.0 mL GLP (Merck) ve 5.0 mL PST (Deva Holding) çözeltileri mikropipet yardımıyla ölçülü balon şişeye aktarıldı bir miktar metanol ile çözülüp 100.0 mL'ye tamamlandı. Karışım çözeltisi amber renkli cam şişeye aktarılarak $+4^{\circ}C$ 'de buzdolabında saklandı.

2.1.2. YPSK Cihazı İçin Kullanılan Çözeltiler

Asetonitril Çözeltisi (ACN) : %99'luk YPSK saflıkta ACN (Merck) çözeltisi kullanılır.

Fosfat Tamponu : 0,02 M KH_2PO_4 (Merck) katısından hazırlanır ve pH:3'e ayarlanır.

Metanol (MeOH) : YPSK saflıkta MeOH (Merck) çözeltisi kullanılır.

2.1.3. Manyetik ve Fabrik Faz Sentezinde Kullanılan Reaktifler

- **$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi :** Molar kütlesi: 278.01 g/mol olan $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ katıdan (Sigma Aldrich) 9.72 gr tartılır ve %50 MeOH ile çözülür.
- **$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ çözeltisi :** Molar kütlesi : 270.33 g/mol olan katıdan 3.10 gr $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ (Sigma Aldrich) tartılır ve %50 MeOH ile çözülür

- **1 M HCl çözeltisi:** Derişik % 37 lik HCl (Merck) çözeltisinden 3.2 ml alınıp balon joje içerisine aktararak hacmi 100’ml ye tamamlanmıştır.
- **% 50 (v:v) MeOH çözeltisi:** Bir mezür yardımıyla 50 ml Metanol (Sigma Aldrich) ile 50 ml saf su karıştırılarak hazırlanmıştır.
- **Derişik Amonyak (NH₃) çözeltisi :** % 28-30 saflıkta Amonyum hidroksit çözeltisi (Merck)
- **TEOS (Tetraetil Ortosilikat) çözeltisi :** (Sigma-Aldrich) %99,9 saflıkta çözelti silanlama ajanı olarak kullanılır.
- **Melamin katısı :** Molekül kütlesi : 318.3 g/mol olan Melamin (Sigma Aldrich) katısından 0,5 g tartılıp 100 mL % 50 Metanolde çözülür.

2.1.4. Kullanılan Cihazlar

Shimadzu (Prominence) YPSK (Kyoto, Japan) cihazı ile tüm ölçümler alındı.

Kullanılan YPSK cihazı;

- LC 20 AD kuaterner pompa,
- SPD-M20 A PDA dedektör,
- DGU-20A vakum gaz giderici ünitesi,
- CTO-10 AS VP kolon fırını donanımlarına sahiptir.

Kullanılan Karakterizasyon Cihazları ;

- FTIR (Perkin-Elmer, USA) : Fourier Dönüşümlü-Infrared Spektroskopisi
- XRD (Bruker AXS D8) : X-Işını Kırınımı Analizi
- TEM (Gemini 550) : Taramalı Elektron Mikroskobu
- Raman (WITec Alpha 300) ‘dır.

Kolon olarak Fenil heksil kolon, C18 (Phenomex) ile yöntemler denendi. Tüm ayırma ve tayinler ters faz C18 kolonu (Inertsil ODS-3, 250 mm×4.6 mm,5µm) üzerinde yapıldı.

- pH metre (Mettler Toledo, Leicester UK) S220-K Masa üstü pH : Tampon çözeltilerin pH’ını ölçmeye yarar.
- Manyetik ısıtıcı karıştırıcı : Çözelti hazırlanırken hem karıştırmak hem de ısıtmak için kullanılır.

- Rotatör (Fisherbrand) : Ekstraksiyon sırasında karıştırma amacıyla kullanılır.
- Vortex (Jeotech, Korea) : Ekstraksiyon sırasında titreşim yoluyla karıştırma amacıyla kullanılır.
- Ultrasonic Su banyosu :Tüm hazırlanan çözeltilerin titreşim ve sıcaklık ayarı sayesinde çözünmeyi hızlandırır.

2.2. Glipizid ve Pravastatin Sodyum Çözeltileri İçin Doğrudan YPSK Tayin Yöntemi Geliştirilmesi

Deneyisel çalışmaların ilk adımı hedef ilaç moleküllerini aynı anda tayin edebilecek bir analitik yöntemin geliştirilmesidir. Çünkü tez kapsamında uygulanacak olan MKFE ve FKFE yöntemleri sonrasında analizler YPSK-DAD sisteminde yapılacağından ve daha önce literatürde hedef analitleri analiz edecek bir yöntem olmadığından öncelikle bu yöntemin geliştirilmesi ve validasyonun yapılması gerekir. GLP ve PST etken maddelerinin aynı anda YPSK cihazı ile doğrudan analiz edebilmek için literatür bilgileri ışığında pek çok farklı yürütücü faz bileşimi ve kolonlarla denemeler yapıldı. Bu çalışmalar sırasında her iki etken madde pikinin de en iyi şartlarda ayrıldığı sabit fazın 250 mm'lik İnertsil C-18 kolonu bulunmuştur. İdeal mobil faz bileşimlerini belirlemek için organik mobil fazların istenen pH'a göre tampon çözeltileri hazırlandı ve hareketli faz bileşimleri en doğru sonuç için izokritik ve gradient elüsyon modlarında yani farklı oranlarda solventlerden alınarak birçok denemeler yapıldı.

2.3. Geliştirilen Yöntemin Sistem Uygunluk Testi (SUT)

SUT parametreleri sayesinde kromatografik çalışmalarda kolon performansının optimizasyonu sağlanır.Bu tez çalışmasında hesaplanan parametreler : Teorik tabaka sayısı, Kapasite faktörü, Asimetri faktörü, Ayırma gücüdür.

2.3.1. Teorik tabaka sayısı (N)

Piklerin keskinliğini ve kolonun verimini belirler.ayrımın meydana geldiği en küçük tabakadır. Tabaka sayısı arttıkça ayırım daha iyi olur ve kolon verimi artar. Bu değer en az 2000 olması istenir.

$$N = 16x \left[\frac{t_R}{w} \right]^2$$

t_R : Alıkonma zamanı (dk)

w: Pik tabanı genişliği (cm)

2.3.2.Kapasite faktörü (k)

Alıkonma faktörü; boşluğun hacmine, yani net alıkonma sürelerinin, tutunmayan (alıkonmayan) bileşenin elüsyon süresine göre oranını gösteren bir ölçümdür.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Genellikle k' değerinin 2-8 arasında olması gerekir.

2.3.3.Kolon ayırma gücü (R_s)

İki pikin ne kadar iyi ayrıldığıнын bir ölçüsüdür. R_s değerinin >2 olması iyi bir ayırım için istenir.

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

2.3.1.4. Asimetri faktörü (A_s)

Pik taban yüksekliğinin %10 unu ifade eder. 0.95 ile 1.2 arası olması beklenir (Ertaş vd.2018).

2.4. Geliştirilen YPSK Metodunun Validasyonu

Yeni geliştirilen bir analitik metodun validasyon çalışmalarının yapılması hataların giderilmesi veya hataların kabul edilebilir düzeye inmesi açısından çok önemlidir ve yöntemin güvenilirliğini test etmek için yapılması gerekmektedir. Uluslararası kabul gören çeşitli geçerlilik kriterleri mevcuttur. Bu tez çalışması için yapılan validasyon parametreleri : Doğrusallık, Seçicilik, Doğruluk, Kesinlik, Gözlenebilme Sınırı (GS) ve Tayin Sınırı(TS), Sağlıklik ICH kılavuzuna göre uygulanmış ve gerekli veriler hesaplanarak Bulgular bölümünde sunulmuştur.

2.4.1. Özgünlük

Özgünlük, çözelti içinde olabilecek diğer bileşenlerin varlığında analiti kesin olarak değerlendirmektir. Bunlar safsızlıklar veya bozunma ürünleri olabilir. Safsızlık tayininde seçicilik, etken maddeyi veya analiti uygun safsızlık seviyesinde ekleyerek, bu safsızlıkları ayrı ayrı veya numune içerisinde ayrıldığını göstererek sağlanabilmektedir. Pik saflık testleri, analit pikinin tek bileşene ait olduğunu göstermek için yararlı olabilir (ICH, 2014). Bu tez çalışmasında özgünlük için hedef antidiyabetik ajan olan Glipizid molekülünden farklı bazı antidiyabetik maddeler PST ve GLP içeren standart 10 ppm derişimindeki çözeltiye bilinen miktarda eklenerek kromatogramları alınmıştır. Bu girişim çalışması sonucu hedef analitlerin bu piklerden ayrılıp tespit edilebildiği görülmüştür. Aynı zamanda uygulanan ekstraksiyon çalışmalarında bu etken maddeler tutunmamıştır.

2.4.2. Doğrusal Aralık

Doğrusallık belirli konsantrasyon aralığında analitten alınan sinyalin artan analitin derişimiyle orantılı olmasıdır. Bu parametre için hazırlanan standartlar doğrultusunda kalibrasyon grafiği elde edilir. Bu grafik sayesinde regresyon formülü ($y=ax+b$) ve Determinasyon Katsayısı (R^2) cihazdan bulunur (Paithankar, 2013). Determinasyon Katsayısı 1'e yakın olması beklenir; ne kadar yakın olursa doğrusallık o kadar iyi olur. Bu tez çalışmasında 5 adet artan konsantrasyonda GLP ve PST'karışımından oluşan kalibrasyon standartları hazırlandı bunlar; 1, 2, 5, 10, 20 ppm'dir. Bu standartlar YPSK koşullarında analiz edildi ve geliştirilen metod ile 3 tekrarlı okutuldu.

2.4.3. Gözlenebilme ve Tayin Sınırı (GS ve TS)

Gözlenebilme sınırı (GS) yani Limit of Detection (GS) değeri bir numunedeki tespit edilebilen fakat nicel kesin bir değer olarak belirlenemeyen en küçük analit miktarıdır. Bu değer genellikle linear aralığa girmez. Tayin sınırı (TS) olarak bilinen Limit of Quantification (TS) bir numunedeki uygun hassaslık ve doğrulukta nicel olarak belirlenebilen en düşük analit miktarıdır. GS aralığında bir analit içeren numuneler kullanılarak spesifik bir kalibrasyon eğrisi üzerinde çalışılmalıdır. Bir regresyon çizgisinin artık standart sapması veya regresyon çizgilerinin y kesim noktalarının standart sapması standart sapma olarak kullanılabilir (ICH, 2014; Zakeri Milani et al., 2014). GS ve TS için öncelikle rezidüel standart sapma (Sres) hesaplanır; kör numune temin edilemediğinde GS hesabı bu yolla yapılabilir.

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - Y_{est})^2}{n-2}}$$

Y_i: İlgili konsantrasyona karşı elde edilen değer

Y_{est}: İlgili konsantrasyona karşı lineer regresyon formülü kullanılarak elde edilen değeri,

n: Konsantrasyon sayısı

Hesaplanan rezidüel standart sapma ve regresyon analizi sonucu elde edilen eğim değeri kullanılarak GS ve TS hesaplanabilir.

$$LOD = 3x \frac{S_{res}}{b} \quad LOQ = 10x \frac{S_{res}}{b}$$

b: regresyon analizi sonucu elde edilen eğim değeri (y=a+bx) (Sanogi vd.,2009)

2.4.4. Doğruluk

Yeni geliştirilen bir metodun doğruluğu, elde edilen sonuçlarının gerçek değer olarak kabul gören değere olan yakınlığına denir. Gerçek kabul edilen değer farklı yollardan elde edilebilir. Bu yollardan biri; yeni geliştirilen yöntemin sonuçlarını, yerleşik yöntemlerden birinin sonuçları ile karşılaştırmayla bulunabilir. İkinci yol ise; doğruluğu kesin olarak bilinen konsantrasyonlara sahip bir örneğin analiziyle kontrolü sayesinde elde edilebilir. Doğruluk parametresi yönteme ait geri kazanım (%) değerleri ile ifade edilir ve sonuçların gerçekliği hakkında bilgi verir (Ertaş ve Kayalı, 2005). Metodun % geri kazanım değerleri aşağıda belirtilen formül sayesinde hesaplanmaktadır. Hesaplanan değerler Bulgular bölümünde verilmiştir.

$$Geri\ Kazanım\ (\%) = \frac{C1}{C2} \times 100$$

C1: Kalibrasyon eğrisinden bulunan konsantrasyon değerini (ng/mL),

C2:Bilinen konsantrasyon değeri (ng/mL) .

2.4.5. Kesinlik

Kesinlik ifadesi önemli validasyon parametrelerinden biridir ve ölçüm sonuçlarının birbirlerine olan yakınlığını ifade eder. Bu parametre tekrarlanabilirlik ve hesap edilen bağıl standart sapma (% BSS) ile belirlenir ve rastgele hataların dağılımını göstermektedir. 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 ve 20.0 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan standart GLP ve PST çözeltileri için kalibrasyon eğrisi denkleminde yararlanılarak miktarları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Bu 5 farklı konsantrasyona ait değerlerin ortalaması alınarak metodun % BSS (bağıl hata) değerleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır. Genelde % 10 altında olması beklenir (ICH, 2014).

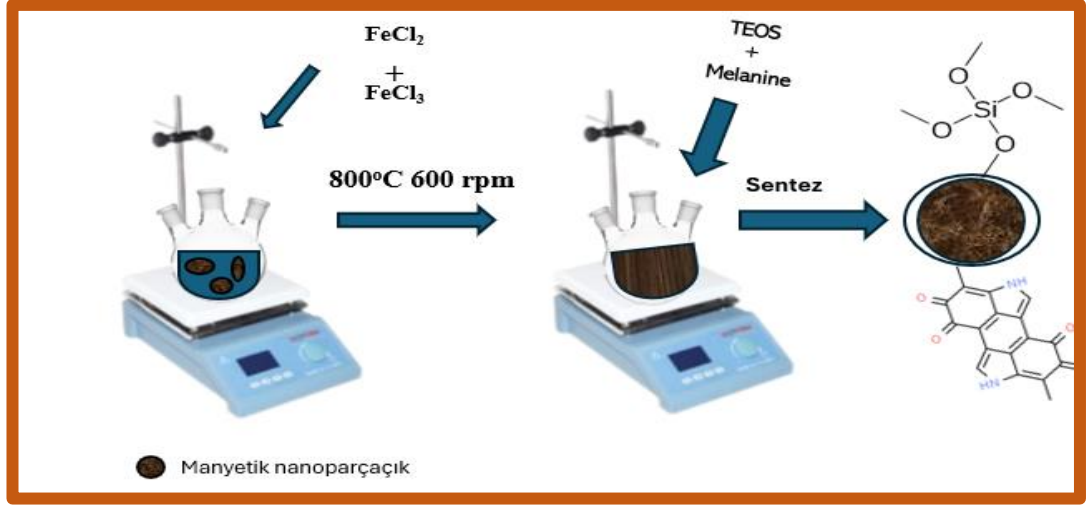
$$\% BSS = \frac{\text{Standart sapma}}{\text{Ortalama}} \times 100$$

2.4.6. Sağlamlık

Sağlamlığın değerlendirilme aşaması yöntem geliştirme sırasında yapılabilir ve çalışılan prosedürün türüne bağlıdır. Yöntem parametrelerindeki olabilecek değişimlere göre bir analizin güvenilirliği gösterilmesi gerekir. Yapılan ölçümler uygulanan koşullardaki değişikliklere duyarlıysa, analitik koşullar kontrol edilmeli veya bir önlem alınmalıdır (ICH, 2014). Sağlamlık parametresi için bu tez çalışması için çalışılan parametreler ; enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı ve mobil faz oranıdır.

2.5. Manyetik Katı Faz Destek Maddesinin Sentezi

İlk defa bu çalışmada kullanılmak üzere ve literatür taraması sonucunda analiz edilecek hedef moleküllere uygun (Fe₃O₄@TEOS-Melanin) manyetik katı faz sentezlenmiştir. Şekil 2.1 de şematik olarak gösterilen sentez prosedürü şöyledir ;



Şekil 2. 1. Manyetik katı faz sentez prosedürü

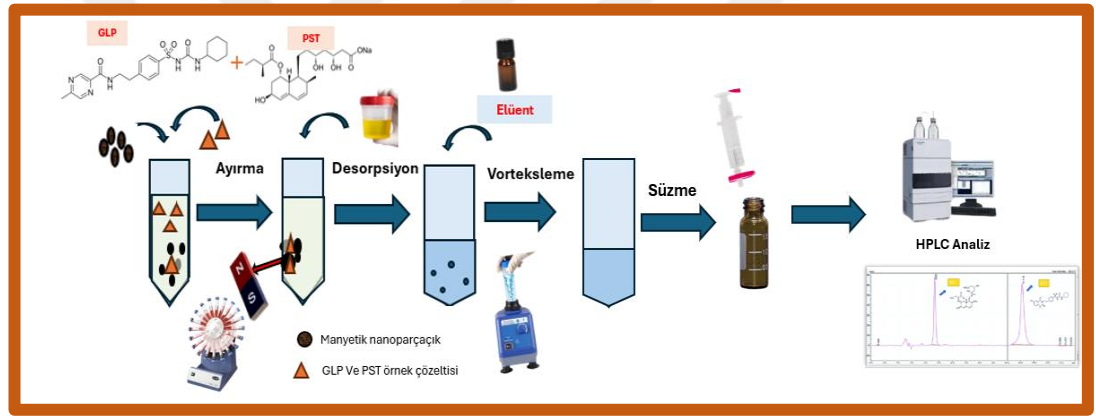
- 3.10 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ve 9.72 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ karışımı önce 50 mL 0.1 M HCl çözeltisi içerisinde çözülmüş ve 800°C 600 rpm hızla magnetik karıştırıcı ile karıştırken üzerine 50 metil alkol eklenmiştir.
- Sentez tepkimesinin gerçekleştiği baloba tüp yardımıyla azot gazı verilerek inert bir ortamda katı faz sentezi gerçekleştirilmiştir.
- Manyetik karıştırıcıda 600 rpmde karışmakta olan çözeltiye 200 mL 1.5 M NaOH ekleyip magnetit (Fe_3O_4) oluşması sağlanmıştır.
- Oluşan koyu siyah renkli çözeltinin içerisinde Fe_3O_4 taneleri uygulanan harici uygulanan bir mıknatıs yardımıyla toplanmış ve % 50'lik etil alkol ile yıkanarak 60°C deki etüv cihazında kurutulmuştur.
- Kurutulan manyetik malzeme havanda toz haline getirilip 2 gram tartılmıştır ve 50 ml %50 lik metil alkol çözeltisinde çözülüp ortama 2.5 mL kadar derişik amonyak eklenmiş ve 2 mL tetra etil orto silikat (TEOS) eklenerek magnetitin tanecik yüzeyleri kaplanmıştır.
- Çözeltiye 50 ml %50 MeOH/ACN karışım çözeltisi eklenmiştir.
- Silanlama işlemi tamamlandıktan sonra yine azot atmosferi ortamında 600 rpm de karışmakta olan taneciklerin üzerinde $45\text{-}50^\circ\text{C}$ sıcaklıktayken, 0.5 g Melamin 100 mL % 50 metil alkoldeki çözünüp bu çözelti manyetik karışıma eklenerek modifikasyon sağlanmıştır ve 4 saat karışmaya bırakılmıştır.
- Daha sonra 6 saat oda sıcaklığında bekletilip sonra yine MeOH/ H_2O karışımı ile birkaç kez yıkanıp yine etüvde kurumaya bırakılmıştır. Ekstraksiyonda kullanılmak üzere katı faz hazır hale gelmiştir.

2.5.1. Manyetik Katı Faz Destek Maddesinin Karakterizasyonu

Manyetik malzemelerin karakterizasyonu yani sentezlenen malzemenin doğruluğunu ispat etmek için bazı yöntemler kullanılmış ve sonuçları Bulgular bölümünde verilmiştir. Yapılan karakterizasyon yöntemleri ; FTIR, XRD, TEM, Raman Spektroskopisidir.

2.5.2. MKFE Yönteminin Prosedürü

Manyetik katı faz ekstraksiyonunun bu tez çalışması için genel prosedürü Şekil 2.2' de gösterilmektedir. Bu çalışma için sentezlenen manyetik katı faz destek maddesi kullanılarak yapılan deneysel basamaklarda pH, vorteks süresi, solvent çeşidi ve solvent miktarı gibi parametreler optimize edilmiştir ve bu koşullar altında hedef moleküllerin YPSK tayini yapılmıştır.



Şekil 2.2. MKFE yönteminin genel prosedürü

Manyetik katı faz destek maddesi deney adımları aşağıdaki gibidir ;

- 50 mg manyetik katı faz destek maddesi tartılır.
- 15 mL'lik falkon tüplere aktarılır. 2 mL saf su eklenir, üzerine 1 ml mikropipetle pH 2.0'ye ayarlanmış Britton Robinson(BR) tampon çözeltisi eklenir.
- Bu çözelti üzerine 10-750 ng.mL⁻¹ aralığında PST ve GLP hedef analitleri içeren örnek veya çalışma çözeltisinden 2 mL eklenip çözeltiden eklenir ve çözelti hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.
- Falkon tüpler rotatör cihazına yerleştirilir ve cihazda 50 rpm 40 dakikada çalkalanması sağlanır.
- Süre bittiğinde tüpler mıknatıs yardımıyla sulu fazlarından pipetle ayrılır.

- Tüpte kalan manyetik katı faz üzerine belirlenen 500 µL isopropil alkolden alınır ve tüpler optimum belirlenen 30 saniye sürede vortekslenmeye bırakılır.
- Bu işlem sayesinde manyetik katı maddeden analitin ayrılarak ve daha küçük hacimdeki solvent faza geçişi ile zenginleştirme hedeflenmiştir.
- Çözücü sıvı faz örnekleri enjektör içerisine mıknatıs tüpün kenarına tutularak alınır ve 0,45 µm'lik enjektör ucu filtreden süzülüp viallere aktarılır ve YPSK cihazına yerleştirilir.
- Bu şekilde ekstrakte edilen PST ve GLP içeren örnekler YPSK ile aynı zamanlı tayin edilebilmektedir.





Şekil 2. 3. Manyetik katı faz ekstraksiyonu deney basamakları

2.5.3. MKFE Yönteminin Optimizasyonu

MKFE temelli zenginleştirme ve ayırma yönteminde hedef önce analitlerin manyetik faza tutunmasını sağlamak sonrasında analitlerin tamamının çözücüye geçişini sağlamaktır. Böylece yüksek zenginleştirme sağlanır. Optimize koşulların sağlanması için literatür taraması sonucu parametreler belirlenmiş ve ön denemeler yapılmıştır. Hızlı ve kolay bir ayrılma gerçekleştirmek, düşük miktarda organik çözücü kullanımı sağlamak, daha yüksek zenginleştirme faktörü elde edebilmek için her bir optimizasyon basamağı çok önemlidir.

2.5.3.1. pH Etkisinin İncelenmesi

Ortam pH'ı değişimiyle birlikte sentezlenen manyetik katı fazın yüzeyi veya kullanılan analit molekülleri protonlanabilir. Bu, moleküllerin etkileşiminde ve katı fazın adsorpsiyonunda önemlidir. Bu yüzden optimizasyonda ilk belirlenmesi gereken faktördür. En uygun pH'ı bulmak amacıyla pH 2.0-10.0 arasında olan BR tamponları ayrı ayrı kullanılarak MKFE yöntemi uygulanmış ve elde edilen sonuçlar pik alanı cinsinden grafiğe geçirilmiştir.

2.5.3.2. Desorpsiyon Çözücüsü Seçimi

Katı faz yüzeyine adsorbe olan analitlerin manyetik katı destek maddesinden tam olarak ayrılabilmesi ve YPSK'de okunabilecek hale gelmesi için analiz öncesi uygun çözgenin belirlenmesi önemli bir parametredir. Kullanılan solvent ile birlikte katı fazdan tam ayrılma sağlanmalı, en ideal pikler elde edebilmeli ve hedef molekülleri katı faz yüzeyinden yüksek miktarda alınabilmelidir. Aynı zamanda kullanılan çözgenin toksisitesinin az olması ve yeşil kimyaya uygunluğu önemlidir. Bu amaçla MKFE yönteminde ilaç moleküllerini katı faz yüzeyinden desorbe edebilmek için metil alkol (MeOH), etil alkol (EtOH), acetonitril (ACN), izopropil Alkol (İPA), aseton, su, ACN:MeOH (1:1) ve pH 2 BR tamponu çözgen optimizasyonunda denenmiştir. Bu çalışmada her bir çözgenin 1.0 mL'si bağlanmış moleküllerin desorpsiyonu için katı faz yüzeyine uygulanmıştır.

2.5.3.3. Desorpsiyon Çözücüsü Hacmi Belirlenmesi

Desorpsiyon için ideal çözgen belirlendikten sonra, bu çözgenin miktarının da optimize edilmesi gerekir. Çünkü zenginleştirme basamağının son adımı olan bu işlem doğrudan zenginleştirme faktörünü tayin eder. Düşük hacimde çözgen (çoğunlukla 200 uL nin altı) ile

analit bileşenlerinin tam desorpsiyonu sağlanamaz ve viallere alınırken filtrasyon yapmak zorlaşır. Daha yüksek miktarda çözücüyle ise analit çözelti seyrelir ve zenginleştirme katsayısı düşer . Bu yüzden bu parametrenin optimizasyonu da oldukça önemlidir. Bu amaçla diğer bütün parametreler sabit tutulurken bir önceki basamakta belirlenen çözgen ile hacmi 200 µL ile 1250 µL arasında değişen bir seri denemeler yapılmıştır.

2.5.3.4. Adsorpsiyon (Çalkama) Süresinin Belirlenmesi

Hedef moleküllerin çözelti ortamından katı faz yüzeyine geçişi sırasındaki etkileşimleri artırmak için shaker, rotator gibi cihazlar kullanılmaktadır. Sabit çalkalama hızında bu etkileşim için ideal süreyi tespit etmek amacıyla yapılan optimizasyonda diğer bütün parametreler sabit tutulurken, adsorpsiyon süresi olarak örnekler 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakika çalkalanmaya bırakılmıştır. Laboratuvarımızda bu amaçla 50 rpm lik sabit hızda dönen rotatör cihazı kullanılmıştır.

2.5.3.5. Desorpsiyon Süresinin Belirlenmesi

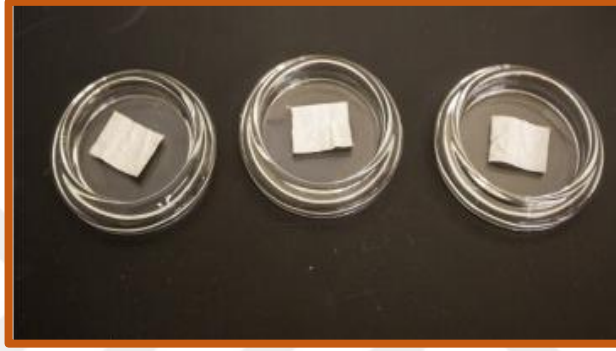
MKFE yöntemin ilk basamağında katı faz yüzeyine tutunan hedef moleküllerin ikinci basamakta faz yüzeyinden desorpsiyonunu hızlandırmak için vorteks cihazı kullanılmıştır. Desorpsiyon süresinin optimizasyonu için deneyler 0 ile 120 saniye aralığında olacak şekilde bir seri çalışılmıştır.

2.5.4. Manyetik Katı Fazın Yeniden Kullanılabilirlik ve Çözgenlerin Desorplanma (Sıyırma) Veriminin İncelenmesi

Geliştirilen MKFE son basamağında katı faz yüzeyine bağlanan türler optimizasyon adımı bulunan çözücü ile sıyrılarak desorbe edilir. Desorplanma işleminin ne kadar başarılı olduğunu yani bağlanan moleküllerin ne kadarının sıyrıldığını göstermek üzere bu deney yapılmıştır. GLP ve PST hedef moleküllerini 500 ng.mL⁻¹ içeren model çözeltilerle 5 ‘er tekrarlı yapılan deneylerde 3 kez art arda 500 µL sıyırma çözücüsü ile desorbe edilmiştir ve üç basamakta toplam sıyırma ile ayrılan bileşenlerin toplam pik alanları yüzde yüz kabul edilerek, her basamağın yüzdesi hesaplanmıştır.

2.6. Fabrik Faz Destek Maddesinin Hazırlanması

100 cm²'lik selüloz yapıdaki 15 dakika boyunca ultrasonik su banyosunda bekletilir sonra distile suyla yıkanır. Üzerine 1 M sodyum hidroksit eklenip 60 dakika boyunca ultrasonik su banyosunda tutulur. Birkaç kez daha distile su ile yıkandıktan sonra 0,1 M hidroklorik asit ortamında bir saat daha ultrasonik su banyosunda ve inert atmosferde bir gece bekletilir ve sonrasında kaplama işlemi yapılır.



Şekil 2. 4. Fabrik fazın görüntüleri

Yıkama bittikten sonra fabrik fazın yüzey kaplaması için; 5 g polietilen glikol polimeri, 5 mL sol-jel metiltrimetoksisilan(MTMS), 10 mL metilen klorür: aseton (50/50 v:v) ve 2 mL trifloroasetik asit üzerine eklenir. Karışım 5 dk vortekslenmiş ve 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra fabrik madde inert ortamda kurutulur. Fabrik faz 1 cm²'lik eşit parçalar halinde kesilip deneysel çalışmalarda bu haliyle kullanılmıştır (Kumar vd., 2014).

Sol-jel sorbent kaplı Fabrik faz membranının hazırlanması için Fabrik faz alt tabakasının seçimi ve ön işlemi gerçekleştirilir. İşlem görmüş fabrik faz substratı üzerinde sol-jel sorbent kaplama oluşturmak için sol-jel solüsyonu hazırlanır ve sol-jel sorbent kaplama işlemi yukarıda anlatıldığı gibi yapılır. Sol-jel sorbent kaplı fabrik faz sıcaklık koşulları ve temizlenmesi sağlanır ve numune hacmine göre FFE membranı uygun boyutta (1 cm²) kesilir.

2.6.1. Hazırlanan Fabrik Faz Destek Maddesinin Karakterizasyonu

Sol-jel Titanium-PTHF Kaplı FFE Membran, kaplanmamış %100 selüloz pamuklu kumaş ve sol çözeltisinin ana yapısını, yapının fonksiyonel bileşimini ve sol-jel Ti-PTHF sorbent kaplamasına entegrasyonunu ve sol-jel sorbent kaplamasından önce ve sonra FFE membranının yüzey morfolojisini anlamak için sırasıyla TEM ve FTIR yöntemleri kullanılmıştır.

2.6.2. Geliştirilen FFE Yönteminin Temel Basamakları

2.6.2.1. Fabrik Faz Yıkama Adımı



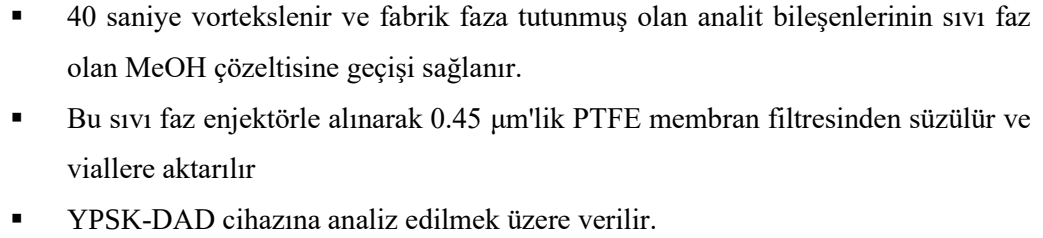
Şekil 2. 5. Fabrik faz yıkama adımı

15 mL'lik falkon tüplerine önce sırasıyla öncelikle 50:50 distile su/ACN-MeOH çözeltisi, sonra distile suda yıkama işlemi yapılan 1 cm² ' lik Titania PTHF (Politetrahidrofuran) adlı kumaş fabrik fazlar eklenir. Her ekstraksiyon adımından önce Şekil 2.6'de bu yıkama işlemi yapılır.

Fabrik faz ekstraksiyonu (FFE) için deney basamakları Şekil 2.7'de verilmiştir ve adımlar aşağıdaki gibidir ;

- 50 mL' lik falkon tüplere 1 cm²'lik titania PTHF fabrik fazı eklenir. Üzerine sırasıyla 2 mL distile su ve 1 mL pH:4 BR tamponu ilave edilir
- 15-1000 ng mL⁻¹ aralığında PST ve GLP içeren model çözelti eklenir. Hacmi distile su ile 10 mL'ye tamamlanır
- Falkon tüplerin kapağı sıkıca kapatılarak 50 rpm'de 30 dakika rotatörde çalkalanmaya bırakılır

Tüpte bulunan fabrik faz üzerine 500 μ L MeOH (Metanol) çözeltisi eklenir.

[illegible]

2.6.3. FFE Yönteminin Optimizasyonu

FFE temelli zenginleştirme ve ayırma yönteminde hedef önce analitlerin fabrik faz parçasının yüzeyine tutunmasını ve sonrasında analitlerin tamamının çözücüye geçmesini sağlamaktır. Bu adsorpsiyon (tutunma) ve desorpsiyon (geri bırakma) aşamasında fabrik faz ortamının pH'ı, kullanılan çözgen türü ve hacmi, çözgenle ne kadar süre temas ettiği önemlidir. Böylece yüksek zenginleştirme sağlanır. MKFE'da yapıldığı gibi optimize koşulların sağlanması için literatür taraması sonucu parametreler belirlenmiş ve ön denemeler yapılmıştır. FFE için yapılan optimizasyon parametreleri MKFE için yapılan parametrelerle ve uygulanış yöntemi olarak aynıdır.

2.7. Yöntemlerin Uygulamaları İçin Model Çözeltilerin Hazırlanması ve Uygulanması

Geliştirilmiş olan mikroekstraksiyon temelli ve kromatografik analiz yöntemlerin hem doğruluğu hem de kesinliğini test etmek için; sentetik idrar, sentetik tükürük ve ilaç numuneleri ile model çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerde hem doğrudan analizler hem de standart ekleme (spike) yapılmıştır. Bu sayede yöntemlerin hem tekrarlanabilirlikleri hem de doğrulukları hakkında veriler elde edilmiştir. Model çözeltiler üzerine 2 farklı derişim düzeyinde (250 ve 500 ng.mL⁻¹) standart çözeltiler eklenmiş her iki molekül için de parametreler 3 tekrarlı yapılan ölçümlerde ayrı ayrı hesaplanmıştır.

2.7.1. Sentetik İdrar Çözeltisi

Literatür bilgisi ışığında aşağıdaki bileşime göre hazırlandı ve deney anına kadar buzdolabında +4 C de saklandı.

- 6.25 g üre,
- 0.27 g CaCl₂.2H₂O ,
- 0.25 g NH₄Cl,
- 0.4 g KCl,
- 0.35 g Na₂SO₄ ,
- 0.35 g KH₂PO₄ ,
- 0.73 g NaCl tartılarak bir miktar distile suda çözülüp hacmi volumetrik balonda 250 mL 'ye tamamlanır. pH'ı 0.1 M HCl çözeltisiyle pH'ı 6 'ya ayarlandı ve vakumlu süzme cihazı ile süzöldü. Amber renkli şişeye aktarılarak +4°C'de saklandı (Paula vd.,2018).

2.7.2 Sentetik Tükürük Örneklerinin Hazırlanması

4.2 gr Sodyum Hidrojen Karbonat (NaHCO_3) ,

0.5 gr Sodyum Klorit (NaCl),

0.2 gr Potasyum Karbonat(K_2CO_3)

30 mg Sodyum Nitrit (NaNO_2) bileşenleri saf suda çözülmüştür. 1 litrelik çözelti balon jode işaret çizgisine kadar seyreltikten sonra NaOH yardımıyla pH:5 e ayarlanmıştır. Hazırlanan tükürük çözeltisi model çözelti olarak kullanılarak normal deney prosedürü uygulanır (Antunes et al., 2019).

2.7.3. İlaç Örneklerinin Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen 5 mg Glipizid içeren GLUCOTROL® (Pfizer) tabletten 10 adet ve 10 mg Pravastatin sodyum içeren PRAVACHOL® (Deva Holding) tabletten 5 adet tablet alınarak toz edilip karıştırıldı. Üzerine 50 mL metanol eklenerek çözüldü ve vortekste 10 dakika ve ultrasonik su banyosunda 10 dakika karıştırılarak çözelti hazırlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak geliştirilen yöntemde gerçek numune olarak kullanıldı. Numune çözeltisi hazırlamak için literatürde yer alan tablet hazırlama yöntemlerinden yararlanılmıştır (Maslarska, 2014; Singh vd., 2014).

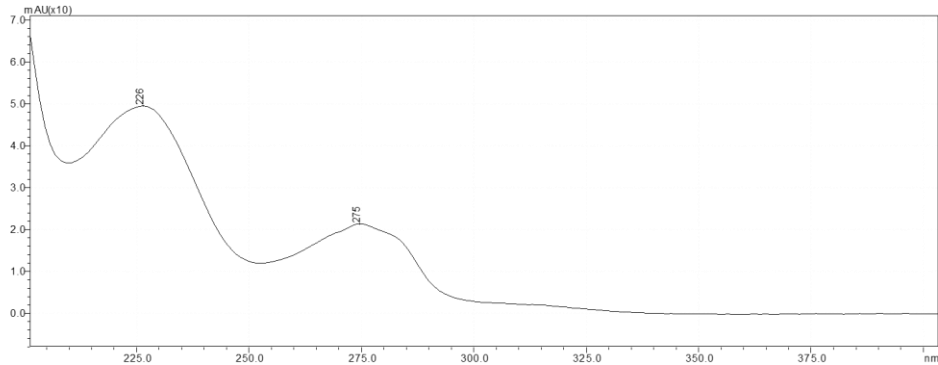
2.8. Geliştirilen Yöntemlerin Analitik Performans Ölçütleri, Validasyon Parametreleri

MKFE ve FKFE yöntemlerinin bütün deneysel değişkenleri optimize edilip ideal koşullar belirlenmiştir. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde analitik sinyal olarak kromatogramda her bir molekül için elde edilen pik alanları hesaba katılmıştır. Doğrusal aralık çalışması için artan derişimde bir kalibrasyon oluşturacak şekilde model çözeltilerle yapılan deneyde okunan pik alanları grafiğe geçirilmiş, GS ve TS değerleri için elde edilen bu kalibrasyon verileri kullanılarak ICH kılavuzuna göre hesaplama yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik ve doğruluk verileri, model çözeltiler üzerinden yapılan standart ekleme ve çok tekrarlı okuma sonuçlarına göre hesaplanırken, zenginleştirme ve iyileştirme faktörlerinin hesaplanmasında geliştirilen yöntemlerin öncesi ve sonrasında hacimler ve kalibrasyon grafiklerinin eğimleri gibi parametreler dikkate alınmıştır.

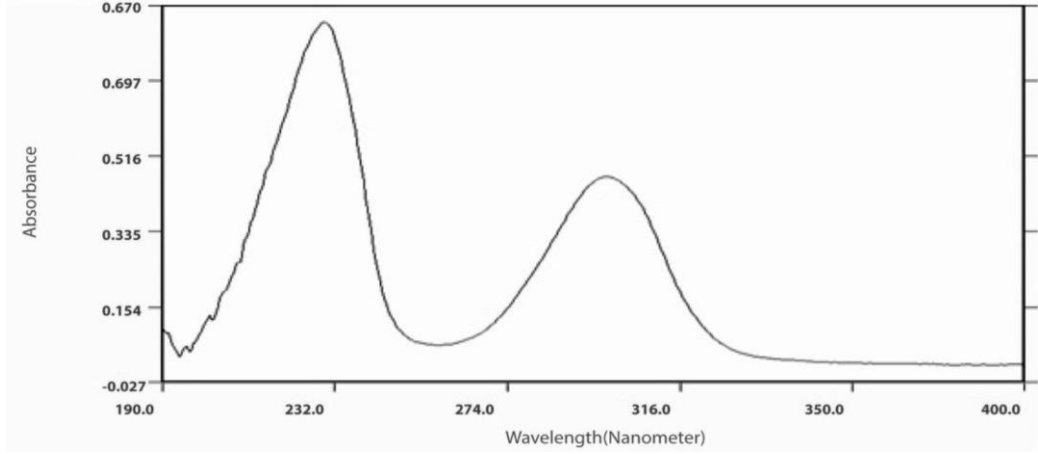
3. BULGULAR

3.1. Glipizid ve Pravastatin Sodyum İçin Doğrudan Tayin Yöntemi Geliştirilmesi

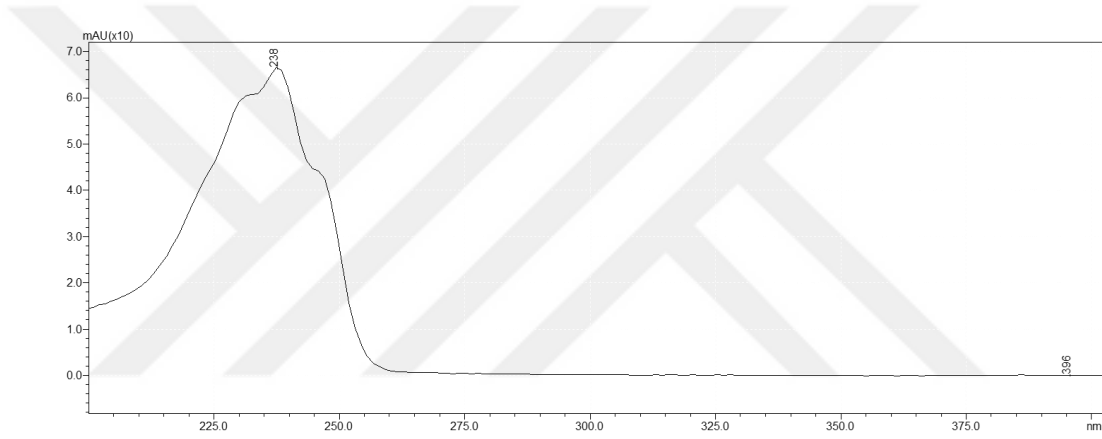
Hedeflenen analitleri doğrudan tayin edebilecek analitik yöntemi geliştirmek için stok olarak hazırlanan saf GLP ve PST çözeltilerinden standart kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak en iyi ayırma sağlanmıştır. Yapılan denemeler sonucunda analiz İnertsil C18 (250 x 4.6 mm, 5.0 µm iç çap) kolonu üzerinde Asetonitril : KH₂PO₄ (pH:3, 0.02 M) (55:45) hareketli fazı kullanılarak 1.0 mL dk⁻¹ akış hızında gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 40°C ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak seçilmiştir. Ölçümler, DAD dedektör kullanılarak Şekil 3.1. ve 3.2.'de spektrumları verilmiştir ve maksimum dalga boyları GLP için 226 nm ve PST için 238 nm olarak belirlenmiştir. GLP ve PST moleküllerini içeren kalibrasyon standartları 1-2-5-10-20 ppm konsantrasyonlarında hazırlandı ve YPSK'ye yerleştirildi ve sonuçlar pik alanı esas alınarak kalibrasyon grafiği hazırlandı. Bulunan ideal YPSK çalışma şartları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Kalibrasyon parametreleri Çizelge 3.2' de, standartların kromatogramı da Şekil 3.5. 'de görülmektedir. Şekil 3.2. ve Şekil 3.4.'de GLP ve PST için literatürden alınan spektrumlar verilmiştir.



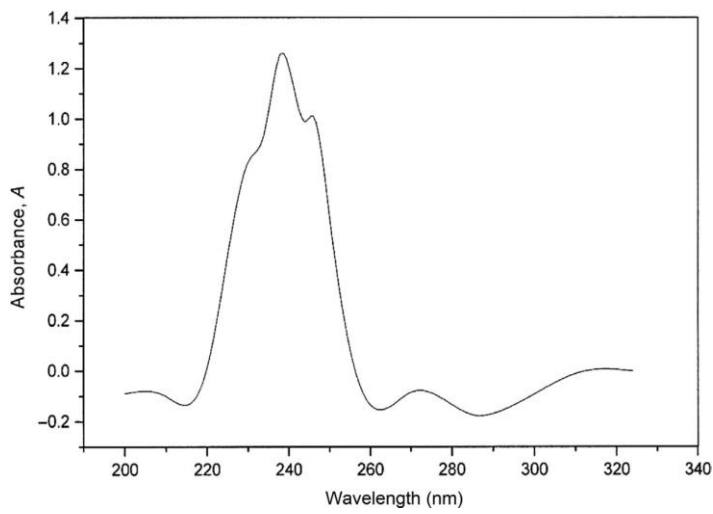
Şekil 3.1. GLP molekülüne ait DAD dedektörden elde edilen spektrum



Şekil 3. 2.Literatürden elde edilen GLP molekülüne ait spektrum (Jena vd., 2017)



Şekil 3.3. PST molekülüne ait DAD dedektörden elde edilen spektrum



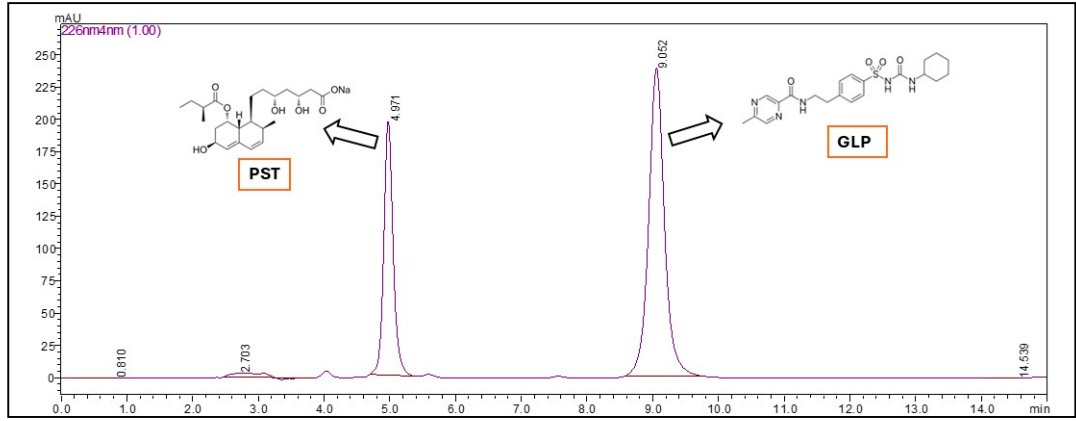
Şekil 3. 4. PST molekülüne ait literatürden alınan spektrum (Al-Badr ve Mostafa, 2014)

Çizelge 3. 1. YPSK çalışma koşulları

YPSK Mod	İzokritik
Mobil Faz	%45 pH 3.0 PBS(KH_2PO_4) %55 Asetonitril
Elüent Akış Hızı	1.0 mL /dk
Yürütme Süresi	14 dk
Kolon	İnertsil C18 (250 mm×4.6×5.0 μm)
Kolon Sıcaklığı	40 ° C
Enjeksiyon Hacmi	10 μL
Sistem Basıncı (yaklaşık)	120 bar

Çizelge 3.2. Kalibrasyon parametreleri

Parametre	Pravastatin Sodyum	Glipizid
Alıkonma süresi, dk	4.98	9.05
Maksimum λ'ları	238 nm	226 nm
Kalibrasyon Aralığı	1.0-20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.0-20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$
R²	0.9956	0.9949
Tekrar Sayısı	3	3
Kalibrasyon grafiği eğimi	65100	72400



Şekil 3. 5. 20 ppm GLP ve PST moleküllerine ait ideal koşullarda elde edilen aynı anda tayin kromatogramı

3.2. Geliştirilen Yöntemin Sistem Uygunluk Testi (SUT)

Yöntemin sistem uygunluk testi (SUT) için 5 tekrarlı standartlar okutulması sonrasında elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3’de verilmiştir. Sonuçlar tez çalışmasında kullanılan YPSK cihazından alınmıştır.

Çizelge 3. 3. Sistem uygunluk parametreleri

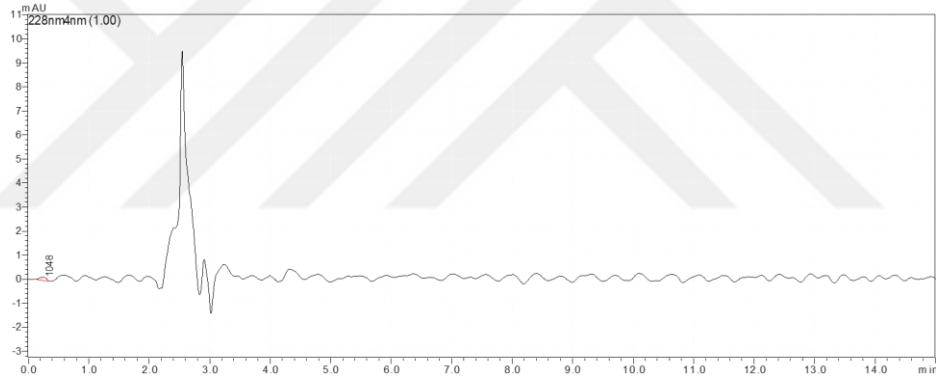
Parametre	Kabul kriterleri	Sonuçlar	
		GLP	PST
Teorik tabaka sayısı (N)	$N \geq 2000$	14700	12340
Asimetri faktörü (A_s)	$0.95 \leq A_s \leq 1.2$	1,06	1,16
Kapasite faktörü	$1 < k' < 10$	5,22	9,52
Kolon ayırma gücü	$R_s > 2$	3,7	
% RSD	$\% RSD \leq 2$	% 0,17	% 0,15

3.3. Geliştirilen YPSK Metodunun Validasyon Parametreleri

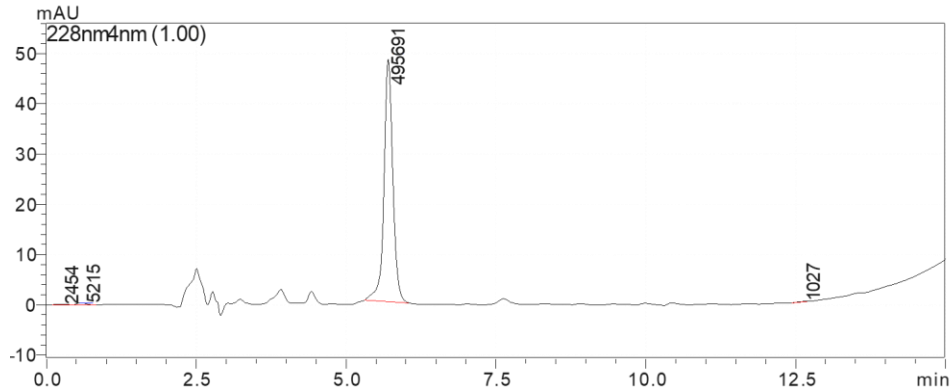
Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmaları için; Seçicilik, doğrusallık, gözlenebilme ve tayin sınırı, doğruluk, kesinlik, sağlamlık parametreleri çalışılmış ve sonuçlar sunulmuştur.

3.3.1. Özgünlük Çalışması

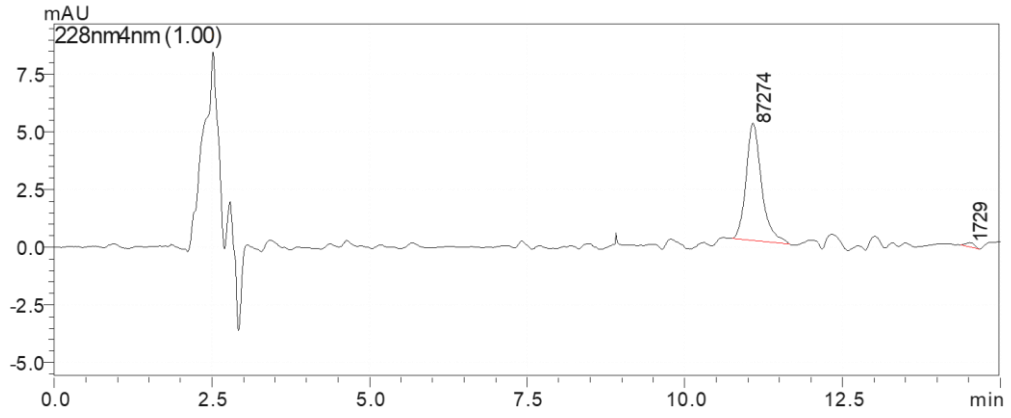
Bu tez çalışmasında özgünlük için hedef antidiyabetik ajan olan Glipizid molekülünden farklı bazı antidiyabetik maddeler, PST ve GLP içeren standart 10 ppm derişimindeki çözeltiye bilinen miktarda eklenerek kromatogramları alınmıştır. Bu antidiyabetikler Glimeprid, Gliklazid, Metformindir HCl için geliştirilen yöntemle standart çözeltileri okutulduğunda alınan tek başına ve hedef analitle birlikte ayrıca mobil faz boş kromatogramları verilmiştir. Hedef analitlerin olduğu matris ortamına. Şekil 3.6'da mobil faz kromatogramını gösterir.Şekil 3.7'de Gliklazid ve Şekil 3.8'de Glimeprid kromatogramları verilmiştir. Metformin HCl çözeltisi eklendiğinde alınan kromatogram ise Şekil 3.9 'de görüldüğü gibidir. Şekil 3.10 Metformin HCl'ye ait kromatogram ve Şekil 3.10 ise hedef analitlerle beraber okutulan kromatogramdır sadece Metformin piki çıkmıştır ve hedef analitlerin alıkonma zamanlarında bir değişiklik olmamış yani girişim yapmamıştır. Metformin pikini belirlemek için Şekil 3.11'de spektrumu verilmiştir.



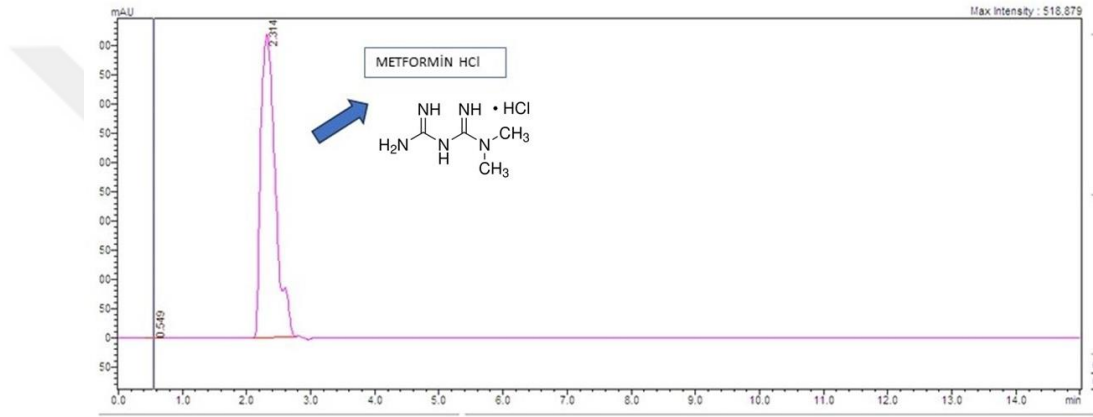
Şekil 3. 6. Boş mobil faz çözeltisine ait kromatogram



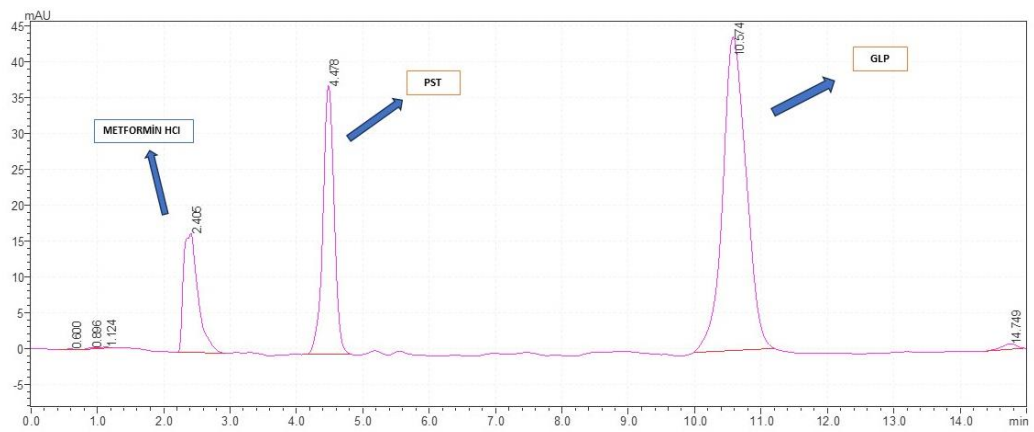
Şekil 3. 7. 20 ppm Gliklazid çözeltisine molekülüne ait kromatogram



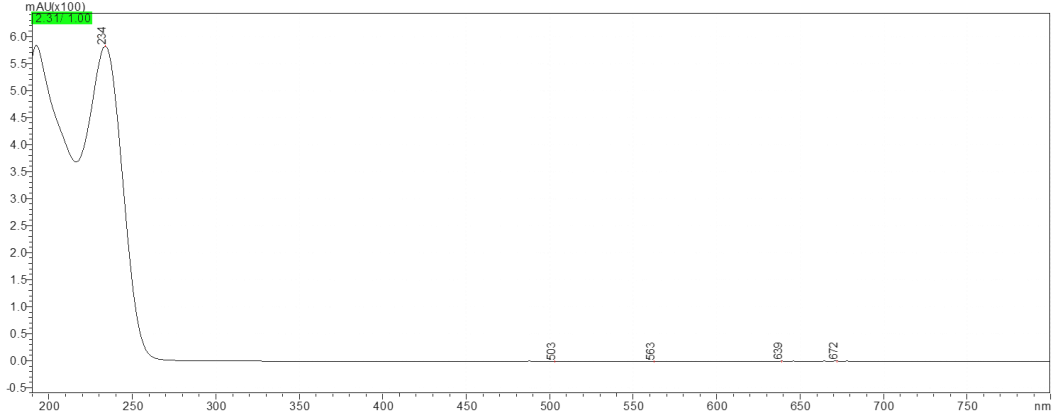
Şekil 3. 8. 20 ppm Glimepidr molekülüne ait kromatogram



Şekil 3.9. 20 ppm Metformin HCl standart çözeltisine ait kromatogram



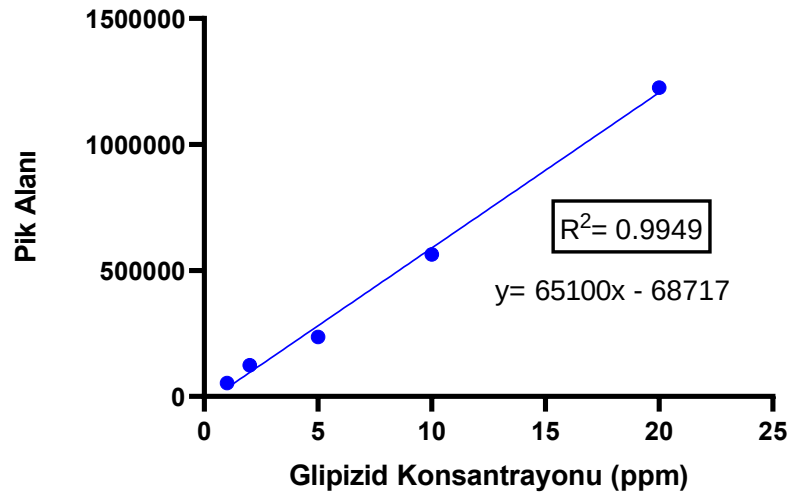
Şekil 3. 10. Hedef analitler ile diğer antidiyabetiklerin birlikte olduğu kromatogram



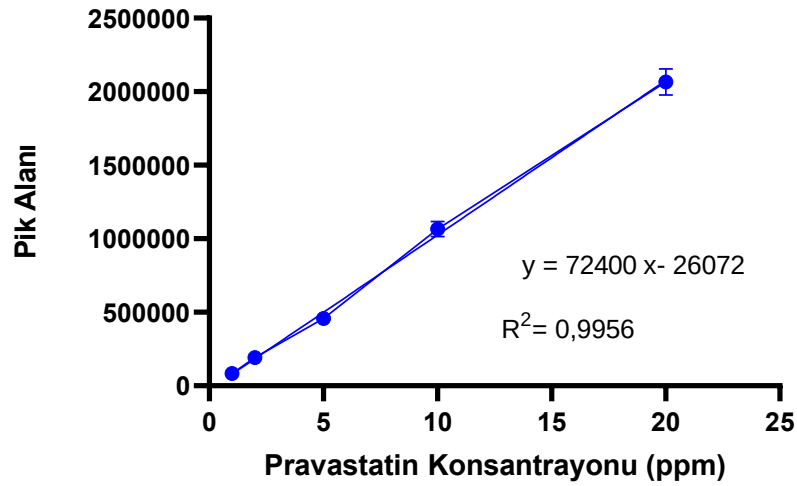
Şekil 3.11. Metformin HCl standart çözeltisine ait spektrum

3.3.2. Doğrusallık Çalışması

Bu tez çalışmasında 5 adet artan konsantrasyonda GLP ve PST'karışımından oluşan kalibrasyon standartları hazırlandı bunlar; 1 ppm, 2 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppmdir. Bu standartlar YPSK koşullarında analiz edildi ve geliştirilen metod ile 3 tekrarlı okutuldu. Böylece GLP ve PST çözeltilerine ait alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Bu kalibrasyon grafiği Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'de verilmiştir ve R^2 değeri PST için 0.9956 ve GLP için 0.9949 'dır.



Şekil 3.12. Glipizid için YPSK-DAD ile doğrudan tayin kalibrasyon grafiği



Şekil 3. 13. Pravastatin Sodyum için YPSK-DAD ile doğrudan tayin kalibrasyon grafiği

3.3.3. Gözlenebilme ve Tayin Sınırı (GS ve TS) Çalışması

Teşhis sınırı veya gözlenebilme sınırı denen GS değeri bir numunedeki tespit edilebilen fakat nicel kesin bir değer olarak belirlenemeyen en küçük analit miktarıdır. Bu değer genellikle linear aralığa girmez Tayin alt sınırı olarak bilinen TS bir numunedeki uygun hassaslık ve doğrulukta nicel olarak belirlenebilen en düşük analit miktarını ifade ettiği bölüm de belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan hesap yöntemi ise kalibrasyon eğimi ve standart sapmanın kullanıldığı formüllerdir.

$$TS = \frac{3.3 \times SD}{eğim}$$

$$TAS = \frac{10 \times SD}{eğim}$$

TS ve TAS değerleri hesaplanmıştır ve hem kullanılan MKFE hem de FFE yöntemleri için verilmiştir.

Çizelge 3. 4. Önerilen yöntemler için bulunan GS ve TS değerleri

	MKFE ve FFE Öncesi ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		MKFE Sonrası (ng.mL^{-1})		FFE Sonrası (ng.mL^{-1})	
	GLP	PST	GLP	PST	GLP	PST
GS	0,32	0,36	3.03	3,17	6,28	4,23

TS	0,95	0,90	9,09	9,50	18,82	14,14
----	------	------	------	------	-------	-------

3.3.4. Doğruluk Çalışması

Doğruluk parametresi yönteme ait geri kazanım (%) değerleri ile ifade edilir ve sonuçların gerçekliği hakkında bilgi verir. Bu tez çalışmasında bu değerlerin hesaplanması için stok model çözeltisinden ve son konsantrasyonları 1.0,2.0,5.0,10.0 ve 20.0 µg/mL olan standart çözeltileri YPSK cihazı ile analiz edilmiş olup kalibrasyon eğrisi sayesinde PST ve GLP miktarları hesaplanmıştır. %Geri kazanım için kabul edilebilir aralık % 95-%105 aralığıdır. Metodun geri kazanım (recovery) değerleri aşağıda belirtilen formül sayesinde hesaplanmıştır. Hesaplanan % Geri kazanım sonuçları Çizelge 3.8’ de verilmiştir.

$$\text{Geri Kazanım (\%)} = \frac{C1}{C2} \times 100$$

C1: Kalibrasyon eğrisinden hesaplanan GLP ve PST konsantrasyon değerini (µg/mL),

C2:Bilinen GLP ve PST konsantrasyon değerini (µg/mL) ifade etmektedir.

3.3.5. Kesinlik

Bu parametre tekrarlanabilirlik ve hesap edilen bağıl standart sapma (% BSS) ile belirlenir ve rastgele hataların dağılımını göstermektedir.doğrusal kalibrasyon grafiğinin ortasındaki bir değerden (10 µg/mL) gün içi ve günler arası kesinlik değerleri hesaplanmış ve %BSS cinsinden Çizelge 3.4 ‘de sunulmuştur. Hazırlanan standart GLP ve PST çözeltileri için 5 tekrarlı olarak kalibrasyon eğrisine ait formülden yararlanılarak miktarları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Sistem kesinliği tekrarlı okumalar sonucu GLP için % 0,17 ve PST için %0,15’dir. % BSS değerleri aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır. 3 farklı konsantrasyonda 3 tekrarlı çalışma sonucu elde edilen değerler tezin son bölümünde ekstraksiyon yöntemlerinin kesinliği yönünden değerlendirilip sunulmuştur.

$$\%BSS = \frac{\text{Standartsapma}}{\text{Ortalama}} \times 100$$

Gün içi ve günler arası 3 tekrarlı ekstraksiyon sonrası için yapılan analizler sonucu elde edilen %BSS değerleri sunulmuştur.

Çizelge 3. 5. Kesinlik parametresi için % BSS değerleri

	GLP (% BSS)	PST (%BSS)
Gün içi kesinlik	% 5.5	%5,2
Günler arası	%5,8	%5,6

3.3.6. Sağlamlık

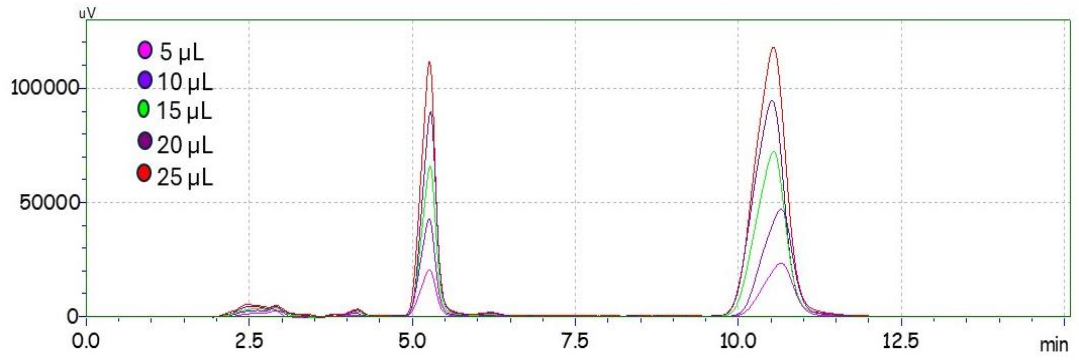
Sağlamlık çalışması için önemli olan ve sistem uygunluk parametresinde sunulan pik simetrisi ve kolon ayırma gücü denilen rezolüsyon değerleri hedef analitlerine ait kromatogramlar için kabul kriterlerine uygun olduğu görülmüştür. Sağlamlık parametresi için bu tez gereğince çalışılan parametreler ; enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı ve mobil faz oranıdır.

3.3.6.1. Enjeksiyon Hacmi

Cihazda numune okunurken enjeksiyon sistemiyle çekilen hacimler değiştirilerek bu parametre test edilmiştir. Bunun için 5 µL,10 µL,15 µL,20 µL,25 µL hacimlerde geliştirilen yöntemle analiz başlatılmış ve elde edilen kromatogramlar sunulmuştur. Şekil 3.14’de verilmiştir. Pik alanı beklendiği gibi enjeksiyon hacmi ile artmaktadır. Eser miktarda örnek analizi için uygun değer olması ve R_s ve T değerlerinin kabul edilebilir sınırlarda olması nedeniyle 10 uL tercih edilmiştir.

Çizelge 3. 6. Enjeksiyon hacmine göre rezolüsyon ve kuyruklanma faktörleri sonuçları

Enjeksiyon Hacmi	R_s	T (%10)	
		GLP	PST
5 µL	7.32	0,942	1,077
10 µL	7,85	0,948	0,970
15 µL	7,93	0,883	0,906
20 µL	7,91	0,868	0,947
25 µL	5,32	0,916	0,960



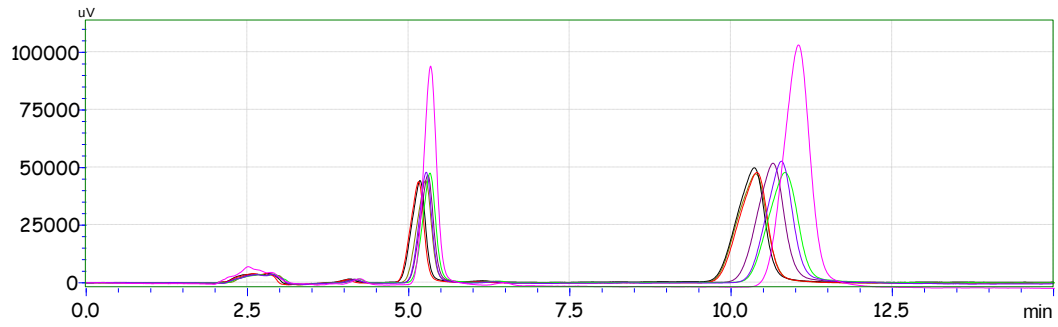
Şekil 3.14. Enjeksiyon hacmi validasyon çalışması sonucu elde edilen kromatogram

3.3.6.2. Kolon Sıcaklığı

Cihazda kullanılan kolonun sıcaklığı yapılan analizi önemli oranda etkilemektedir. Optimum şartlarda çalışabilmek ve sağlamlık parametresini test etmek için farklı kolon sıcaklıklarında kalibrasyon standartları okutulmuş ve Şekil 3.15’ de kromatogramlar elde edilmiştir. Kullanılan sıcaklıklar 25°C , 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C ‘dir. Kromatograma göre sıcaklık arttıkça pik alanı artmıştır.

Çizelge 3.7. Kolon sıcaklığı rezolüsyon ve kuyruklama faktörü sonuçları

Kolon Sıcaklığı	R _s	T	
		GLP	PST
25°C	9,7	0,921	0,993
30°C	4,2	0,917	0,971
35°C	6,5	0,910	0,931
40°C	4,4	0,901	0,917
45°C	5,9	0,834	0,881
50°C	6,1	0,842	0,879
55°C	2,1	0,857	0,887



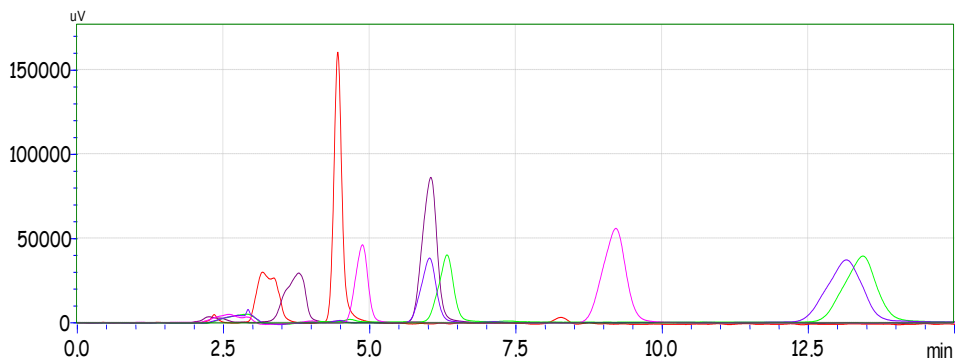
Şekil 3.15. Kolon sıcaklığı validasyon çalışması sonucu elde edilen kromatogram

3.3.6.3. Mobil Faz Oranı

Bu çalışmada mobil faz olarak 0.02 M Fosfat tamponu ve Asetonitril karışımı literatür taraması sonucu uygun bulunmuştur gradient ve izokratik okumalar sonucunda farklı oranlarda denemeler yapılmıştır ve en uygun oranda olan mobil faz bileşimi pik alanları kıyaslanarak seçilmiştir. Aşağıda verilen farklı oranlardaki mobil faz yöntemleriyle okutulan hedef analitlerin kromatogramı Şekil 3.16’da verilmiştir.

Çizelge 3.8. Mobil faz oranına göre rezolüsyon ve kuyruklanma faktörü sonuçları

Mobil faz çeşitleri	R _s	T	
		GLP	PST
A	2,23	0,921	0,941
B	8,09	0,921	0,935
C	0,48	0,921	0,987
D	12,2	5,5	4,6
E	4,2		

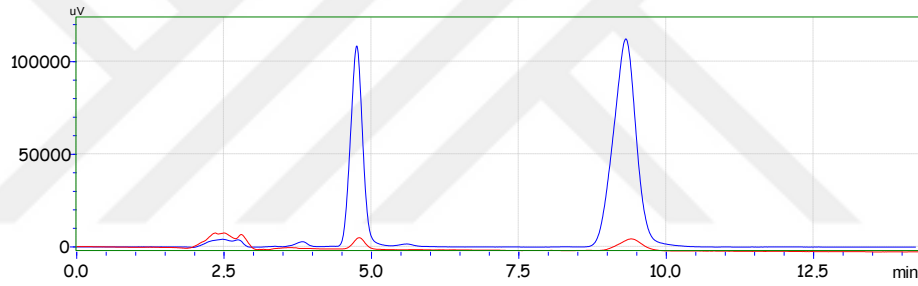


Şekil 3.16. Mobil faz için yapılan validasyon çalışması sonucu elde edilen kromatogram

- % 55 pH:3 (0.02 M KH_2PO_4) / % 45 Asetonitril(ACN) ●
- % 60 pH:3 (0.02 M KH_2PO_4) / % 40 Asetonitril(ACN) ●
- % 65 pH:3 (0.02 M KH_2PO_4) / % 35 Asetonitril(ACN) ●
- % 45 pH:3 (0.02 M KH_2PO_4) / % 55 Asetonitril(ACN)** ●
- % 35 pH:3 (0.02 M KH_2PO_4) / % 65 Asetonitril(ACN) ●

3.4. MKFE Yönteminde Elde Edilen Bulgular

Bu bölümde MKFE için yapılan karakterizasyon, optimizasyon, validasyon parametreleri sunulmuştur. MKFE öncesinde 1 ppm lik hedef analitleri içeren standart çözelti kromatogramı ile MKFE ile zenginleşme sonrası kromatogram Şekil 3.17’de gösterilmektedir.



Şekil 3.17. MKFE sonrası kromatogram görüntüsü

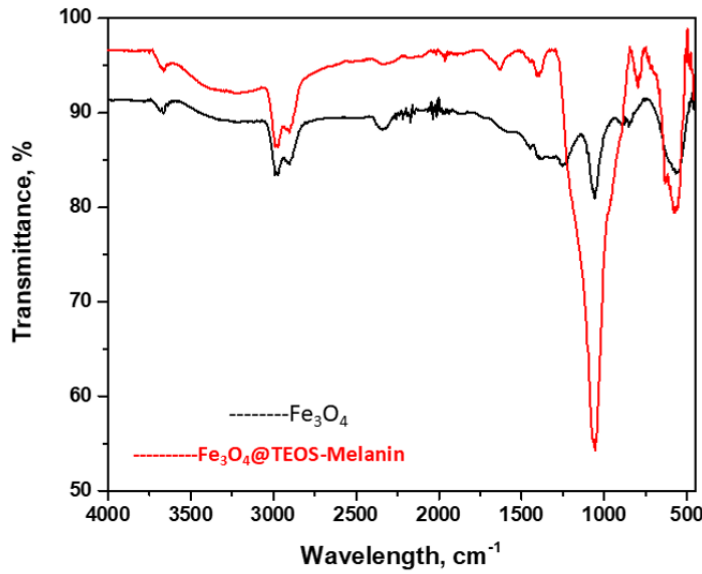
3.4.1. Kullanılan Manyetik Katı Fazın Karakterizasyonu

MKFE yöntemi için manyetik katı faz destek maddesi($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ -Melanin) sentezlenmiştir Fe_3O_4 tanecikleri oluşmuş TEOS ile silanlama yapıp sonrasında üzeri Melaninle kaplanmıştır. Bu yapının aydınlatılması manyetik özelliğinin ispat edilebilmesi için karakterizasyon yöntemleri kullanılmıştır.

3.4.1.1. FTIR Karakterizasyonu

Sentezlenen manyetik temelli katı faz örneği için $4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda aralıktadır. $3445,7\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda geniş bir spektrum olarak görülen bandın -OH (hidroksil) (H bağı) gerilme bandı olduğu ve Fe-OH gerilme spektrumu olarak saf Fe_3O_4 magnetit yapılar da rastlanabildiği literatür çalışmalarıyla da doğrulanmıştır (Sekhar vd.,

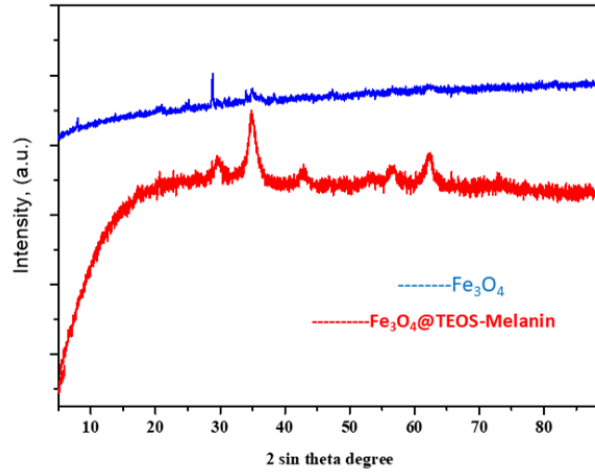
2019). Serbest hidroksil grupları $3645-3610\text{ cm}^{-1}$ arasında keskin pik verdikleri bilindiğinden $3445,7\text{ cm}^{-1}$ de görülen spektrum daha yayvan olduğundan aynı zamanda moleküler arası H bağı olarakta literatürde yer bulabilmektedir. $2422,4\text{ cm}^{-1}$ de görülen spektrumun reaksiyon ortamında atmosfer kaynaklı C-N gerilme titreşimlerine ait olabileceği düşünülmektedir. $1789,3$ ve $1645,3\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda gözlenen spektrumlar ise sırasıyla C=O ve C-O gerilme titreşimlerini temsil eden bir tepe noktasının varlığını göstermektedirler. $1347,3$; $831,52$; $793,97$ ve $615,6\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda görülen spektrumların Fe_3O_4 kaynaklı olduğu bilinmektedir. $1150,8$; $1110,8$ ve $998,2\text{ cm}^{-1}$ dalga boylarında görülen spektrumlar ise C-O ve C-OH eğilme titreşimlerine ait olduğu literatür çalışmalarıyla doğrulanmıştır ve FTIR spektrumu Şekil 3.17’de verilmiştir (Akbenar, 2015; Nayan, 2019).



Şekil 3. 18. Fe_3O_4 @TEOS-Melanin manyetik partiküllerinin FTIR Spektrumu

3.4.1.2.XRD Yöntemi

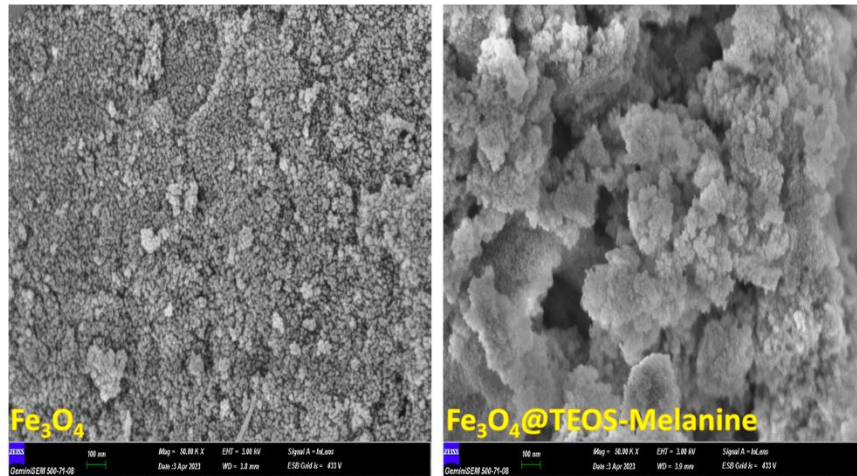
Nanomalzemelerinin son hali X-ışını kırınım (XRD) modelini Şekil 3.19’da Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 @TEOS-Melanin göstermektedir. MNT-1 nanomalzemesinin kırınım pikleri sırasıyla 7.19, 25.18, 28.82, 33.97, 35.026 ve 38.3’te spesifik piklere sahiptir. Elde edilen bu pikler sentezlenen metal türleri için aynı karakteristik pikler ile eşleşmektedir. Bu XRD farklılaşma pikleri Fe_3O_4 partikülleri için karakteristiktir. Melanin molekülü ve manyetit bileşimli nihai Fe_3O_4 @TEOS-Melanin tür için sırasıyla 20.6, 29.53, 34.78, 42.87, 56.4 ve 62.41’lik pikler, sentezden sonra manyetik karakterinin daha fazla ortaya çıkmasını sağlamıştır (Altunay ve Elik, 2021; Loh vd., 2008).



Şekil 3.19. Fe_3O_4 @TEOS-Melanin manyetik partiküllerinin XRD Spektrumu

3.4.1.3. TEM Görüntüleri

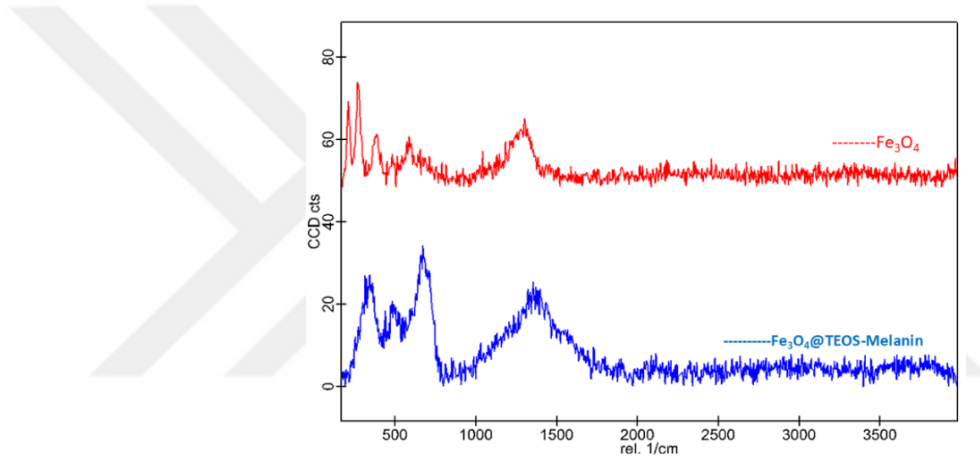
Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 @TEOS-Melanin nanomalzemelerinin görüntüleri 1k, 30k ve 100k büyütme oranlarında Fe-SEM görüntüleme ile elde edilmiştir. Yapılar morfolojik açıdan incelendiğinde ve Fe_3O_4 için tüm yakınlştırma oranlarında yapı içerisinde küresel forma sahip Fe_3O_4 nanopartikülleri net bir şekilde görülmektedir. Fe_3O_4 @TEOS-Melanin yapısının morfolojik yüzey incelemesi sonrasında küresel formdaki manyetik yapıların melanin kökenli şeffaf bir tabaka ile geniş bir yüzey üzerinde dizilimlerini tamamlayarak homojen bir konformasyon oluştuğu ve yüzey alanında doğrusal bir artış olduğu Şekil 3.19’de görülmektedir.



Şekil 3.20. Fe_3O_4 (a,b,c) ve Fe_3O_4 @TEOS-Melanin ,MNT-2(d,e,f) nanomalzemelerinin Fe-SEM görüntüleri. (a,d: 1k, b,e:30k ve c,f:100k büyütme oranları)

3.4.1.4. Raman Spektrumu

Fe_3O_4 ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ -Melanin nanomalzemelerinin Raman spektrumları Şekil 3.20 'de gösterilmiştir. Elde edilen Raman spektrumlarında, Fe_3O_4 için sırasıyla 209, 269, 376, 580 ve 1277 cm^{-1} dalga boylarında karakteristik raman kaymaları gözlenmektedir. Literatürdeki önceki çalışmalarla da teyit edilen bu raman spektrumları sentez sonrası elde edilmiştir (Shebanova ve Lazor, 2003). $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ -Melanin formunda ise yerlerini 342, 484, 671, 711 ve 1358 cm^{-1} dalga boylarında raman kaymaları almıştır. Melanin kaynaklı Raman kaymaları 484, 671, 711 ve 1358 cm^{-1} dalga boylarındaki pikler literatürde doğrulanmıştır ve saf melanin yapısına ait görünmektedir (Qin vd., 2014).



Şekil 3.21. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ -Melanin manyetik partiküllerinin Raman Spektrumları

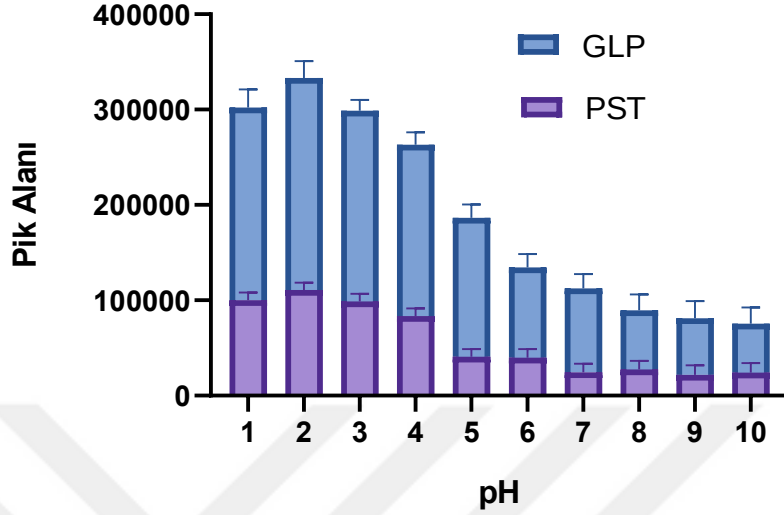
3.4.2. MKFE Yönteminin Optimizasyonu

Optimizasyon yapılması için belirlenen parametreler ; pH, çözgen seçimi, çözgen hacmi, adsorpsiyon zamanı, desorpsiyon zamanıdır.

3.4.2.1 pH'ın MKFE Yöntemine Etkisi

En uygun pH'ı bulmak amacıyla pH 1-10 arasında olan BR (Britton Robinson) tamponları kullanılmıştır. Şekil 3.21' de gösterildiği üzere analit ile katı faz arasındaki tutunmanın en iyi olduğu pH 2.00 bulunmuştur. Ortam pH'ının belirlenmesinde hedef moleküllerin pKa değerleri önem taşır. Glipizid için pKa 5,9 ve Pravastatin için 4,3'tür ve

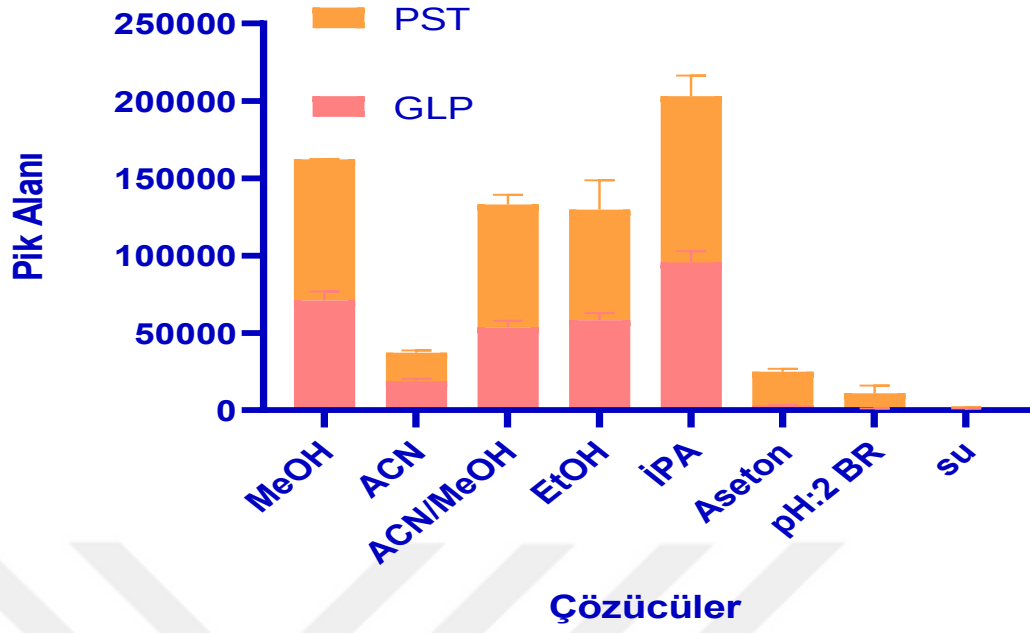
asidik bölgeye gelindiğinde ortam pozitif yüklü hale gelir. Bundan sonraki çalışmalar **pH 2.00**'da gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.22. Önerilen yönteme pH'ın etkisi

3.4.2.2. Çözücü Seçiminin MKFE Yöntemine Etkisi

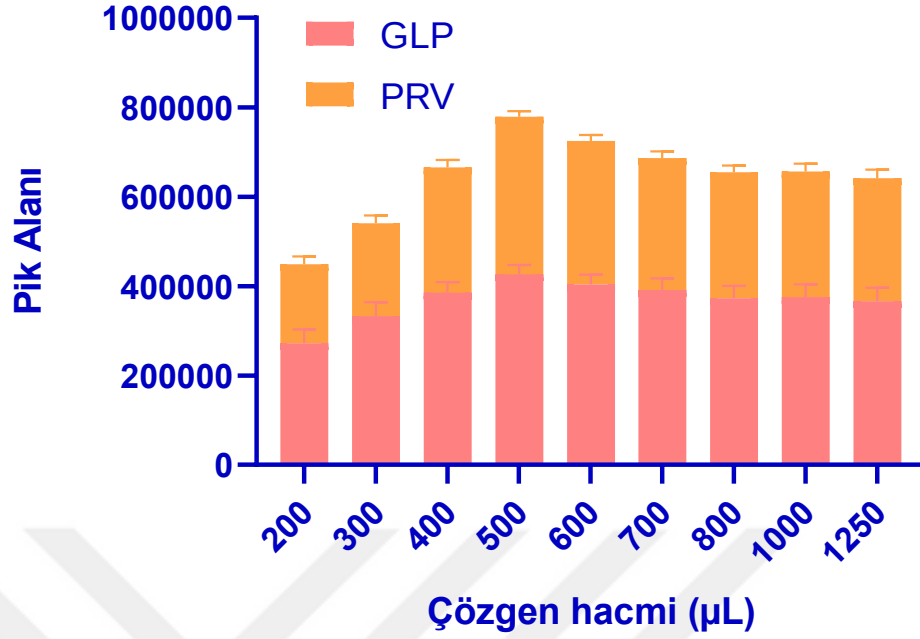
Bu amaçla laboratuvarında mevcut olan uygun çözücüler olarak MeOH, EtOH, İzopropanol(İPA), ACN, Distile su, Aseton ve ACN/MeOH ve pH 2.00 BR tamponu kullanılmıştır. 8 ayrı tüp kullanılarak çözücü hariç diğer parametreleri aynı olacak şekilde hazırlanmıştır. En ideal piklere her iki tür için de İPA ile ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.22'te gösterilmektedir. Sonraki basamak optimizasyonlara bu çözelti ile devam edilmiştir.



Şekil 3.23. Önerilen yönteme çözücü etkisi

3.4.2.3 Çözücü Hacminin MKFE Yöntemine Etkisi

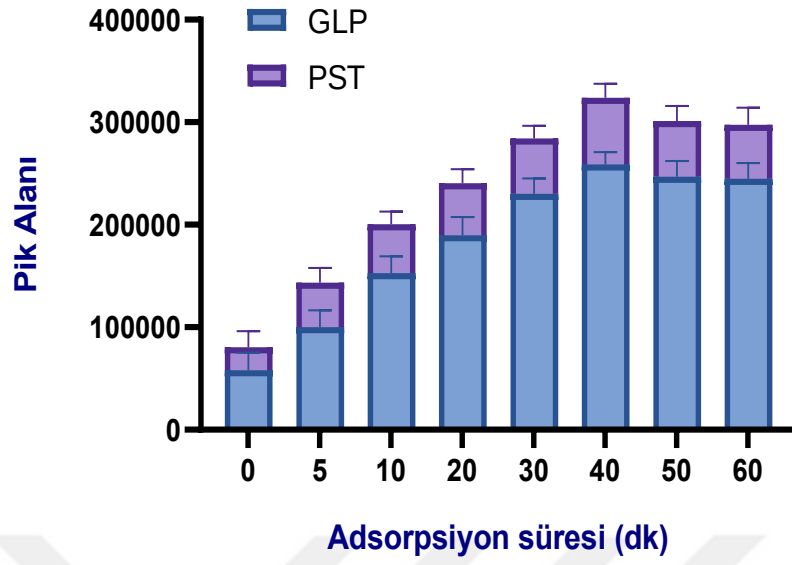
Geliştirilen yöntemde çözücü olarak kullanılacak olan İPAnın hacmini belirlemek amacıyla diğer bütün parametreler sabit tutulurken çözgen hacmi 200 μ L ile 1250 μ L arasında değişen bir seri denemeler yapıldı ve Şekil 3.23 'da verilen sonuçlar elde edildi. Şekilde görüldüğü gibi en yüksek pik alanına 500 μ L İPA kullanılarak ulaşılmıştır ve sonraki çalışmalar için çözücü miktarı 500 μ L İPA olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.24. Önerilen yönteme çözücü hacminin etkisi

3.4.2.4 Adsorpsiyon Süresinin MKFE Yöntemi Üzerine Etkisi

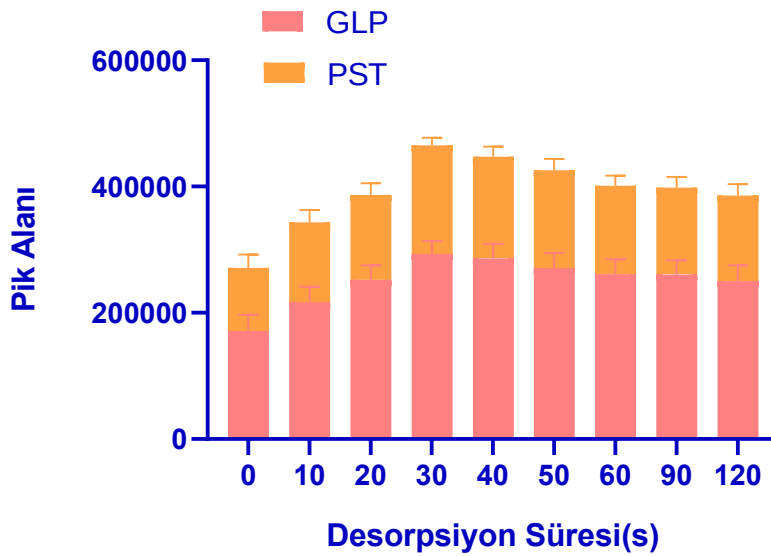
Sabit çalkalama hızında bu etkileşim için ideal süreyi tespit etmek amacıyla yapılan optimizasyonda diğer bütün parametreler sabit tutulurken, adsorpsiyon süresi olarak örnekler 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakika çalkalanmaya bırakılmıştır. Bu deneyin sonunda Şekil 3.24’ de verilen sonuçlar elde edilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi bu etkileşim için optimum adsorpsiyon süresinin **40 dakika** olduğu belirlenmiştir. Bu optimum tutabileceği maksimum dakikadır ve bu dakikadan sonra aralarındaki fiziksel etkileşim azalarak maddeyi terk etmeye başlar yani süre arttıkça pikler sabitlenir.



Şekil 3.25. Önerilen yöntem için uygun adsorpsiyon süresi

3.4.2.5. Desorpsiyon Süresinin MKFE Yöntemi Üzerine Etkisi

Desorpsiyon süresinin optimizasyonu için deneyler 0 ile 120 saniye aralığında olacak şekilde bir seri çalışılmıştır. En optimum piklerin elde edildiği vorteksleme zamanı 30 saniye olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.25’de gösterilmektedir.



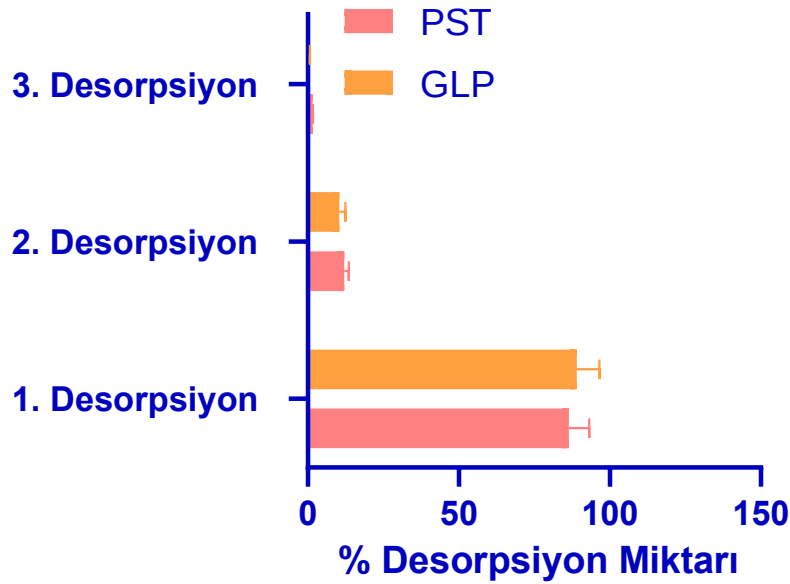
Şekil 3.26. Önerilen yöntem için uygun desorpsiyon süresi

3.4.2.6. Desorpsiyon Çözgeni ile Katı Faz Yüzeyinden Sıyırma Deneyi

Geliştirilen MKFE yönteminin son basamağında katı faz yüzeyine bağlanan türler 500 µL İzopropil alkol ile sıyırılmaktadır. Sıyırma işleminin ne kadar başarılı olduğunu ve bağlanan moleküllerin ne kadarının sıyrıldığı göstermek üzere 3 tekrarlı desorpsiyonlardan elde edilen sinyallerin oranıyla veriler hesaplanmıştır ve sonuçlar Çizelge 3.6. ve Şekil 3.26' de sunulmaktadır. Bu sonuçlarından anlaşılabileceği üzere hedef moleküller çok büyük oranda ilk basamakta sıyrılabilmekte ve ikinci sıyırmaya % 13' ünden daha azı kalmaktadır. Son basamağa kalan miktar ise % 1.5'in altındadır. Bu miktarlar manyetik katı fazın iyi ve kabul edilebilir şekilde son basamağa kadar geldiğini ve yeniden kullanabilme özelliğinin olduğunu gösterir.

Çizelge 3. 9. Desorpsiyon çözgeniyle desorpsiyon deneyi için alınan veriler

	PST	GLP
1.Desorpsiyon	% 86,4	% 89,0
2.Desorpsiyon	% 12,1	% 10,4
3.Desorpsiyon	% 1,5	% 0,6



Şekil 3.27. MKFE işleminde desorpsiyon miktarı grafiği

3.4.3. Geliştirilen MKFE Yönteminin Gerçek Örnek Çözeltilerine Uygulanması

Geliştirilmiş olan MKFE temelli bu kromatografi yönteminin hem doğruluğu hem de kesinliğini test etmek için, sentetik idrar, yapay tükürük ve ilaç numune çözeltileri üzerinden geri kazanım çalışmaları yapıldı. Sentetik idrar, sentetik tükürük ve ilaç numune çözeltilerine eklenen (spike edilen) miktarlar üzerinden yapılan geri kazanım çalışmaları ile bu yöntemin doğruluğu ve % geri kazanım değerleri hesaplandı. Her bir ekleme miktarı üzerinden 5 tekrarlı yapılan analizlerle de yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirliği % bağıl standart sapma hesaplandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.7’de sunulmuştur.

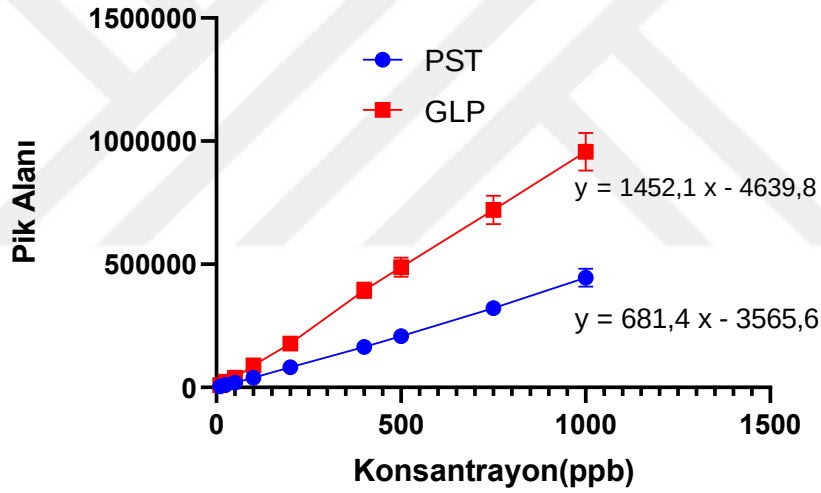
Çizelge 3. 10. Geliştirilen MKFE yöntemin gerçek örneklere uygulanması sonrası elde edilen sonuçlar

Örnekler	Eklenen ng mL ⁻¹	Bulunan ^a ng mL ⁻¹		% BSS		% Geri Kazanım	
		GLP	PST	GLP	PST	GLP	PST
Sentetik İdrar Çözeltisi	0.0	<GS	<GS	-	-	-	-
	250.0	253.7±15.4	253.5±10.6	6.1	4.2	101.5	101.4
	500.0	489.5±18.6	516.7±24.8	3.8	4.8	97.9	103.3
Yapay tükürük	0.0	<GS	<GS	-	-	-	-
	250.0	242,5±10,4	245,3±12,4	4,3	5,1	97,0	98,1
	500.0	504,5±23,5	487,5±24,5	4,7	5,0	100,9	97,5
İlaç Örneği	0.0	<GS	<GS	-	-	-	-
	250.0	238,8±11,8	241,5±12,4	4,9	5,1	95,5	96,6
	500.0	524,5±22,1	504,4±27,5	4,2	5,5	104,9	100,9

^a 5 tekrarlı ölçümün ortalaması ± standart sapma

3.4.4. Geliştirilen MKFE Yöntemin Analitik Performans Ölçütleri, Validasyon Parametreleri

Zenginleştirme ve iyileştirme faktörleri birlikte değerlendirildiğinde geliştirilen MKFE yönteminin analitik performans parametreleri üzerindeki etkisi net bir şekilde görülmektedir. MKFE öncesinde doğrudan YPSK ile yapılan analizlerde ppm seviyesinde tayinler yapılabilirken MKFE sonrasında ppb düzeyinde analizler yapılabilir. Geliştirilen yöntemin uygulanmasıyla elde edilen kalibrasyon doğruları GLP ve PST için Şekil 3.27’de gösterilmektedir tüm analitik performans ölçütleri MKFE öncesi ve sonrası kıyaslamalı bir şekilde Çizelge 3.9.’de sunulmuştur.



Şekil 3.28. Optimum koşullar altında MKFE sonrası elde edilen kalibrasyon doğruları

Çizelge 3.11.Önerilen MKFE Yöntemin Analitik Parametreleri

Parametreler	MKFE ile Zenginleştirme Öncesi		MKFE ile Zenginleştirme Sonrası	
	GLP	PST	GLP	PST
Doğrusal aralık	1.00-20.00 µg mL ⁻¹	1.00-20.00 µg mL ⁻¹	10-750 ng mL ⁻¹	10-750 ng mL ⁻¹

Gözlenebilme sınırı^a	0.32 µg mL ⁻¹	0.36 µg mL ⁻¹	3.03 ng mL ⁻¹	3.17 ng mL ⁻¹
Tayin sınırı^b	0.95 µg mL ⁻¹	0.90 µg mL ⁻¹	9.09 ng mL ⁻¹	9.50 ng mL ⁻¹
Kalibrasyon Duyarlılığı	65.1	72.4	1452.1	681.4
Determinasyon Katsayısı (R²)	0.9942	0.9914	0.9994	0.9990
Zenginleştirme Faktörü^c	-	-	20	20
İyileştirme Faktörü^d	-	-	52	58

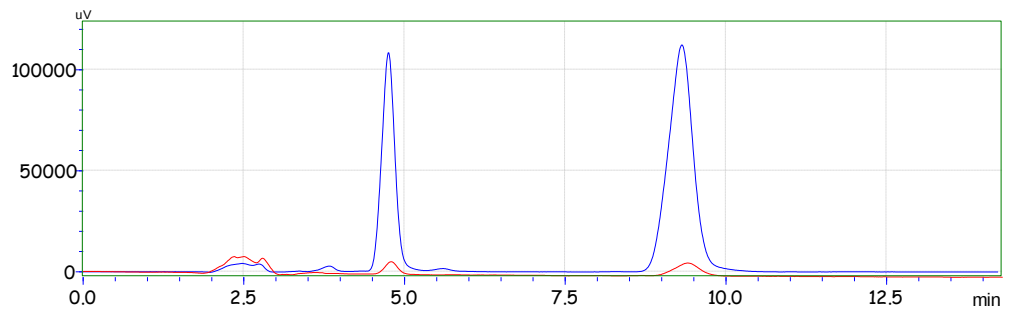
^{a,b} ICH Guidelines kaynağında ifade edildiği şekilde hesaplandı.

^c Zenginleştirme faktörü; başlangıçtaki sulu faz hacminin(10 mL) ,zenginleştirme sonrası elde edilen hacme (0.5 mL) oranı alınarak hesaplandı.

^d Zenginleştirme öncesi ve sonrası kalibrasyon grafiklerinin eğimleri oranlanarak hesaplanmıştır.

3.5. FFE Yönteminden Elde Edilen Bulgular

FFE yöntemi sonrasında yapılan karakterizasyon,optimizasyon,örnek uygulama ve validasyon sonuçları sunulmuştur.



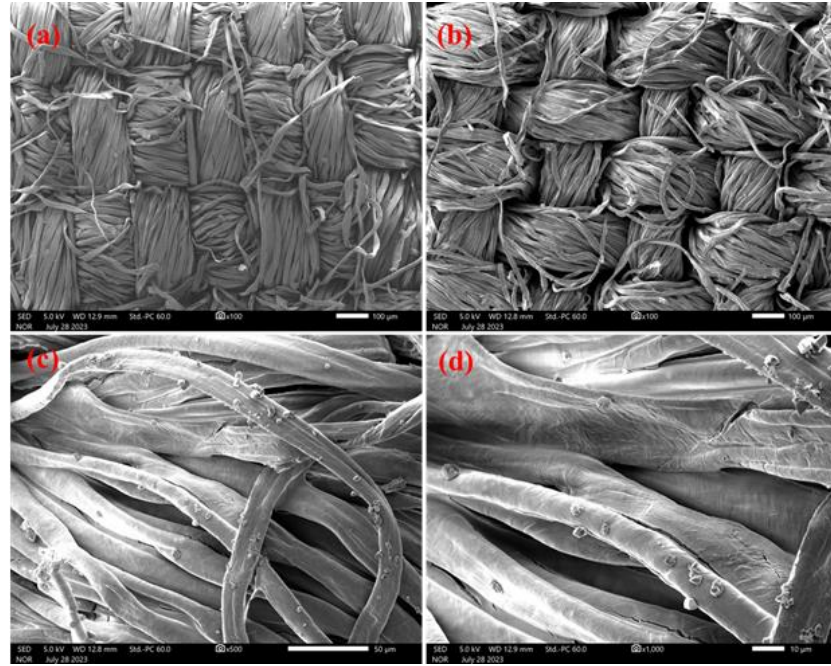
Şekil 3.29. Ekstraksiyon sonrası kromatogram

3.5.1. Kullanılan Fabrik Faz Katı Maddesinin Karakterizasyonu

Kullanılan Fabrik faz (Sol-gel Ti-PTHF) membranının yüzey morfolojisini anlamak için sırasıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) ve Fourier Dönüşümlü-Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile karakterizasyon yapılmıştır.

3.5.1.1.Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM)

Kaplanmamış %100 selüloz FFE membranının TEM görüntüsü (Şekil 3.28 a), selüloz mikro lifcik demetlerinin çok sistematik bir şekilde birlikte örüldüğünü ve selüloz mikro lifcikleri arasında ve mikrofibril demetlerinin köşelerinde geçirgenlik cepleri bıraktığını gösterir. Şekil 3.28 (b)'de sunulan görüntü, sol-jel PTHF sorbent kaplamasından sonra geçiş gözeneklerinin bozulmadan kaldığını göstermektedir. Sol-jel PTHF sorbent kaplamanın morfolojisi daha yüksek büyütmeyle Şekil 3.28 (c, d)'de sunulmaktadır. Sol-jel Ti-PTHF kaplamanın selüloz mikrofibrillerinin etrafında çok ince ve homojen olduğu görülmektedir. Şekil 3.28 (d)'de sunulan sol-jel Ti-PTH sorbent kaplı FFE membranının daha fazla büyütülmesi (1.000x), sol-jel Ti-PTHF'nin daha düşük büyütmedeki SEM görüntüsünde ortaya çıkmayan herhangi bir özel niteliğini ortaya çıkarmadı.

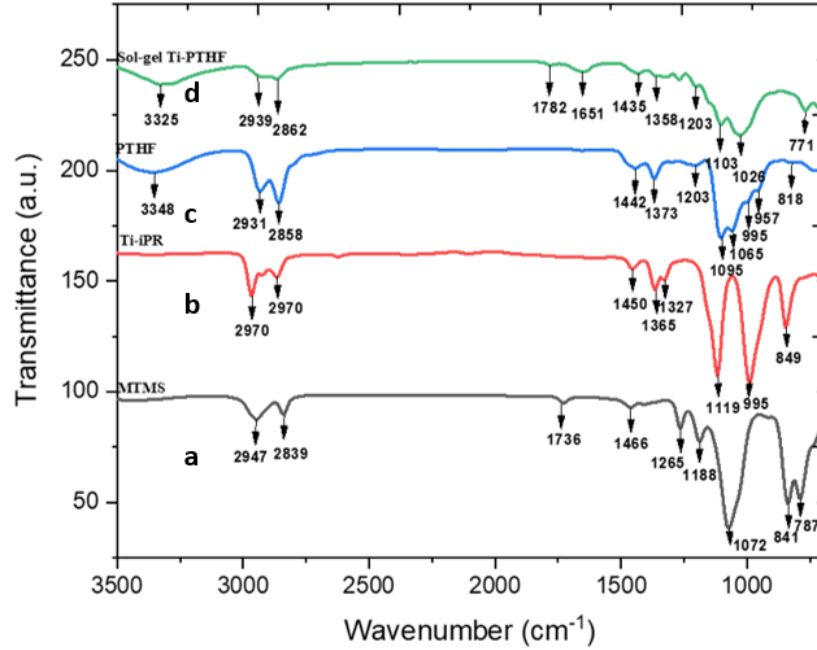


Şekil 3.30. Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) görüntüleri. (a) 100x büyütmede bozulmamış, kaplanmamış %100 selüloz pamuklu kumaşın TEM görüntüleri; (b) 100x büyütmede sol-jel Ti-PTHF

kaplı FFE membranı; (c) 500x büyütmede sol-jel Ti-PTHF kaplı FFE membranı; (d) 1.000x büyütmede sol-jel Ti-PTHF kaplı FFE membranı.

3.5.1.2. Fourier Dönüşümü-Kızılötesi Spektroskopisi(FTIR)

Fourier Dönüşümlü-Kızılötesi Spektroskopisi, sol çözeltisinin farklı yapı taşlarının fonksiyonel yapısına ve ayrıca son sol-jel sorbent kaplamasına ilişkin önemli bilgiler sağlayan çok verimli, hızlı ve güçlü bir araçtır. Farklı sol çözelti bileşenleri MTMS, Titania poli(tetrahidrofuran) ve ayrıca sol-jel Ti-PTHF kaplı FFE membranının FT-IR spektrumları Şekil 3.29'de (a-d) verilmektedir.



Şekil 3.31. (a) Metil trimetoksisilan; (b) Titanyum izopropoksit; (c) bozulmamış poli(tetrahidrofuran) polimer; (d) sol-jel Ti-PTHF kaplı FFE membranının FT-IR spektrumları.

MTMS, FT-IR spektrumunun dikkate değer özellikleri arasında, sol-jel öncüsü MTMS'deki merkezi Silika atomuna bağlı CH₃'ün titreşimlerine karşılık gelen 1265 cm⁻¹ ve 787 cm⁻¹ bantları yer alır. 1188 cm⁻¹ ve 1072 cm⁻¹'deki bantlar Si-O-CH₃'ün C-O gerilme titreşimine atfedilir. 2839 cm⁻¹ ve 1466 cm⁻¹'deki soğurma bantları, Si-O-CH₃'ün sırasıyla C-H gerilmesine ve bükülme titreşimine atfedilir (Sidiropoulou et al., 2022). Kaplamasız selüloz kumaşın FT-IR spektrumundaki önemli soğurma bantları, C-H bükülme titreşimine atfedilen 1024 cm⁻¹'deki bandı içerir. 2900 cm⁻¹'deki bant, selüloz yapısının C-H gerilme

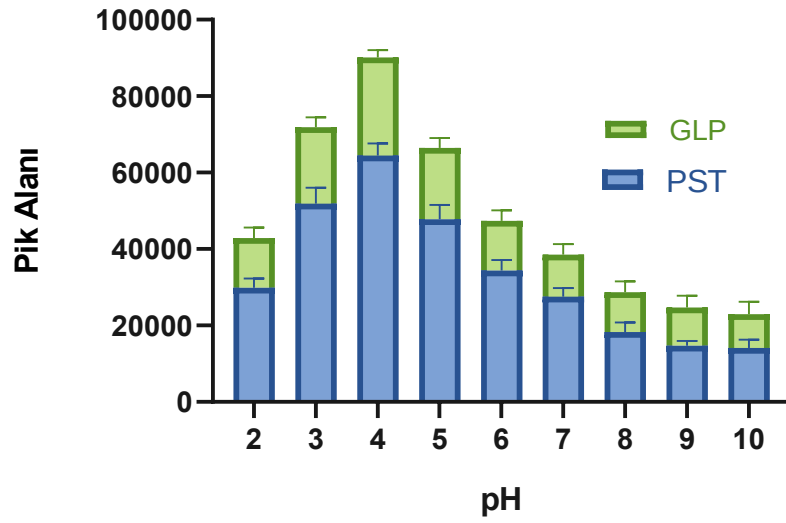
titreşimine atfedilir. 1427 cm^{-1} ve 1369 cm^{-1} 'deki bantlar, hemiselüloz ve ligninin aromatik halkalarında bulunan C–H gerilme titreşimlerini ve C–O gruplarını temsil eder. Ti(IV) izopropoksit FT-IR spektrumunun en önemli özellikleri, alifatik C–H gerilmesine ve C–H alken bükülmesine ait sırasıyla 2949 cm^{-1} ve 995 cm^{-1} bantlarını içerir. PTHF spektrumundaki ana bantlar, metil grubunda bulunan C–H'nin titreşimine karşılık gelen 2858 cm^{-1} ve CO grubuna karşılık gelen 1095 cm^{-1} 'dir (Moumen vd., 2019). Sol-jel Ti-PTHF'nin IR spektrumunda, sol çözeltisinde kullanılan yapı taşlarının FT-IR spektrumlarında da bulunabilen birçok bant ortaya çıkmaktadır. Farklı spektral bantların sol-jel Ti-PTHF kaplamada ve yapı taşı bileşenlerinde aynı anda ortaya çıkması, yapı taşı bileşenlerinin sol-jel Ti-PTHF kaplı FFE membranına başarılı bir şekilde entegre edildiğinin göstergesidir (Manousi vd., 2022).

3.5.2. FFE Yönteminin Optimizasyonu

Yapılan optimizasyonlar çalışma ortamının pH'sı, desorpsiyon için uygun çözgen seçimi, çözgen hacmi, adsorpsiyon süresi, desorpsiyon süresi, linear aralık gibi ekstraksiyon parametreleri ile kolon seçimi, hareketli faz bileşimi ve örnekleme miktarı gibi kromatografik değişkenlerin optimizasyonu yapılmıştır.

3.5.2.1. Çalışma Ortamı Ph'ının FFE Yöntemi Üzerine Etkisi

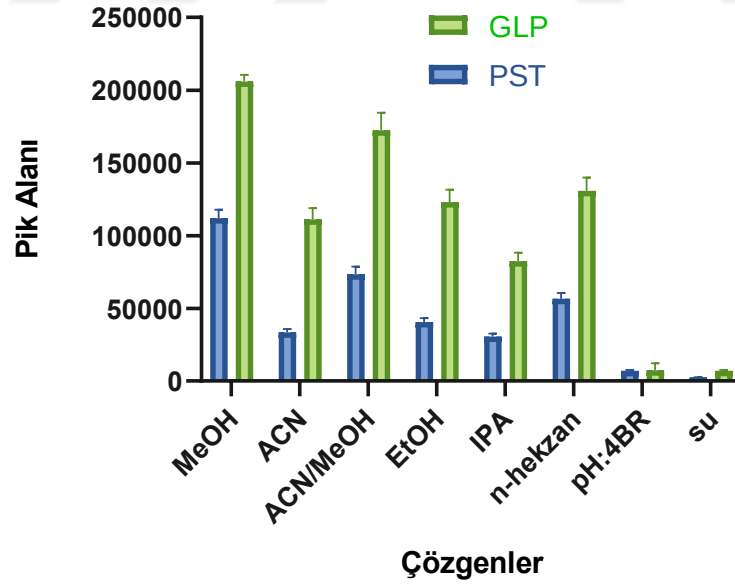
Çözeltilerin pH'ını ayarlamak için tampon çözelti olarak uygulanabilirliği ve geniş çalışma aralığı sunması sebebiyle Britton-Robinson tampon serisi hazırlandı ve bu çalışma için pH 2–10 aralığında tarama yapıldı. Tüplerde bulunan fabrik fazın üzerine sırasıyla pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 BR tamponu eklenir ve en iyi sonuçlar Şekil 3.30'da pH 4 ile elde edilmiştir.



Şekil 3.32. Önerilen yöntemde ortamın pH etkisi

3.5.2.2. Desorpsiyon Çözücüsünün FFE Yöntemine Etkisi

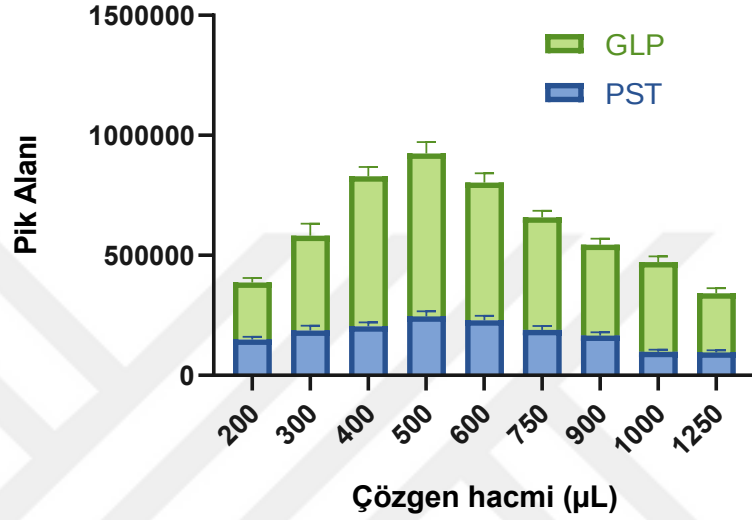
Laboratuvarında mevcut olan uygun çözücüler olarak Metanol(MeOH), Etanol(EtOH), İzopropanol, Asetonitril, Asetonitril/Metanol, n-Hekzan, Aseton , pH 4 ve su kullanılmıştır. 9 ayrı tüp kullanılarak çözücü hariç diğer parametreleri aynı olacak şekilde hazırlanmıştır.İlgili optimizasyon verileri Şekil 3.31’de görülmektedir. En ideal pik Metanol seçilmiştir.



Şekil 3.33. Önerilen yöntemde desorpsiyon çözücüsü etkisi

3.5.2.3. Çözücü Hacminin FFE Yöntemi Üzerine Etkisi

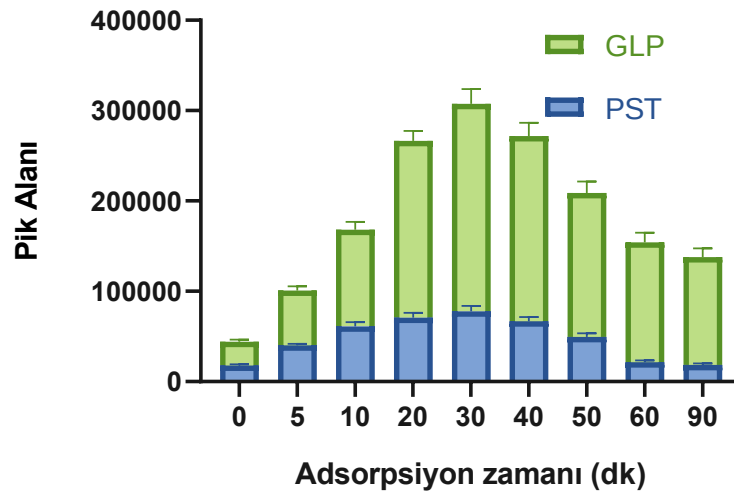
Desorpsiyon çözücüsü belirlendikten sonra en ideal pikleri için çözücü miktarı tayin edilmiştir. Daha önce ideal çözgen olarak seçilen Metanol kullanılarak 9 deney tüpüne deney parametreleri aynı kalacak şekilde zenginleştirme işlemi sağlanmıştır. En ideal sinyal 500 μ L Metanolde elde edilmiştir. Optimizasyon ile ilgili veriler Şekil 3.32’ de görülmektedir.



Şekil 3. 34. Önerilen yöntemde çözücü hacmi etkisi

3.5.2.4. Adsorpsiyon Süresinin FFE Yöntemi Üzerine Etkisi

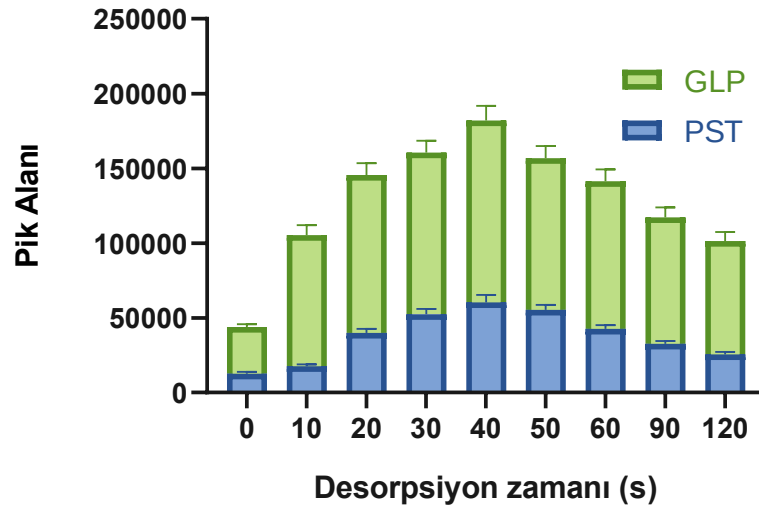
Adsorpsiyon süresini belirlemek için rotatör cihazı ile 0,5,10,20,30,40,50,60,90 dakika olarak farklı sürelerde çalışılmıştır ve 30 dakika çalkalanarak rotatörde kalan tüp en iyi sinyalin olduğu tüp olarak gözlemlenmiştir. İlgili optimizasyon verileri Şekil 3.33’de verilmiştir. Bu sürenin üzerinde hedef molekül ile fabrik faz arasındaki etkileşim fiziksel olduğundan hedef molekül ayrılmaya başlar ve pik alanı azalır, bu sürenin altında ise yeteri kadar etkileşim sağlanmamıştır.



Şekil 3.35. Önerilen yöntemde adsorpsiyon süresi etkisi

3.5.2.5. Desorpsiyon Süresinin FFE Yöntemi Üzerine Etkisi

Çözücü içerisinde analitin çözünme miktarında etkili olan desorpsiyon süresini tayin edebilmek için 9 ayrı tüpe zenginleştirme parametreleri aynı olan fakat 0 ile 120 saniye arasında vorteks cihazına bırakılmıştır. En ideal sinyallerin elde edildiği vorteksleme zamanı 40 saniye olarak belirlenmiştir. İlgili optimizasyon verileri Şekil 3.34'da görülmektedir.



Şekil 3. 36. Önerilen yöntemde desorpsiyon süresi etkisi

3.5.3. Geliştirilen FFE Yönteminin Gerçek Örnek Uygulaması

Geliştirilmiş olan FFE temelli bu kromatografi yönteminin hem doğruluğu hem de kesinliğini test etmek için, sentetik idrar, yapay tükürük ve ilaç numune çözeltileri üzerinden geri kazanım çalışmaları yapıldı. Sentetik idrar, sentetik tükürük ve ilaç numunelerine çözeltilerine eklenen (spike edilen) miktarlar üzerinden yapılan geri kazanım çalışmaları ile bu yöntemin %geri kazanım değerleri hesaplandı. Her bir ekleme miktarı üzerinden 5 tekrarlı yapılan analizlerle de yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirliği % bağıl standart sapma hesaplandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.12’de sunulmuştur.

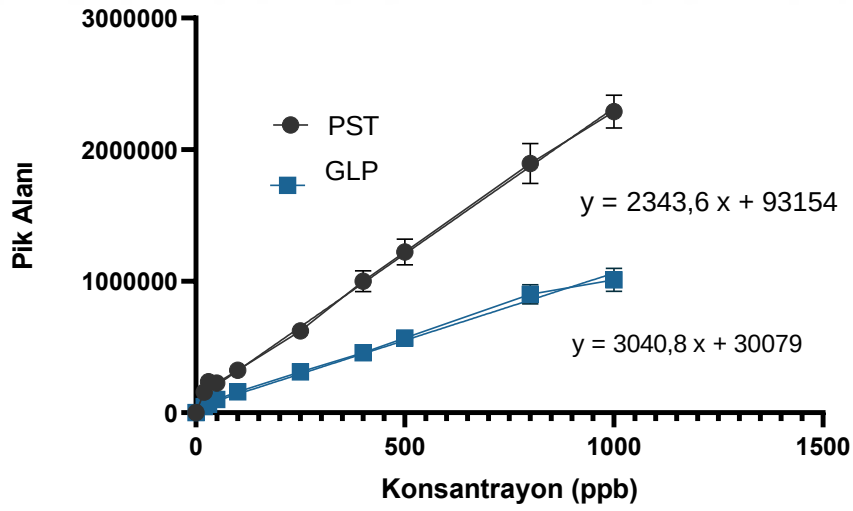
Çizelge 3.12. Geliştirilen FFE yöntemi gerçek örnek uygulama sonrası elde edilen sonuçlar

Örnekler	Eklenen ng mL ⁻¹	Bulunan ng mL ⁻¹		% BSS		%Geri Kazanım	
		GLP	PST	GLP	PST	GLP	PST
Sentetik İdrar Çözeltileri	0.0	<GS	<GS	-	-	-	-
	250.0	253.4 ± 12.4	240.8 ± 13.6	4.9	5.6	101.4	96.3
	500.0	493.5 ± 22,4	489.6 ± 25.7	4.5	5.2	98.7	97.9
Sentetik Tükürük	0.0	<GS	<GS	-	-	-	-
	250.0	236,4±11,2	240,5±12,4	4,7	5,2	94,6	96,2
	500.0	471,5±19,8	486,5±20,4	4,2	4,2	94,3	97,3
İlaç Örneği	0.0	<GS	<GS	-	-	108,	106,
	250.0	271,4±15,1	265,4±12,4	5,6	4,7	6	2
	500.0	519,4±24,7	541,2±26,3	4,8	4,9	103,9	108,2

N:5

3.5.4. Geliştirilen FFE Yöntemin Analitik Performans Ölçütleri, Validasyon Parametreleri

Belirlenen validasyon parametreleri ICH klavuzlarında belirtildiği gibi hesaplanmıştır. Doğrusallık çalışması için her iki ilaç molekülünü de içeren bir seri model çözelti hazırlandı ve bunların pik alanları, GLP ve PST standartlarının konsantrasyonuna göre grafiğe geçirildi. Şekil 3.35’de verilmiştir. FFE sonrasında 100 ng mL^{-1} konsantrasyon için % RSD’ler hesaplandı. Ön-konsantrasyon faktörü, FFE öncesi ve sonrası numune hacminin oranında doğrudan bulundu. Zenginleştirme faktörü, her iki ekstraksiyon yöntemi için öncesi ve sonrası kalibrasyon grafiklerinin eğimi dikkate alınarak hesaplandı. Tüm parametreler üç tekrarlı deneylerle değerlendirildi. Zenginleştirme ve iyileştirme faktörleri birlikte değerlendirildiğinde geliştirilen FFE yönteminin analitik performans parametreleri üzerindeki etkisi net bir şekilde görülmektedir. FFE öncesinde doğrudan YPSK ile yapılan analizlerde ppm seviyesinde tayinler yapılabilirken FFE sonrasında ppb düzeyinde analizler yapılabilir. Geliştirilen yöntemde tüm analitik performans ölçütleri FFE öncesi ve sonrası kıyaslamalı bir şekilde Çizelge 3.11’ de sunulmuştur.



Şekil 3.37. Optimum koşullar altında FFE sonrası elde edilen kalibrasyon doğruları

Çizelge 3.13. Önerilen FFE yöntemin analitik parametreleri

Parametreler	FFE Öncesi		FFE Sonrası	
	Glipizid	Pravastatin Sodyum	Glipizid	Pravastatin Sodyum
Doğrusal aralık	1.00-20.00 µg mL ⁻¹	1.00-20.00 µg mL ⁻¹	20.00-1000.00 ng mL ⁻¹	15.00-1000.00 ng mL ⁻¹
Gözlenebilme sınırı^a	0.32 µg mL ⁻¹	0.36 µg mL ⁻¹	6.28 ng mL ⁻¹	4.23 ng mL ⁻¹
Tayin sınırı^b	0.95 µg mL ⁻¹	0.90 µg mL ⁻¹	18.82 ng mL ⁻¹	14.14 ng mL ⁻¹
Kalibrasyon Duyarlılığı	65.1	72.4	2343.6	3040.8
Determinasyon Katsayısı (R²)	0.9942	0.9914	0.9945	0.9965
Zenginleştirme Faktörü^c	-	-	20	20
İyileştirme Faktörü^d	-	-	36	42

^{a,b} ICH Guidelines kaynağında ifade edildiği şekilde hesaplandı.

^c Zenginleştirme faktörü; başlangıçtaki sulu faz hacminin(10 mL) ,zenginleştirme sonrası elde edilen hacme (0.5 mL) oranı alınarak hesaplandı.

^d Zenginleştirme öncesi ve sonrası kalibrasyon grafiklerinin eğimleri oranlanarak hesaplanmıştır.

4. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında yeni bir YPSK temelli analitik yöntem geliştirilip valide edilmiştir ve numune hazırlama yöntemi olarak iki farklı katı faz ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. Kullanılan hedef analit ise GLP ve PST aynı anda analizi yapılmıştır. Hedef analit olarak bu etken maddelerin seçilme nedeni son yıllarda birlikte kullanımının artmasıdır. Literatürden edinilen ve son yıllarda araştırmalara göre diyabet hastalarının tedavi protokollerine statin grubunun da eklendiği görülmektedir bunun sebebi ise diyabetli bireylerin kardiyovasküler risk faktörü taşımasıdır. Bu nedenle statin ve sülfonilüre grubu ilaçların birlikte reçete edilme sayısı artmıştır (Eldor ve Raz, 2009). Önerilen YPSK-DAD yöntemi geçerliliğinin sağlanması için ICH klavuzuna göre validasyon parametreleri çalışılmıştır. Doğrusallığa bakıldığında elde edilen kalibrasyon grafiklerinin korelasyon katsayıları 1'e yakındır, r^2 değerleri GLP ve PST için 0,9989 ve 0,9959'dur bu değerlere göre doğrusallık ICH klavuzuna uygundur.

Özgünlük çalışması için ortama elimizde bulunan farklı sülfonilüre grupları ve Metformin HCl eklenmiştir. Metformin HCl eklenmesinin sebebi analiz edilecek ortamda bulunan diğer bileşenlere karşı seçiciliğinin olup olmadığını görmektir. Bu analiz sonuçlarında ise manyetik katı faz ve fabrik faza GLP ve PST dışında hiçbir sülfonilüre grubu etken madde tutunmamıştır sadece ortamda bulunan Metformin HCl tutunmuş ve kromatogramda sinyali belirlemiştir fakat bu sinyal hedef analitlerin piklerini etkilememiştir. Metformin HCl pikinin doğruluğunu tespit etmek için standart kromatogramı ve spektrumunu çalışmada verilmiştir. Seçicilik çalışması başarıyla uygulanmış ve hedef analitlere seçici katı fazların kullanıldığı anlaşılmıştır. Tayin ve gözlenebilir sınırlarının belirlenmesi yeni geliştirilen bir yöntem için çok kıymetlidir çünkü bu tespit edilen sınırlar yöntemin hassasiyetini gösterir. Yapay biyolojik sıvıların kullanıldığı bu yöntemde eser düzeyde etken maddelerin analizinin yapıldığını ispat edebilmek için GS ve TS değerleri hesaplanmış ve bu değerler çalışma aralığı içinde kabul edilebilir seviyededirler. Kesinlik çalışmaları için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışılmış bunun için ICH'in istediği yüzde bağıl hata değerleri hesaplanmış klavuza uygun olan % 6 'ın altında değerler bulunmuştur. Sağlamlık parametresi yöntemin şartların değişimine karşı aynı sonuçları verebildiğini göstermek için çalışılmıştır. Bu amaçla enjeksiyon hacmi farklı hacimlerde denenmiştir hacim arttıkça sadece pikin yüksekliği artmaktadır ve bu çalışmada eser düzeyde analiz önemki olduğundan kullanılan enjeksiyon

hacmi uygundur. Kolon sıcaklığı ve mobil faz oranı da çalışılmış ve bu çalışma için kullanılan parametrelerin uygun olduğu görülmüştür.

Manyetik katı faz ekstraksiyonu için laboratuvarımızda manyetik katı destek maddesi sentezlenmiş ve Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi tarafından karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır bunun yapılma sebebi sentezlenen malzemenin yapısını aydınlatmaktır. Bu çalışmadaki malzemede önce Fe_3O_4 tanecikleri oluşmuş üzeri Tetra etil orto silikat (TEOS) ile kaplanıp uçlarına Melanin maddesi bağlanmıştır. Bu malzemenin tahmin edildiği şekilde oluştuğunu ispat etmek için FTIR, TEM, XRD, Raman sonuçları alınmıştır. Elde edilen veriler ışığında FTIR görüntülerinde oluşan magnetitten kaynaklı Fe-OH bağlarının gerilme bandı tespit edilmiştir. C-N, C=O, C-OH gibi fonksiyonel gruplar tespit edilmiştir ve bunların TEOS ve Melaninden kaynaklandığını göstermektedir. XRD spektrumunda ise yine daha çok metallerle özgü spesifik kırınım pikler gözlenir bu sentezlenen malzemenin bileşenlerine uygun spektrumlar elde edilmiştir. Kullanılan katı malzemenin homojenliği çalışmanın her kullanımında aynı verimi sağlaması açısından önemlidir TEM görüntüleri sayesinde $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ -Melanin yapısının morfolojik yüzeyi incelenmiştir farklı yakınlaştırmalarla görüntüler alınmıştır. FFE membranının oluk gözenekleri, bir KFE diskini veya kartuşunu taklit eden ekstraksiyon sistemi boyunca bir akış sağlar. Hedef analitleri içeren sulu numune matrisi, ekstraksiyon işlemi sırasında sürekli olarak FFE membranından geçer ve analitler ekstraksiyon işlemini kolaylaştırmak için sol-jel sorbent ile etkileşime girer. Bu nedenle sol-jel sorbent kaplı FFE membranının geçirgenliğinin korunması gerekmektedir. Bunun sonucunda homojen bir yüzeye sahip olduğu tespit edilmiştir. Raman spektrumunda ise Qin vd., tarafından yapılan çalışmada Melanin molekülünün spektrumu dalga boyu belirlenmiş ve bu çalışma için alınan spektrumlarda bu dalga boyunda pik tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. İdeal optimizasyon parametrelerinin karşılaştırmalı sonuçları

Optimizasyon Parametreleri	MKFE Yöntemi	FFE Yöntemi
pH	pH:4	pH:2
Solvent	İzopropil alkol	Metanol
Solvent Hacmi (μL)	500 μL İPA	500 μL MeOH
Adsorpsiyon zamanı (dk)	40 dk	30 dk
Desorpsiyon zamanı (s)	30 s	40 s

Manyetik ve fabrik katı faz ekstraksiyonu için optimizasyon parametreleri çalışılmış ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.1’de verilmiştir. İdeal pH değerleri her iki yöntem için asidik bölgede belirlenmiştir bunun sebebi hedef analitlerin pKa değerleri veya kullanılan katı yüzeyin yükü etkilidir analitlerin pKa değerleri asidiktir. Ortamın pH’ı değiştiğinde katı azla hedef analitin tutunmasını etkilenir bu yüzden ilk çalışılan parametredir. Desorpsiyon solventi seçiminde elimizde bulunan organik çözücüler denenmiştir ideal organik solventin polaritesi ve molekül yapısı katı fazı tutup tekrar bırakmasında etkilidir bu adsorpsiyon aşamasında solventle analit bileşenleri arasında fiziksel bir bağlanma gerçekleşir solventin yapısında bulunan hidrofil ve hidrofobik uçların yeri ve sayısı bu aşamada önemlidir.İdeal solventler FFE ve MKFE’de farklı çözücü türleri olarak belirlenmiştir bunun sebebi ise katı fazların yapısının farklı olmasıdır. Solvent türü belirlendikten sonra bu solventten desorpsiyon aşamasında ne kadar kullanılacağı da çalışılmıştır çünkü bu aşamada kullanılan hacim ile zenginleştirme faktörü hesabı yapılmıştır. Kullanılacak olan miktar 200 µL altında olursa cihaz tarafından okunamaz ideal miktarın üzerinde ise çözelti seyrelir ve zenginleşme oranı düşer bu şartlarda en ideal miktarlar belirlenmiştir. Adsorpsiyon ve desorpsiyon süresi ise katı faz ile hedef analitlerin daha iyi etkileşmesini sağlamak aynı zamanda uzun süre etkileştiğinde desorbe olmasını engellemek amacıyla en ideal olan süreler belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Analitik performans parametreleri karşılaştırma tablosu

Parametreler	MKFE ile Zenginleştirme Sonrası		FFE ile Zenginleştirme Sonrası	
	GLP	PST	GLP	PST
Doğrusal aralık	10.0-750.0 ng mL ⁻¹	10.0-750.0 ng mL ⁻¹	20.0-1000.0 ng mL ⁻¹	15.0-1000.0 ng mL ⁻¹
Gözlenebilme sınırı^a	3. 03 ng mL ⁻¹	3.17 ng mL ⁻¹	6.28 ng mL ⁻¹	4.23 ng mL ⁻¹
Tayin sınırı^b	9.09 ng mL ⁻¹	9.50 ng mL ⁻¹	18.82 ng mL ⁻¹	14.14 ng mL ⁻¹
Kalibrasyon Duyarlılığı	1452.1	681.4	2343.6	3040.8
Determinasyon Katsayısı (R²)	0,9994	0,9990	0.9945	0.9965
Zenginleştirme Faktörü^c	20	20	20	20
İyileştirme Faktörü^d	52	58	36	42

MKFE VE FFE Yöntemlerinin t ve F Testiyle Değerlendirilmesi

Geliştirilen yöntemlerden elde edilen sonuçlar aynı model çözeltiyle 5 tekrarlı yapılan ölçümlerin sonuçları t ve F testiyle 250 ng mL⁻¹ standart eklemeli analiz sonuçları karşılaştırılarak tablodaki gibidir.

Çizelge 4.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri için uygulanan t ve F testi sonuçları

	MFKE	FFE	
N	5	5	
Ortalama	253.7	253.4	
Standart sapma	15.4	12.4	$t_{kritik} > t_{deneysel}$
$t_{deneysel}$	$\frac{x_1 - x_2}{S_{bir} \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}} = 0.03$		
t_{kritik}	Serbestlik derecesi =8 için % 95 Güven düzeyinde $t_{kritik} = 2.31$		
$F_{deneysel}$	$\frac{s_1^2}{s_2^2} = 1.54$		$F_{kritik} > F_{deneysel}$
F_{kritik}	% 95 Güven seviyesinde $F_{kritik} = 2.93$		

F ve t testi için sentetik idrar örneğinden hesaplanan sonuçlarında kritik değerler deneysel değerlerden büyük olduğu için MKFE ve FFE yöntemleri arasındaki fark anlamsız hata olarak kabul edilir.

Optimizasyonu tamamlanan parametreler sonrasında optimum şartlarda yapılan deneylerde gerçek örnek olarak yapay idrar, yapay tükürük ve ilaç numuneleri literatürde belirtilen doğrultuda hazırlanmıştır. Bu numunelerin kullanılma amacı gerçek biyolojik örnek ortamını oluşturarak hedef ilaçları kullanan bireylerden analizi taklit ederek bir analitik yöntem geliştirmektir. Hazırlanan numuneler analiz edilmiş sonra hedef analitleri içeren standartlar eklenerek geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Çalışılan bu parametreler sayesinde yöntemin belirsiz hataları belirlenmiş olur. Bu değerler literatüre göre BSS %10 un altında geri kazanım ise %95-105 arası istenmektedir bu çalışmada bulunan değerler bu aralıktadır. Yöntemin analitik performans ölçütlerini belirlemek için uygulanan

FFE ve MKFE yöntemlerinin öncesi ve sonrası parametreler değerlendirilmiştir. Çalışma aralığı, GS ve TS değerleri ppm düzeyinden ppb düzeyine inerek eser analizin önemli olduğu bu tez çalışmasında hedef analitler tayin edilebilir düzeye gelmiş yani zenginleştirme sağlanmıştır.

Çizelge 4. 4. Geliştirilen yöntemin literatürdeki yöntemlerle karşılaştırma sonuçları

Analiz Yöntemi	Numune Hazırlama Metodu	Hedef Analit	Doğrusal Aralık	GS	Numuneler	Kaynak
LC-MS/MS	KFE	PST	0.5-200 ng/mL	0.5 ng/mL	Plazma	(Jain vd., 2007)
YPSK	-	PST	28 -52 µg/mL	4.81 mg/mL	Tablet	(Silva vd., 2012)
UYPSK–MS/MS	MEPS	PST	5–500 nmol/L	1.5 nmol/L	Rat plazma ve idrarı	(Vlčková vd., 2012)
RP-YPSK-UV	LLE	GLP	50-600 ng/mL	5.0 ng/mL	İnsan plazması	(Atif vd., 2013)
YPSK-MS/MS	KFE	GLP	2.55–408 ng/mL	2.55 ng/mL	İnsan plazması	(Li vd., 2013)
YPSK	IPKFE	GLP	25-1000 ng/mL	4,5 ng/mL	Plazma	(Aburuz vd., 2005)
UV-Spektrometri	-	GLP	1–7 µg/mL	0.5281 µg/mL	Farmasötik ilaç	(Shirode vd., 2022)
YPSK-DAD	MKFE FFE	GLP	10-1000 nrdg mL ⁻¹	3.03 ng mL ⁻¹	Sentetik idrar Sentetik tükürük İlaç numunesi	Önerilen Yöntem
		PST	10-1000 ng mL ⁻¹	3.17 ng mL ⁻¹		

Jain vd., insan plazmasında pravastatin tayini için katı faz ekstraksiyonu (KFE) kullanan LC-MS/MS yöntemi geliştirmiştir. Ekstraksiyon prosedürü, pravastatin ve IS için sırasıyla %107,44 ve %98,93 geri kazanım ile verilmiştir. Valide edilen bu yöntem, pravastatinin farmakokinetik çalışmasında 18 sağlıklı insan gönüllüsünde 40 mg'lık formülasyonunun tek oral dozu için ayrıca değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan MKFE ve FFE yöntemleri bu literatürdeki KFE yöntemine göre daha seçici olup ekstraksiyon daha hızlı ve basittir ayrıca daha fazla numune üzerinde çalışılması tez çalışmasının avantajıdır.

Silva vd., ilaç veya dozaj formlarında lovastatin, pravastatin sodyum veya simvastatin miktarını belirlemek için 28 ila 52 µg/mL doğrusal aralıkta ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile basit ve hızlı bir yöntem doğrulamasını göstermektedir. Geliştirilen yöntem için doğrusalılık ($r > 0.999$), doğruluk (%98.8-101.6), kesinlik (bağıl standart sapma $< \%2$) ve plasebo ve/veya bozunma ürünlerine karşı seçicilik gösterir. Ekstraksiyon yöntemi kullanılmamıştır ve yöntem valide edilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan linear aralık bu literatür çalışmasına göre daha geniştir aynı zamanda ekstraksiyon yöntemi kullanılmaması ve seçicilik üzerine çalışma yapılmaması dezavantajıdır.

Vickova vd., miktar tayini için ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (UYPSK-MS/MS) aracılığıyla sıçan plazması ve idrarında pravastatin ve pravastatin lakton tayini için basit ve tekrarlanabilir bir yöntem rapor edilmiştir. Örnek hazırlama MEPS yani mikroekstraksiyondan oluşmuştur. Tez çalışmasında ise sentetik idrar, tükürük ve ilaç numuneleri kullanılmıştır. Metot geri kazanımı plazma numuneleri için %97-109 ve idrar numuneleri için %92-101 arasında değişmiştir. BSS yüzdesi olarak ifade edilen gün içi kesinlik plazma numuneleri için %8'den ve idrar numuneleri için % 7'den düşüktür. Tez çalışmasında ise % BSS %6'dan düşüktür. Yöntem, plazma ve idrar örneklerinde GS 1,5 nmol/l ve TS 5 nmol/l'ye ulaşan hassasiyetle doğrulanmıştır. Tez çalışmasında ise PST için GS değeri 3.17 ng mL⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Atif vd., insan plazmasında Glipizid tayini için UV dedeksiyonlu basit, hassas ve seçici bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Plazma örneklerinden ilacı ekstrakte etmek için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Tez çalışmasında ise üç farklı numune için MKFE ve FFE ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak daha seçici, hızlı ve zenginleştirme sağlayan yöntemler kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi 50-1600 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldı. Gün içi ve günler arası kesinlik değerleri %15'in altındaydı. Miktar belirleme sınırı 50 ng/mL ve

ortalama geri kazanım %98'in üzerindeydi. Tez çalışmasında kesinlik değeri %6'nın altında TS değeri 18.82 ng/mL ve %geri kazanım %98.6 ile %108.6 arasındadır yani tez çalışmasında sunulan veriler bu çalışmaya göre kesinlik, doğruluk ve hassasiyet yönünden daha üstündür.

Li vd., insan plazmasında metformin ve glipizidin eş zamanlı olarak belirlenmesi yüksek performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (YPSK-MS/MS) yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. MS dedektör kullanıldığı için Doğrusal kalibrasyon eğrileri metformin için 4.10-656 ng/mL ve glipizid için 2.55-408 ng/mL konsantrasyon aralıklarında elde edilmiştir. Gün içi ve günler arası hassasiyetin bağıl standart sapması %10'un altındaydı ve doğruluğun bağıl hatası % 7.0 ile %4.6 arasındaydı. Sunulan YPSK-MS/MS yönteminin glipizid için uygun olduğu kanıtlanmıştır. Doğrusal aralık tez çalışmasında daha geniştir ve %BSS değeri %6'nın altında olduğundan bu literatüre göre daha avantajlıdır. Li ve arkadaşlarının sunduğu bu literatürün GS değerinin daha düşük olması ve plazmaya uygulanması yönünden daha üstündür.

Aburuz vd., bu makalede, plazmada metformin ve glipizid, gliklazid, glibenklamid veya glimeperidin eş zamanlı tayini için SPE ve YPSK yöntemlerinin geliştirilmesi açıklanmaktadır. Bu analitlerin her birinin plazmada ayrı ayrı tayini için daha önce çeşitli ekstraksiyon ve YPSK yöntemleri tanımlanmıştır. Bu analitlerin eş zamanlı tayini, kombinasyon ilaçları alan diyabetik hastaların rutin takibi ve kombine dozaj formlarının farmakokinetiğinin incelenmesi için önemlidir. Geliştirilen yöntemlerin geri kazanımları %76,3 ile %101,9 arasında bulunmuştur. Miktar belirleme sınırları 5 ila 22,5 ng/ml arasındadır. Doğruluk (% bağıl hata ile ölçülmüştür) her zaman %12'den az olmuştur. Geliştirilen bu yöntemin tez çalışmasına göre üstünlüğü birden çok antidiyabetik ilacı aynı anda analiz edebilmesidir fakat GS değeri ve kesinlik değeri olarak tez çalışması daha üstündür.

Shirode vd., Glipizid tayini için bir TF-YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Önerilen yöntem, 1-7 µg mL⁻¹ aralığında doğrusal bulunmuştur. GLP için TS ve TAS sırasıyla 0.5281 ve 1.761 µg mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Valide edilen yöntem, şirket içi formülasyon ve pazarlanan formülasyonlardan GLP'nin kantitatif tayini için uygulanmıştır. Tez çalışmasında zenginleştirme adımı uygulanmıştır ve TS değeri ppb seviyesinde olup bu literatüre göre hassasiyeti daha iyi olduğunu gösterir aynı zamanda doğrusal aralık tez çalışmasında daha geniştir.

Bu tez çalışmasında önerilen yöntem ise literatürde daha önce yayımlanmamış Glipizid ve Pravastatin sodyumun aynı anda analizini YPSK-DAD aracılığıyla iki farklı ekstraksiyon ve zenginleştirme adımıyla numune hazırlanması sonrası sentetik idrar, sentetik tükürük ve farmasötik ilaç numunelerine uygulanmıştır. Valide edilen yöntem için gün içi günler arası kesinlik hesaplanmış ve % bağıl standart sapma cinsinden % 6.1 nin altında tespit edilmiştir. Doğruluk için geri kazanım çalışmaları yapılmış ve % 98,5-103,3 arasında kabul edilmiştir. GS değerleri GLP için 3.03 ng mL^{-1} ve PST için 3.17 ng mL^{-1} seviyelerinde olup diğer yöntemlerden üstündür. Numune hazırlama yöntemlerinde kullanılan katı malzemeler hedef analite özgüdür ve katı destek malzemeleri karakterize edilmiştir bu yönden de geliştirilen yöntem başarılı ve üstündür. Tez çalışmasının hedef moleküllere seçici olması ve orijinal bir çalışma olması bakımından diğer yapılan çalışmalara göre üstündür.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son zamanlarda dünyada ve ülkemizde yaşlı bireylerin yanı sıra yetişkin ve genç bireylerde diyabet ve hiperlipidemi rahatsızlıklarının görülme oranının yükselmektedir ve bu hastalıkların tedavisinde sık sık reçete edilen ilaçların analizi için yeni analitik yöntemler geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu tez konusu kapsamında Tip 2 Diyabet tedavisinde kullanılan Glipizid (GLP) molekülü ile birlikte antihiperlipidemik ve antihipertansif etkili Pravastatin Sodyum (PST) etken maddesinin yapay idrar, yapay tükürük ve tablette YPSK-DAD cihazıyla model çözeltilerden tayini yapılmıştır. Analiz yapılmadan önce bu etken maddelerin hazırlanan model çözelti ortamlarından özgün bir şekilde ayrılıp YPSK cihazında eser miktarlarda okunması amacıyla ayırma ve zenginleştirilme basamağı uygulanmıştır. Ekstraksiyon ve zenginleştirmeyi sağlamak için hedef analite özgü sentezlenen katı destek maddeler kullanılmıştır hem Manyetik temelli katı faz ekstraksiyonu (MKFE) hem de Fabrik faz ekstraksiyonu (FFE) ile çalışılmış elde edilen tüm veriler (grafikler, optimizasyon, validasyon verileri gibi) Bulgular bölümünde verilmiştir. Bir analitik yöntem geliştirilmesi sonucu yapılan tüm analizlerde istenen parametreler; organik çözücünün daha az harcanması, zamandan tasarruf sağlaması ve maliyetinin düşük olması, örnek hazırlama adımının kolay uygulanması, organik çözücülerin yeşil kimyaya uygun yani çevreci olmasıdır. Bu amaçlar doğrultusunda tez çalışmasında kullanılan katı faz ekstraksiyon yöntemleri temel olarak analiz edilmek istenen analit bileşenlerini çözünmüş halde bulunmaktadır. Uygulanan MKFE ve FFE sayesinde katı destek maddesine tutunan analitler daha düşük hacimdeki bir çözügene geçişi sağlanarak zenginleştirme işlemi meydana gelmektedir. Böylece kullanılan YPSK cihazının tespit edebileceği seviyeden daha düşük çözeltiler de bile analizi kolaylaşmıştır. Bu çalışmada yapay tükürük, yapay idrar ve tabletlerde eser düzeyde bulunabilecek olan GLP ve PST moleküllerinin eş zamanlı tayinleri için daha önceki ilgili yayınlardan faydalanarak en uygun tayin şartları belirlenmiştir. Belirlenen tayin koşulları verilmiş böylece yeni bir analitik yöntem geliştirilerek hedef ve amaçlara ulaşılmıştır. GLP ve PST moleküllerinin YPSK-DAD analizi için yürütücü faz olarak % 45 pH 3.0 Fosfat tamponu ,%55 Asetonitril 1.0 mL dk-1 akış hızıyla izokratik elüsyon modunda kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin kalibrasyon sonuçları çizelge halinde gösterilmiştir. Her iki ekstraksiyon metodu için ortam pH'sı ve katı faz destek maddesinin miktarı veya boyutu, ideal desorpsiyon çözücü türü ve miktarı, katı faza tutunma süresi ve katı fazdan analit bileşenlerinin geri bırakılması için gerekli süreler olmak üzere tüm parametreler optimize edildi. Optimizasyon grafikleri ve gerekli veriler sunulmuştur. ICH klavuzuna göre doğruluk, kesinlik, sağlamlık gibi validasyon parametreleri çalışılmış ve

yöntem valide edilmiştir. Böylece hedef analitler için en uygun tayin şartları oluşturulmuştur. Hedef etken maddelere seçici katı destek maddeleri sentezlenerek ve temin edilmiş sonrasında MKFE ve FFE yöntemleriyle hem ayırma hem de zenginleştirme basamağı gerçekleşmiştir ve cihazın okuyacağı seviyeye gelmiş olur. Önerilen bu yöntem sentetik idrar, sentetik tükürük ve tablet çözelti örnekleri ile standart eklenerek validasyon sonuçları verilmiştir ve tüm değerler kabul edilebilir aralıktadır. 3 tekrarlı yapılan standart eklemeli geri kazanım çalışmaları sayesinde yöntemleri % geri kazanım olarak doğruluğu, % Bağıl standart sapma (%BSS) olarak ise tekrarlanırlıkları hesaplanmıştır. Hedef etken maddelerin her ikisi içinde geliştirilen yöntemlerin % BSS değerleri MKFE için % 5,5' in altında ve FFE için %5,6'nın altında yani kabul edilebilir seviyede bulunmuştur. Ayrıca uygulamada kullanılan 3 örnek tipi için doğrudan okuma ve standart ekleme yöntemleri ile elde edilen % geri kazanım değerleri MKFE yöntemi için %95,5-104,9 FFE yöntemi için %94,3-%103,9 arasında olup, kabul edilebilir seviyededir. GS, TS, doğrusal aralığı, kalibrasyon duyarlılığı, zenginleştirme ve iyileştirme faktörleri karşılaştırmalı olarak ekstraksiyon öncesi ve sonrasında verilmiştir. Bu karşılaştırmalar sonucunda doğrusal aralık, tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı değerleri ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) seviyesinde iken ekstraksiyon ve zenginleştirme adımından sonra ppb (ng mL^{-1}) seviyelerine düşmüştür böylece eser düzeyde hedef analit cihazın okuyabileceği oranlara çıkmıştır. Zenginleştirme faktörü parametresi deneyde başlangıçtaki çözelti hacminin ekstraksiyon sonrası analiti desorbe etmek için kullanılan desorpsiyon çözgeni hacmine oranı alınarak hesaplanır. Bu çalışmada kullanılan yöntemler için bu faktör 20 olarak hesaplanmıştır.

Literatürde PST ve GLP için ayrı ayrı YPSK yöntemleri ile tayinleri yer almaktadır fakat daha önce hedef analitler için kullanılan ekstraksiyon yöntemleri sonrası eş anlı bir analiz çalışılmamıştır. Ayrıca çalışmanın en önemli kısmı ise MKFE ve FFE metodları bu etken maddelerle yapılan tayinlerde özgün sentezler sonrasında ilk defa bu çalışmada uygulanmıştır. Bu anlamda bu tez çalışması hem numune hazırlama hem de yöntem geliştirme olarak orjinaldir. Tez çalışmasında imkanlar dahilinde özgünlüğü test etmek için farklı statin grupları eklenerek ortamdan hedeflenen analitin ayrılması incelenmesi ve daha geniş bir validasyon çalışması ve farklı biyolojik sıvılardan gerçek numune ortamlarından tayin edilmesi ve yöntem geliştirilmesi önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Abdallah, F. F., Magdy, F., Abdelaleem, E. A. & Emam, A. A. (2022). Spectrophotometric Determination of Metformin in Different Pharmaceutical Combinations With Glipizide or Sitagliptin in Presence of Toxic Impurities of Metformin. *Journal of AOAC International*, 105(3), 657–664. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab171>
- Abrahamson, M. J. (2015). Should sulfonylureas remain an acceptable first-Line add-On to metformin therapy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 38(1), 166–169. <https://doi.org/10.2337/dc14-1945>
- Aburuz, S., Millership, J., & Mcelnay, J. (2005). The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide , gliclazide , glibenclamide or glimiperide in plasma. 817, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.12.018>
- Al-badr, A. A., & Mostafa, G. A. E. (2014). Pravastatin Sodium. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (1st ed., Vol. 39). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800173-8.00008-8>
- Andreu, V., & Pic, Y. (2004). Determination of pesticides and their degradation products in soil : critical review and comparison of methods. 23(10). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.07.008>
- Antunes, M. V., Raymundo, S., Cezimbra Da Silva, A. C., Muller, V. V., Vicente Neto, O. J., Schwartzmann, G., & Linden, R. (2019). Determination of Endogenous Concentrations of Uracil and Dihydrouracil in Dried Saliva Spots by LC-MS/MS: Method Development, Validation, and Clinical Application. *Therapeutic Drug Monitoring*, 41(3), 383–390. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000615>
- Athota, R. V., Jagarlapudi, S. K., & Singampalli, M. R. (2017). Stability Indicating HPLC Method for the Simultaneous Quantification of Aspirin and Pravastatin in bulk and Tablets : Method Development and Validation. 7(03), 48–56. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70308>
- Atif, M., Khalid, S. H., Kit, G. L. O., Sulaiman, S. A. S., Asif, M., & Chandrasekaran, A. (2013). Development and validation of RP-HPLC-UV method for the determination of Glipizide in human plasma. *Journal of Young Pharmacists*, 5(1), 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.jyp.2013.01.005>
- Bauer, S., Mwinyi, J., Stoeckle, A., Gerloff, T., & Roots, I. (2005). Quantification of pravastatin in human plasma and urine after solid phase extraction using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 818(2), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.01.006>
- Bergt, S., Grub, A., Wagner, S., Engelke, H., Nöldge-schomburg, G., Vollmar, B., Roesner, J. P., & Wagner, N. (2017). Pravastatin But Not Simvastatin Improves Survival and Neurofunctional Outcome After Cardiac Arrest and Cardiopulmonary Resuscitation. *JACC: Basic to Translational Science*, 2(2), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.jacbs.2017.01.009>

- Boyacı, E., Rodríguez-lafuente, Á., Gorynski, K., & Mirnaghi, F. (2015). *Analytica Chimica Acta* Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches : Comparison for challenging cases. 873, 14–30. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.12.051>
- Boyacı, E., Bojko, B., Singh, V., Grandy, J. & Pawliszyn, J. (2018). *Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04502>
- Brena, B. M., Pazos, C., Franco-fraguas, L. & Batista-viera, F. (1996). *Chromatographic methods for amylases*. 684, 217–237.
- Brien, R. C. O., Luo, M., Balazs, N. & Mercuri, J. (2000). In vitro and in vivo antioxidant properties of gliclazide. 14, 201–206.
- Buse, J. (2003). Statin Treatment in Diabetes Mellitus. *Clinical diabetes*, 21(4), 168-172.
- Buszewski, B., & Szultka, M. (2012). Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(3), 198–213. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>
- Canseven, V. (2016). Dislipidemi tedavisinde kullanılan bazı ilaçları RPLC yöntemiyle iyonlaşma sabitlerinin tayini. Süleyman Demirel Üniversitesi.
- Chen, C. W., Hsu, W. C., Lu, Y. C., Weng, J. R., & Feng, C. H. (2018). Determination of parabens using two microextraction methods coupled with capillary liquid chromatography-UV detection. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.031>
- Cheng, A. Y., & Fantus, I. G. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. 172(2), 213–226.
- Cheng, V., & Kashyap, S. R. (2011). Weight considerations in pharmacotherapy for type 2 diabetes. *Journal of Obesity*, 2011(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2011/984245>
- Coskun, O. (2016). Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Çubuk, G., & İnce, S. (2014). Oral Antidiyabetik İlaçlar. *Kocatepe Veterinary Journal*, 7, 47–57. <https://doi.org/10.5578/kvj.9120>
- Dadfarnia, S., Mohammad, A., & Shabani, H. (2010). *Analytica Chimica Acta* Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals — A review. 658, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.022>
- Davignon, J. (2004). Beneficial Cardiovascular Pleiotropic Effects of Statins. 39–43. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000131517.20177.5a>
- Dinç, M. (2007). Gıdalara katılan bazı suda çözünen sentetik boyaların belirlenmesi (Master's thesis, Namık Kemal Üniversitesi).

- Douros, A., Dell’Aniello, S., Yu, O. H. Y., Filion, K. B., Azoulay, L. & Suissa, S. (2018). Sulfonylureas as second line drugs in type 2 diabetes and the risk of cardiovascular and hypoglycaemic events: Population based cohort study. *BMJ (Online)*, 362. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2693>
- Eldor, R. & Raz, I. (2009). American Diabetes Association indications for statins in diabetes: is there evidence? *Diabetes Care*, 32 Suppl 2. <https://doi.org/10.2337/dc09-s345>
- Ertürk, S., Önal, A. & Çetin, S. M. (2003). Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 793(2), 193–205. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00314-3](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00314-3)
- Eser, B. & Sepici Dinçel, A. Kromatografiye Giriş Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. 2(2), 51–57. <https://doi.org/10.26567/Johse.2018250150>
- Fernandes, C., Jos, A., Rodrigues, C., Alves, C., & Lanc, F. M. (2007). Solid-phase microextraction – liquid chromatography (SPME – LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface. 847, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.011>
- Haandel, L. van, Gibson, K. T., Leeder, J. S. & Wagner, J. B. (2016). Quantification of pravastatin acid , lactone and isomers in human plasma by UHPLC-MS / MS and its application to a pediatric pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 1012–1013, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.038>
- Halvorsen, B. L., Thomsen, C., Greibrokk, T., Lundanes, E. (2000). Determination of fenpyroximate in apples by supercritical fluid extraction and packed capillary liquid chromatography with UV detection. 880, 121–128
- He, Z., Zhou, Z., Yang, Y., Yang, T., Pan, S. & Qiu, J. (2015). Overview of clinically approved oral antidiabetic agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus. September 2014, 125–138. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12332>
- ICH. (2014). Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology. In Retrieved from the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35099-3_86
- İşli, F. (2022). Yaşlılarda Polifarmasi. *Türkiye Sağlık Okuryazarlığı Dergisi*, 3(3), 171–174. <https://doi.org/10.54247/SOYD.2022.59>
- Jain, D. S., Subbaiah, G., Sanyal, M., Jain, V. K. & Shrivastav, P. (2007). A rapid and specific approach for direct measurement of pravastatin concentration in plasma by LC-MS / MS employing solid-phase extraction. 78(November 2006), 67–78. <https://doi.org/10.1002/bmc>
- Jalili, V., Barkhordari, A. & Ghiasvand, A. (2020). A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews. *Microchemical Journal*, 152 (July 2019), 104319. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104319>

- Jena, B. R., Swain, S., Babu, S. M., Prasad, D., Sasikanth, K., Road, V., Pradesh, A., Campus, G., & Pradesh, A. (2017). International Journal of Drug Research and Technology Uv Spectrophotometric Method Development And Quantitative Estimation Of Glipizide In Bulk And Pharmaceutical Dosage Forms Southern Institute of Medical Sciences , College of Pharmacy , Mangaldas. 7(3), 112–122.
- Kabir, A., Locatelli, M., & Ulusoy, H. (2017). Recent Trends in Microextraction Techniques Employed in Analytical and Bioanalytical Sample Preparation. *Separations*, 4(36), 1–15. <https://doi.org/10.3390/separations4040036>
- Kabir, A., Mesa, R., Jurmain, J., & Furton, K. (2017). Fabric Phase Sorptive Extraction Explained. *Separations*, 4(2), 21. <https://doi.org/10.3390/separations4020021>
- Kataoka, H., Lord, H. L., & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. 880, 35–62.
- Keçili, R., Büyüktiryaki, S., Dolak, I., & Hussain, C. M. (2019). The use of magnetic nanoparticles in sample preparation devices and tools. *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry: Modern Trends in Analysis*, 75–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816699-4.00005-0>
- Kocijan, A., Grahek, R., Bastarda, A., & Zupan, L. (2005). Fast analysis of pravastatin in production media. 822, 311–315. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.05.016>
- Konanç, M. U. (2017). Cu (II), Co(II) Ve Ni (II)-Bis(2-Hidroksi-4- Metoksibenzaldehit) Etilendiamin Komplekslerinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Ayrımı Ve Çevre Örneklerinde Tayinler (Issue Ii).
- Kori, S. (2021). Cloud point extraction coupled with back extraction: a green methodology in analytical chemistry. *Forensic Sciences Research*, 6(1), 19–33. <https://doi.org/10.1080/20961790.2019.1643567>
- Kudlejova, L., Risticovic, S., Vuckovic, D. (2012). 7 Solid-Phase Microextraction Method Development. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416017-0.00007-3>
- Lennerniis, H., & Fager, G. (1997). Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of the HMG-CoA Reductase Inhibitors Similarities and Differences. 32(5), 403–425.
- Li, N., Deng, Y., Qin, F., Yu, J., Li, F. (2013). Simultaneous quantification of metformin and glipizide in human plasma by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. 2012(May 2012), 191–196. <https://doi.org/10.1002/bmc.2768>
- Liang, S. Y., Shi, F., Zhao, Y. G., & Wang, H. W. (2022). Determination of Local Anesthetic Drugs in Human Plasma Using Magnetic Solid-Phase Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography. *Molecules*, 27(17). <https://doi.org/10.3390/molecules27175509>
- Madej, K. (2009). Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(4), 436–446. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.02.002>

- Maree, S., Preez, L. Du, Plessis, L. . Du, Plessis, J. Du, & Gerber, M. (2020). A novel HPLC method developed and validated for the detection and quantification of atorvastatin , fluvastatin , pitavastatin and pravastatin during transdermal delivery studies. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(5), 164–166. <https://doi.org/10.1691/ph.2020.0007>
- Maron, D. J., Fazio, S., & Linton, M. F. (2000). Current Perspectives on Statins. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.2.207>
- Maslarska, V. (2014). Development, optimization and validation of HPLC method for determination of pravastatin sodium in tablets. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, 3(2), 230–234.
- Maya, F., Palomino Cabello, C., Frizzarin, R. M., Estela, J. M., Turnes Palomino, G., & Cerdà, V. (2017). Magnetic solid-phase extraction using metal-organic frameworks (MOFs) and their derived carbons. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 90, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.004>
- Mirka Šafaříková, & Ivo Šafařík. (1999). Magnetic solid-phase extraction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194, 108–112.
- Miyazaki, A., & Koga, T. (2002). Pravastatin sodium , an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase , decreases serum total cholesterol in Japanese White rabbits by two different mechanisms. 162, 299–306.
- National Center for Biotechnology Information. (1996). Pravastatin sodium. In *PubChem Compound Summary for CID 16759173, Pravastatin Sodium*. Retrieved June 14, (Vol. 21, Issue 5, pp. 564–566). <https://doi.org/10.32388/aiqwpb>
- National Center for Biotechnology Information (2024). *PubChem Compound Summary for CID 3478, Glipizide*. Retrieved June 22, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glipizide>.
- Ogle, G. D., James, S., Dabelea, D., Pihoker, C., Svennson, J., Maniam, J., Klatman, E. L., & Patterson, C. C. (2022). Global estimates of incidence of type 1 diabetes in children and adolescents : Results from the International Diabetes Federation Atlas , 10th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109083. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109083>
- Önal, A., & Sagirli, O. (2006). Development of a selective LC method for the determination of pravastatin sodium. *Chromatographia*, 64(3–4), 157–162. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0843-5>
- Pareja, L., Fernández-Alba, A. R., Cesio, V., & Heinzen, H. (2011). Analytical methods for pesticide residues in rice. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(2), 270–291. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.12.001>
- Park, J. C., Gilbert, D. A., Liu, K., & Louie, A. Y. (2012). Microwave enhanced silica encapsulation of magnetic nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 22(17), 8449–8454. <https://doi.org/10.1039/c2jm16595c>
- Poole, C. F. (2003). New trends in solid-phase extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*,

22(6), 362–373. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00605-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00605-8)

Poole, C. F., Gunatilleka, A. D., & Sethuraman, R. (2000). Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 885(1–2), 17–39. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00224-7)

Prasanthi, T., A. L. R., Reshma, P., Susanthi, P., Merwin, P., & Ajay, P. (2021). Novel RP-HPLC Method Development and Validation for Estimation of Pravastatin in Pure and Pharmaceutical Formulation. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(3), 13–17. <https://doi.org/10.31069/japsr.v4i3.3>

Rao K. & Prasad, T. (2011). An Overview of Statins as Hypolipidemic Drugs. 3(3), 178–183.

Rendell, M. (2004). The Role of Sulphonylureas in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. 64(12), 1339–1358.

Risticvic, S., Lord, H., Górecki, T., Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (2010). Protocol for solid-phase microextraction method development. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.179>

Salmanoğlu, M. (2020). Tip 2 Diyabetin Oral Antidiyabetik İlaç larla Tedavisi. *Klinik Tıp Bilimleri Dergisi*, 3(20), 20–23.

S Samanidou, V., & Kabir, A. (2022). Magnet Integrated Fabric Phase Sorptive Extraction (MI-FPSE): A Powerful Green (er) Alternative for Sample Preparation. *Analytica*, 3(4), 439–447.

Sarafraz-yazdi, A. and Amiri, A. (2010a). Liquid-phase microextraction. 29(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.003>

Schachter, M. (2004). Chemical , pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins : an update. 19, 117–125. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2004.00299.x>

Sharma, S., Ankalg, A. D., Devi, A., & Ashawat, M. S. (2023). Development of Efficient Analytical method for the multicomponent analysis of Pravastatin Sodium and Nebivolol Hydrochloride in Bulk Drug by RP-HPLC. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 16(5), 2477–2484. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2023.00408>

Shinde, A. C., Devhadrao, N. V, Bansode, A. S., & Bansode, A. S. (2019). Journal of Drug Delivery and Therapeutics Analytical method development and validation of assay test of pravastatin sodium tablets. 9(2), 70–75.

Silva, T. D., Oliveira, M. A., De Oliveira, R. B., & Vianna-Soares, C. D. (2012). Development and validation of a simple and fast HPLC method for determination of lovastatin, pravastatin and simvastatin. *Journal of Chromatographic Science*, 50(9), 831–838. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms079>

Singh, R. S. K., Gulati, M., & Kaur, I. (2014). Characterization of solid state forms of glipizide. *Powder Technology*, 264, 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.05.062>

- Sithole, M. N., Oosthuysen, E., Jaarsveld, J. V., Du Preez, J. L., Plessis, J. D., & Gerber, M. (2021). Development and validation of an HPLC method to be used for simultaneous detection and quantification of different statins after ex vivo skin diffusion studies. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(12), 583-587. <https://doi.org/10.1691/ph.2021.1164>
- Spietelun, A., Marcinkowski, Ł., De, M., & Namie, J. (2013). Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. 1321, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.030>
- Thulé, P. M., & Umpierrez, G. (2014). Sulfonylureas: A New Look at Old Therapy. <https://doi.org/10.1007/s11892-014-0473-5>
- Treatment, C. and Ctt, T. (2012). The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease : meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *The Lancet*, 380(9841), 581–590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60367-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60367-5)
- Tuomilehto, J., Fleming, G. A., Ferrannini, E., Gerstein, H. C., Bennett, P. H., Ramachandran, A., & Raz, I. (2016). Update and Next Steps for Real- World Translation of Interventions for Type 2 Diabetes Prevention : Reflections From a Diabetes Care Editors ' Expert Forum. 39(July), 1186–1201. <https://doi.org/10.2337/dc16-0873>
- Vasconcelos, I., Henrique, P., Rodrigues, D., Dias, D., Elisa, M., Ribeiro, S., Fernando, R., Freitas, D. S., Geraldo, R., Sousa, D., & Fernandes, C. (2020). Materials Science & Engineering C Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer (MIP) for solid-phase extraction of the antidiabetic gliclazide from human plasma. *Materials Science Engineering C*, 116(April), 111191. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111191>
- Vaughan, E. M., Rueda, J. J., Samson, S. L., & Hyman, D. J. (2020). Reducing the Burden of Diabetes Treatment: A Review of Low-cost Oral Hypoglycemic Medications. *Current Diabetes Reviews*, 16(8), 851–858. <https://doi.org/10.2174/1573399816666200206112318>
- Vlckova, H., Rabatinová, M., Mikšová, A., Kolouchová, G., Mičuda, S., Solich, P., & Nováková, L. (2012). Determination of pravastatin and pravastatin lactone in rat plasma and urine using UHPLC-MS/MS and microextraction by packed sorbent. *Talanta*, 90, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.043>
- Wang, H., Li, N., Chivese, T., Werfalli, M., Sun, H., Yuen, L., Ambrosius, C., Elise, C., & Immanuel, J. (2022). IDF Diabetes Atlas : Estimation of Global and Regional Gestational Diabetes Mellitus Prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group ' s Criteria. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109050. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109050>
- Yin, S., Zhao, J., & Yang, F. (2021). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Recent applications of magnetic solid phase extraction in sample preparation for phytochemical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 192, 113675. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113675>
- Zakeri Milani, P., Islambulchilar, Z., Majidpour, F., Jannatabadi, E., Lotfpour, F., & Valizadeh, H. (2014). A study on enhanced intestinal permeability of clarithromycin nanoparticles. *Brazilian*

Journal of Pharmaceutical Sciences, 50(1), 121–129. <https://doi.org/10.1590/s1984-82502011000100012>

Zhu, Z., & Neirinck, L. (2003). High-performance liquid chromatography coupled with negative ion tandem mass spectrometry for determination of pravastatin in human plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 783(1), 133–140. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00526-3](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00526-3)

Zwir-Ferenc, A., & Biziuk, M. (2006). Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), 677–690.

