

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**FİNGOLİMOD ve SİTALOPRAM İLAÇ ETKEN
MADDELERİNİN HPLC İLE TAYİNLERİ ÖNCESİ KATI
FAZ EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ İLE AYRILMASI
VE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ**

**Hazırlayan
Esra DURGUN**

**Danışman
Prof. Dr. İbrahim NARİN
Prof. Dr. Halil İbrahim ULUSOY**

Doktora Tezi

**Temmuz 2024
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**FİNGOLİMOD ve SİTALOPRAM İLAÇ ETKEN
MADDELERİNİN HPLC İLE TAYİNLERİ ÖNCESİ KATI
FAZ EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ İLE AYRILMASI
VE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ**

Doktora Tezi

**Hazırlayan
Esra DURGUN**

**Danışman
Prof. Dr. İbrahim NARİN
Prof. Dr. Halil İbrahim ULUSOY**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından TDK-2022-12425 kodlu proje ile
desteklenmiştir.**

**Temmuz 2024
Kayseri**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı : Esra DURGUN

İMZA :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Fingolimod ve Sitalopram İlaç Etken Maddelerinin HPLC ile Tayinleri Öncesi Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemleri ile Ayrılması ve Zenginleştirilmesi” adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Esra DURGUN

Danışman

Prof. Dr. İbrahim NARİN

Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. İbrahim NARİN

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. İbrahim NARİN danışmanlığında **Esra DURGUN** tarafından hazırlanan “**Fingolimod ve Sitalopram İlaç Etken Maddelerinin HPLC ile Tayinleri Öncesi Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemleri ile Ayrılması ve Zenginleştirilmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

Danışman: Prof. Dr. İbrahim NARİN

Üye :Prof. Dr. Özlem SÖĞÜT

Üye: Prof. Dr. Ertuğrul ŞAHMETLİOĞLU

Üye: Doç. Dr. Erkan YILMAZ

Üye: Dr.Öğr. Üyesi Dönay YUVALI

İmza

.....

.....

.....

.....

.....

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.... /...../

Prof. Dr.Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim hayatım boyunca her konuda bana destek olup rehberlik eden kıymetli hocam Prof. Dr. İbrahim NARİN ve doktora eğitimimin her aşamasında bana yol gösteren ve bu konuda kendime güvenmem için destek olan, lisans eğitimimden bu zamana kadar benden desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Halil İbrahim ULUSOY'a çok teşekkürlerimi sunuyorum.

Manyetik malzemelerin karakterizasyonuna olan katkılarından dolayı Doç.Dr.Erkan YILMAZ ve Arş.Gör. Gökhan SARP ve Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (TAUM)'a

Fabrik destek maddelerinin hazırlanması ve karakterizasyonu konusundaki destekleri için Amerika International Florida Üniversitesinden Prof.Dr. Abuzar Kabir'e,

Doktora sürecinde tanıma fırsatı bulup güçlü bağlar kurduğum, daima bana destek olan ve asla pes etmemem için destek veren, deneysel çalışmalarımızda bana daima destek olan sevgili yol arkadaşlarım kıymetli Arş. Gör. Ümmügülsüm POLAT ve Öğr. Gör. Aslıhan GÜRBÜZER'e ,

Doktora tez çalışma sürecimde bilgilerinden yararlandığım, sorularımı geri çevirmeyen ve tez yazım sürecinde yardımcı olan çok sevgili hocam Doç.Dr. Songül ULUSOY' a,

Tez çalışmamı TDK-2022-12425 kodlu proje ile finansal olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Doktora eğitimine başlama sürecimde bana cesaret verip beni daima destekleyen ve her şartta yanımda olan çok kıymetli eşime, tüm eğitim hayatım ve doktora eğitimim boyunca da her zaman destek olan canım babama ve hayatımda bana çok şey öğreten ve beni büyüten ablama,

Bana en büyük şans olarak gönderilmiş kıymetli kızım Elif Derin'ime doktora sürecinde bana gösterdiği anlayışı ve sonsuz sevgisi için çok teşekkür ediyorum.

Esra DURGUN

Kayseri Temmuz 2024

FİNGOLİMOD VE SİTALOPRAM İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN HPLC İLE TAYİNLERİ ÖNCESİ KATI FAZ EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ İLE AYRILMASI VE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ

Esra DURGUN

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Haziran 2024

Danışmanlar: Prof. Dr. İbrahim NARİN, Prof. Dr. Halil İbrahim ULUSOY

ÖZET

Fingolimod, Multipl Skleroz (MS) hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Fingolimod çoğu vakada tedaviye sitalopram benzeri antidepresan ilaçlar kullanılarak tedavinin sürekliliği sağlanmaktadır. Bu çalışmada multiple skleroz hastalığı tedavisinde kullanılan Fingolimod (FIN) ve depresyon tedavisinde kullanılan Sitalopram (SIT) ilaç molekülleri için eser miktarlarının eş zamanlı analizleri için yeni metot geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu moleküllerin eş zamanlı analizi, terapötik ve toksik etkilerinin takip edilmesi önemli olmasından dolayı, manyetik katı faz ekstraksiyonu (MKFE) ve fabrik faz ekstraksiyonuna (FFE) dayanan iki farklı ayırma ve zenginleştirme yöntemi geliştirilerek fotodiyot dizi dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografik (HPLC-DAD) sistemi ile analizleri gerçekleştirilmiştir. MKFE yöntemi için $Fe_3O_4@L$ -Tirozin içeren yeni manyetik adsorban ilk kez bu çalışma için sentezlenerek karakterize edilmiştir. FFE yöntemi için poly(caprolactone)-poly(dimethylsiloxane)-poly(caprolactone) (PCAP-PDMS-PCAP) içerikli fabrik faz adsorbanı sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Her iki katı faz ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyona etki eden analitik parametrelerden pH, adsorpsiyon ve desorpsiyon koşulları, zaman etkisi vb. deneysel değişkenlerin ekstraksiyona etkileri incelenerek optimize edilmiştir.

FIN ve SIT moleküllerinin HPLC ile analizi, % 50 Asetonitril, % 40 pH 3,0 fosfat tamponu ve %10 metanolden oluşan yürütücü fazın 1,0 mL dk⁻¹ akış hızıyla izokratik elüsyonu yoluyla gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen FFE yöntemi için tayin sınırları (LOD), FIN için 7,46 ng mL⁻¹ iken SIT molekülleri için 5,97 ng mL⁻¹'dir. 250 ng mL⁻¹ hedef molekül analizinde % RSD değerleri % 4,9' un altındadır. Sentetik idrar çözeltilerinde geri kazanım değerleri her iki molekül için de % 93,1-105,0 aralığındadır. MKFE yöntemi için tayin sınırları (LOD), FIN için 6,32 ng mL⁻¹ iken SIT molekülleri için 6,85 ng mL⁻¹ dir. Hedef molekül derişimi 100 ng mL⁻¹ olduğunda yapılan analizinde % RSD değerleri % 5,0'ın altındadır. Sentetik idrar ve yapay tükürük çözeltilerinde geri kazanım değerlerinin her iki molekül için de %96,6-105,4 aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fingolimod Tayini, Sitalopram Tayini, Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu, Fabrik Faz Ekstraksiyonu, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

**SEPARATION AND ENRICHMENT OF ACTIVE DRUG INGREDIENTS BY
SOLID PHASE EXTRACTION METHODS BEFORE THEIR
DETERMINATION BY HPLC**

Esra DURGUN

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Analytical Chemistry

PhD Thesis, June 2024

Supervisor's: Prof. Dr. İbrahim NARİN, Prof. Dr. Halil İbrahim ULUSOY

ABSTRACT

Fingolimod is used in the treatment of Multiple Sclerosis (MS). In most cases, Fingolimod is used to ensure continuity of treatment using antidepressant drugs such as citalopram. This study aimed to develop a new method for simultaneous analysis of trace amounts of the drug molecules Fingolimod (FIN), used in the treatment of multiple sclerosis, and Citalopram (SIT), used in the treatment of depression. Since simultaneous analysis of these molecules and monitoring of their therapeutic and toxic effects are important, two different separation and enrichment methods based on magnetic solid phase extraction (MSPE) and fabric phase extraction (FFE) were developed and their analyses were carried out with a high-performance liquid chromatographic (HPLC-DAD) system with a photodiode array detector. A new magnetic adsorbent containing $\text{Fe}_3\text{O}_4@L\text{-Tyrosine}$ for the MSPE method was synthesized and characterized for the first time in this study. Fabric phase adsorbent containing poly(caprolactone)-poly(dimethylsiloxane)-poly(caprolactone) (PCAP-PDMS-PCAP) was synthesized and characterized for the FFE method. In both solid phase extraction methods, the analytical parameters affecting the extraction such as pH, adsorption and desorption conditions, time effect etc. were optimized by examining the effects of experimental variables on extraction. HPLC analysis of FIN and SIT molecules was carried out by isocratic elution of the eluent phase consisting of 50% Acetonitrile, 40% pH 3.0 phosphate buffer and 10% methanol with a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . The limits of detection (LOD) for the developed FFE method are 7.46 ng mL^{-1} for FIN and 5.97 ng mL^{-1} for SIT molecules. In the analysis of 250 ng mL^{-1} target molecule, % RSD values are below 4.9%. Recovery values in synthetic urine solutions are in the range of 93.1-105.0% for both molecules. The limits of detection (LOD) for the MKFE method are 6.32 ng mL^{-1} for FIN and 6.85 ng mL^{-1} for SIT molecules. In the analysis performed when the target molecule concentration was 100 ng mL^{-1} , the RSD values were below 5.0%. It was determined that the recovery values in synthetic urine and artificial saliva solutions were between 96.6-105.4% for both molecules.

Keywords: Fingolimod Determination, Citalopram Determination, Magnetic Solid Phase Extraction, Fabric Phase Extraction

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sinir Hücreleri Hastalıkları/ Multiple Skleroz	3
2.1.1. MS Epidemiyolojisi.....	6
2.1.2. MS Tedavisi ve Kullanılan İlaçlar.....	6
2.1.3. Fingolimod	9
2.1.3.1. Fingolimod Farmakokinetik Etkileşimler.....	11
2.1.3.2. Fingolimodun Multipl Skleroz Üzerine Terapötik Etkisinin Mekanizması.....	12
2.1.3.3. Fingolimodun Diğer İlaçlar ile Etkileşimi.....	12
2.2. Depresyon Tedavisi ve Kullanılan İlaçlar	13
2.3. Antidepresan İlaçlar	14
2.3.1. Sitalopram	15
2.3.1.1. Sitalopramın Farmakokinetiği	16
2.3.1.2. Sitalopramın Diğer İlaçlar ile Etkileşimi.....	18
2.4. Ayırma ve Zenginleştirme Yöntemleri	18
2.5. Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi	19
2.5.1. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi (MKFE)	21
2.5.2. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemi	22
2.6. Kromatografik Yöntemler	25

2.6.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	25
2.6.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	26
2.6.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Bölümleri	27
2.6.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Türleri	30
2.7. Fingolimod ve Sitalopram Moleküllerinin Analizleri İçin Daha Önceden Yapılmış Olan Çalışmalar.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Kullanılan Çözeltiler ve Cihazlar.....	36
3.1.1. Hazırlanan Çözeltiler.....	36
3.1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı İçin Kullanılan Reaktifler.....	37
3.1.3. Manyetik ve Fabrik Faz Sentezinde Kullanılan Reaktifler	37
3.1.4. Kullanılan Cihazlar.....	38
3.2. MKFE için Manyetik Fe ₃ O ₄ @L-Tirozin Parçacıklarının Sentezi.....	39
3.3. Fabrik Faz Destek Maddesinin Sentezi ve Hazırlanması.....	39
3.4. Önerilen Manyetik Katı Faz ve Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemleri.....	40
3.4.1. Fabrik Faz Ekstraksiyon (FFE) Yöntemi	40
3.4.2. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon (MKFE) Yöntemi	41
3.5. Sentetik İdrar ve Sentetik Tükürük Çözeltilerinin Hazırlanması.....	42
3.6. Yöntemlerin Optimizasyon Basamakları	43
3.6.1. Çalışma Ortamının pH Etkisi	43
3.6.2. Adsorpsiyon Süresinin Etkisi	44
3.6.3. Desorpsiyon Çözücüsü Seçimi.....	44
3.6.4. Desorpsiyon Çözücüsü Hacminin Etkisi.....	44
3.6.5. Desorpsiyon Süresinin Etkisi	44
4. DENEYSEL SONUÇLAR ve BULGULAR.....	45
4.1. Fingolimod ve Sitalopram Molekülleri için Doğrudan Tayin Koşulları... 45	
4.2. Fingolimod ve Sitalopram Moleküllerine Ait Kromatogramlar	46
4.3. Fingolimod ve Sitalopram Molekül Piklerine ait DAD Dedektörden Elde Edilen UV-VIS Spektrumu.....	47
4.4. Fingolimod ve Sitalopram Moleküllerine ait Kalibrasyon Doğrularının Çizilmesi	48

4.5. Yöntemde Kullanılan Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonunun Karakterizasyonu	50
4.5.1. X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi	50
4.5.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizleri	51
4.5.3. Fourier Dönüşümlü-Infrared Spektroskopisi (FT-IR) Analizi	51
4.6. Yöntemde Kullanılan Sol-gel PCAP-PDMS-PCAP Kaplı Fabrik Faz Ekstraksiyon Membranının Karakterizasyonu	52
4.6.1. Fourier Dönüşümü-Infrared Spektroskopisi (FT-IR) Analizi	52
4.6.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	54
4.7. Fingolimod ve Sitalopram Analizi için Geliştirilen Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu	55
4.7.1. Örnek Çözeltilisinin pH'sının Ekstraksiyona Etkisi.....	55
4.7.2. Adsorbsiyon Süresinin Ekstraksiyona Etkisi	56
4.7.3. Desorpsiyon Çözücüsü Seçimi	57
4.7.4. Desorpsiyon Çözücüsü Hacminin Ekstraksiyona Etkisi	58
4.7.5. Desorpsiyon Süresinin Ekstraksiyona Etkisi.....	59
4.7.6. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Analitik Performans Ölçütleri	60
4.7.7. Geliştirilen Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Uygulaması	62
4.8. Fingolimod ve sitalopram'ın Ön Ayrılması ve Zenginleştirilmesi İçin Geliştirilen Fabrik Faz Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu	63
4.8.1. Örnek Çözeltilisinin pH'sının Fabrik Faz Ekstraksiyonuna Etkisi	63
4.8.2. Adsorbsiyon Süresinin Fabrik Faz Ekstraksiyonuna Etkisi	64
4.8.3. Desorpsiyon Çözücüsü Seçimi	65
4.8.4. Desorpsiyon Çözücüsü Hacminin Fabrik Faz Ekstraksiyonuna Etkisi	66
4.8.5. Desorpsiyon Süresinin Fabrik Faz Ekstraksiyonuna Etkisi	67
4.8.6. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yönteminin Analitik Performans Ölçütleri.	68
4.8.7. Geliştirilen Fabrik Faz Ekstraksiyon Yönteminin Uygulaması	70
4.9. Manyetik Katı Faz ve Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemlerinin t ve F Testiyle Değerlendirilmesi	72
5. TARTIŞMA	74

6. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME.....	79
7. KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	89



KISALTMALAR

ACN	: Asetonitril
BSS	: Bağıl Standart Sapma
DAD	: Diyot Dizisi Dedektör
EAA	: Eğri Altında Kalan Alan
EBT	: Efektör Bellek-T
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FFE	: Fabrik Faz Emici Ekstraksiyonu
FIN	: Fingolimod
FT-IR	: Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC	: Gaz Kromatografisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	: Uluslararası Uyum Konseyi
KFE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
LOD	: Gözlenebilme (Seçme) Sınırı
LOQ	: Tayin (Nicelleştirme) Sınırı
MAO	: Monoamin Oksidaz
MeOH	: Metil Alkol
MKFE	: Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	: Multiple Skleroz
MTMS	: MetilTriMetoksiSilan
nHPLC	: Nano Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SIT	: Sitalopram
SPME	: Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu
SSRI	: Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörü
uHPLC	: Ultra Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
UV-VİS	: Ultra Viyole- Görünür Bölge Spektroskopisi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XRD	: X Işını Kırınım Spektroskopisi

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Doğrudan Tayin Koşulları.....	46
Tablo 4.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Doğrudan Tayin Koşulları.....	46
Tablo 4.3. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi Analitik Performans Ölçütleri ..	62
Tablo 4.4. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Sentetik İdrar ve Yapay Tükürük Örnekleri Üzerine Uygulanması	63
Tablo 4.5. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yönteminin Analitik Performans	70
Tablo 4.6. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yönteminin Sentetik İdrar ve Sentetik Tükürük Üzerine Uygulanması.....	71
Tablo 4.7. Farklı ekstraksiyon yöntemleri için uygulanan t ve F testinin Fingolimod sonuçlarından hesaplanan verileri.....	71
Tablo 4.8. Farklı ekstraksiyon yöntemleri için uygulanan t ve F testinin sitalopram sonuçlarından hesaplanan verileri.....	72
Tablo 5.1. Literatürde Yer Alan Bazı Çalışmalarla Karşılaştırma.....	78

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. MS' ten Etkilenen Miyelin Yapısı (Goldenberg, 2012).....	5
Şekil 2.2. Fingolimod Molekül Yapısı.....	11
Şekil 2.3. Sitalopram Molekül Yapısı.....	16
Şekil 2.4. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Şematik Gösterimi (Çaylak, 2019).....	22
Şekil 2.5. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemi Aşamaları (Jain ve ark.,2023).....	24
Şekil 2.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Şematik Gösterimi.....	27
Şekil 3.1. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yönteminin Deneysel Aşamaları.....	41
Şekil 3.2. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Deneysel Aşamaları.....	42
Şekil 4.1. Fingolimod ve Sitalopram moleküllerine ait ideal koşullarda elde edilen kromatogram.....	47
Şekil 4.2. Fingolimod molekül pikinin Diyot Dizi Dedektörden elde edilen UV-VIS spektrumu.....	48
Şekil 4.3. Sitalopram molekül pikinin Diyot Dizi Dedektörden elde edilen UV-VIS spektrumu.....	48
Şekil 4.4. Fingolimod molekülü için zenginleştirme öncesi kalibrasyon grafiği.....	49
Şekil 4.5. Sitalopram molekülü için zenginleştirme öncesi kalibrasyon grafiği.....	49
Şekil 4.6. Sentezlenen Manyetik Malzemenin XRD Grafiği.....	50
Şekil 4.7. Sentezlenen Manyetik Malzemenin SEM Görüntüleri.....	51
Şekil 4.8. Sentezlenen Manyetik Malzemenin FTIR Görüntüleri.....	52
Şekil 4.9. a)metil trimetoksisilan (MTMS); (b) saf poli(kaprolakton)-blok-poli(dimetil siloksan)-blok-poli(kaprolakton) polimeri; (c) %100 selüloz pamuklu kumaş üzerine kaplanmış sol-jel poli(kaprolakton)-blok-poli(dimetil siloksan)-blok-poli(kaprolakton) ;c) (sol-jel PCAP-PDMS-PCAP) sorbent.....	54
Şekil 4.10. (a) kaplanmamış, bozulmamış %100 selüloz pamuklu kumaşın 100x büyütmede Taramalı Elektron Mikroskobu görüntüleri; (b) 100x büyütmede sol-jel PCAP-PDMS-PCAP sorbent kaplı FPSE membranı; (c) 500x büyütmede sol-jel PCAP-PDMS-PCAP sorbent kaplı FPSE membranı; ve (d) 1000x büyütmede sol-jel PCAP-PDMS-PCAP sorbent kaplı FPSE membranı.....	55
Şekil 4.11. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemine pH Etkisi.....	56

Şekil 4.12. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemine Adsorpsiyon Süresinin Etkisi	57
Şekil 4.13. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemine Desorpsiyon Çözücüsü Etkisi	58
Şekil 4.14. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon yöntemine desorpsiyon çözücüsü hacminin etkisi.....	59
Şekil 4.15. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon yöntemine desorpsiyon süresinin etkisi...	60
Şekil 4.16. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Sonrası Kalibrasyon Grafiği	61
Şekil 4.17. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemine pH Etkisi	64
Şekil 4.18. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemine Adsorpsiyon Süresinin Etkisi.....	65
Şekil 4.19. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemine Desorpsiyon Çözücüsü Seçiminin Etkisi	66
Şekil 4.20. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemine Desorpsiyon Çözgen Hacminin Etkisi	67
Şekil 4.21. FFE yöntemine desorpsiyon süresinin etkisi.....	68
Şekil 4.22. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemi Sonrası Kalibrasyon Grafiği	69

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yeni keşfedilen ilaçlarla birlikte, insan nüfusunun artışı ve insanların ortalama ömürlerindeki uzamaya bağlı olarak ilaç üretimi ve tüketimi artmaktadır. İlaçların geliştirilmesi sırasında ilaçların etkinliği, farmakokinetiği ve terapötik etkileşim çalışmalarının yapılmasını gereklidir. Analizlerin güvenilir bir şekilde yapılabilmesi amacıyla yeni analitik teknikler geliştirmek önemlidir. Ayrıca, biyolojik, çevresel ve gıda örneklerindeki ilaçların analizi, oldukça önemli hale gelmiştir. Özellikle karmaşık matrislerde bulunan düşük derişimlerdeki analitlerin analizleri için hassas analitik cihazlar yeterli gelmemekte, analitin karmaşık matrisi nedeniyle numune hazırlamalarda ön ayırma ve bazı durumlarda zenginleştirme işlemleri yapılması gerekli olmaktadır. Bu durumda farklı matrislerden ilaç/kalıntı analizi yaparken yeni yaklaşımlar geliştirmek amacıyla ayırma ve zenginleştirme işlemleri önem kazanmaktadır.

Analiz laboratuvarlarında çevre, gıda ve biyolojik örnekler gibi karmaşık matrislerdeki eser miktardaki ilaç etken maddelerinin hassas, doğru ve hızlı analizlerinin yapılması önemlidir. Son yıllarda doğru, güvenilir, basit, kolay, düşük maliyetli ve çevreci örnek hazırlama yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalar hızla artmaktadır. Toksik olan organik çözücülerin yerine çevre açısından daha güvenli yeni nesil toksik olmayan organik çözücüler kullanılmaya başlanmıştır. Böylece çevreye zararlı kimyasal kullanımı en aza indirgeyen ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak analizler yaygın kullanılan analitik cihazlarla uyumlu hale getirilmiştir. Örnek hazırlama işlemleri kullanılarak analizlerin tayin sınırı, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği artırmaktadır.

Bu çalışmada temel amaç, bir beyin ve omurilik hastalığı olan multiple skleroz hastalığının tedavisinde kullanılan Fingolimod ile ona genel olarak eşlik eden depresyon durumunun tedavisi için kullanan Sitalopram'ın eş zamanlı tayin edilmelerini mümkün kılacak bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemini geliştirmektir.

Yöntemin karmaşık matrislere uygulanabilirliğini artırmak amacıyla HPLC tayini öncesi yeni katı faz ekstraksiyon metotları geliştirilmiştir. Geliştirilen ekstraksiyon yönteminin biyolojik örneklerin analizleri için uygun; düşük tayin sınırı, tekrarlanabilirliği ve doğruluğu analitik kriterlere uygun, maliyetinin düşük ve çevre dostu olması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Hücreleri Hastalıkları/ Multiple Skleroz

Multiple Skleroz (MS), kronik bir otoimmün hastalık olarak tanımlanmasının nedeni beyin, omurilik ve optik sinirlerden oluşan merkezi sinir sistemini etkilemesidir. Hastalık bağışıklık sistemi ve merkezi sinir sistemin sinir liflerini koruyan miyelin kılıflarına saldırarak zarar vermesi ile karakterizedir (Mukrimaa ve ark., 2016; Rolak, 2003).

MS hastalığında bağışıklık sistemi istemsizce sinirlere ve beyne saldırır. Bunun sonucu olarak bacak ve kol hareketlerinde zayıflama, görmede bulanıklık, duyu ve denge sorunları yaşanır. MS'te vücudun otoimmün sistemi miyelin kılıfı hedef alır ve ona zarar verir, bu sebeple beyin ile vücudun geri kalanı arasındaki iletişimde zorluklara neden olur. Sonunda hastalık, sinir lifleri olarak bilinen aksonlarda uzun vadeli hasara veya bozulmaya yol açabilir. MS, Merkezi Sinir Sistemindeki miyelin çevreleyen sinir liflerinin hasar görmesi, sinir hücreleri arasındaki normal iletişimde bozulmalara neden olduğundan, demiyelinizan (beyinde, omurilikte ve sinirlerde miyelin hasarına neden olan durum) bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Bu hasarın yeri ve ciddiyetine bağlı olarak çeşitli semptomlara yol açabilir (Rolak, 2003; Tütüncü, 2010). Miyelin hasarı kas zayıflığı, uyuşukluk, koordinasyon ve denge sorunları, görme sorunları ve bilişsel bozulma gibi çeşitli nörolojik semptomlara neden olur (Tütüncü, 2010). Kadınlarda MS hastalığının görülme sıklığı erkeklerden iki kat daha fazladır (Rolak, 2003).

Multiple Skleroz hastalığında santral sinir sisteminde bulunan beyaz madde adı verilen sinir liflerinden oluşan yapılar zarar görerek bozulur. Sinir lifleri merkezi sinir sistemi ve bu sistem ile vücudun diğer bölümleri arasındaki iletişimi sağlar. Aynı zamanda merkezi sinir sisteminin kendi içerisinde de iletişimden sorumludur (Baydan, 2021).

MS'li hastalarda beyaz maddede hasarlı alanlar görülür ve bunlar plak veya lezyon olarak adlandırılır. Bu beyaz madde ve lezyonlar santral sinir sisteminde yer almaktadır. Hasar oluşan alanlarda siniri çevreleyen miyelin isimli tabakada kayıp gözlenir. MS hastalığının tipi ve şiddeti sinir sisteminde etkilenen yere ve etkilenme derecesine göre değişebilir (Alvarez ve ark., 2011).

MS hastalığının belirtileri değişkenlik gösterirken tedavisi genellikle kişiye özge Hastalığın hastalar arasında veya bireylerin kendi içlerinde hastalık seyrinin farklı olması, hastalığın ne zaman başladığı, beyinde hangi bölgede bulunduğu ve bulguların hangi yoğunlukta etki edeceğini farklı kılmaktadır. Genel olarak, MS'li hastaların omurilik ile ilgili bölümünde hasar var ise o bölümün sorumlu olduğu fonksiyonlarda tam ya da kısmi kaybı gözlenir. Eğer beyin sapında yer alma durumu varsa beynin kontrolündeki herhangi bir fonksiyonun tam veya yarı tam kaybı gözlenir (Alvarez ve ark., 2011; Baydan, 2021).

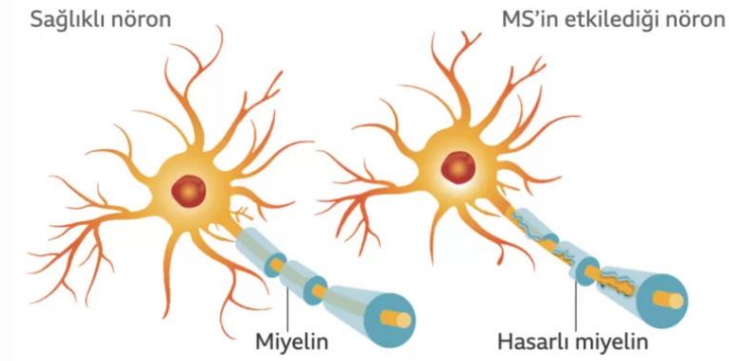
Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG), MS teşhisinde en duyarlı, net ve önemli görüntüleme yöntemidir. MRG, MS hastalığının tanı koyma sürecinde etkin olduğu gibi klinik olarak diğer hastalıklardan ayıran tanının yapılmasında önemli rol almaktadır. Ayrıca tedavi sürecinde kontrol görüntülemesi yapılmaktadır ve tedaviye verilen yanıtın yorumlanmasında rolü büyüktür. MS tanısında genellikle T1 ağırlıklı (T1-w), T2 ağırlıklı (T2-w), Sıvı Zayıflatılmış İnverson Kurtarma (FLAIR) ve Proton Dansite ağırlıklı (PD-w) MRG sekansları kullanılmaktadır. MS plakları tipik olarak T1-w sekansta beyaz cevhere göre benzer veya düşük sinyalde, T2-w ve FLAIR sekansta ise yüksek sinyalde izlenmektedir. Son yıllarda, derin öğrenme yöntemlerinin kullanılmasıyla, MS lezyonlarının MR görüntülerinden otomatik olarak segmentasyonunda dikkate değer sonuçlar üretilmiştir. MS lezyon segmentasyonu için otomatik yöntemler genellikle bireysel MRI taramalarında gerçekleştirilmiş olsa da son zamanlarda MS hastalığının ilerlemesini ölçmek ve izlemek için lezyon aktivitesinin izlenmesi, özellikle yeni lezyonların saptanması, önemli bir biyobelirteç haline gelmiştir (Ge, 2006).

MS'in kesin teşhisi McDonald kriterleri olarak bilinen kılavuzda bulunmaktadır. Bu McDonald kriterleri 2001 yılında uluslararası bir panelde yayınlandı ve birkaç kez güncellenmiştir. En son revizyonu 2017'de olmak üzere bir dizi kılavuz bulunmaktadır.

Bu kriterler klinik, laboratuvar ve klinik değerlendirmeyi ve MS tanısının görüntüleme bulgularının doğruluğunu ve tutarlılığını iyileştirmeyi içermektedir.

McDonald kriterleri klinik ortamlarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve özellikle hastalığın erken evrelerinde MS tanısının doğruluğunu arttırdığı gösterilmiştir (McDonald ve ark., 2001; ztrk ve ark., 2017).

MS'in nedeni tam olarak anlaşılmamakla birlikte çevresel veya genetik faktörlerin araştırılmaları sonucunda etkili olduğu öngörülmektedir (Goldenberg, 2012). şu anda MS'in kesin sonuç veren tedavisi yoktur fakat semptomları yönetmek ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için çeşitli tedaviler mevcuttur. Özetlemek gerekirse MS, dünya çapında milyonlarca insanı etkilemektedir. Kişilerin yaşam konforları üzerinde önemlidir. Oldukça karmaşık ve değişken bir hastalıktır. Hastalığın tanı ve tedavisini geliştirmek amacıyla MS'in altında yatan nedenler ve potansiyel tedavilere yönelik araştırmalar devam etmektedir (Goldenberg, 2012).



şekil 2.1. MS' ten Etkilenen Miyelin Yapısı (Goldenberg, 2012)

MS hastalığının belirtileri şunlardır:

- Vücudun farklı noktalarında karıncalanma, uyuşma
- Kas sertliği, kaslarda kramp ve ağrı
- Bulanık, ift görme ve az görme gibi görme sorunları
- Boynun öne doğru bükülmesiyle ortaya çıkan elektrik çarpması hissi
- Düşünme becerisi, öğrenme yöntemi ve planlama ile ilgili sorunlar
- Depresyon ve anksiyete
- Konuşma ve yutma güçlüğü

- İdrar kaçırma gibi mesane problemleri
- Yorgunluk ve halsizlik
- Yürüme güçlüğü gibi denge ve koordinasyon sorunları
- Kabızlık
- Cinsel fonksiyon bozuklukları
- Kısa süreli hafıza sorunları (Baydan, 2021)

2.1.1. MS Epidemiyolojisi

MS hastalığının genetik ve çevresel faktörler dikkate alındığından kadınlarda daha çok görüldüğü ve bu oranın kadınlarda erkeklerden 2 kat fazla olduğu öngörülmüştür. Genç erişkinleri daha fazla etkilemektedir. İleri yaşta bu hastalığa yakalananların ölüm oranı daha yüksektir. Dünyada MS hastalığının görülme sıklığı ile ilgili yapılan çalışmalarda, hastalık sıklıkla beyaz ırklılarda ve Avrupa kökenlilerde nadir olarak ise, tropikal bölgelerde görüldüğü ortaya çıkmıştır. Dünyada görülme sıklığının fazla olduğu ülkeler; Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda, Güney Kanada, İsrail ve Güney Avustralya olarak belirlenmiştir. Bu hastalık Asya kıtasında en seyrek görülme sıklığına sahiptir (Nielsen ve ark., 2005). MS hastalığı her bir coğrafi bölgede farklılıklar göstermektedir. Kutup bölgelerine yaklaştıkça hastalık daha sık görülmekte ve bunun bilim insanlarını vitamin D eksikliği ile olabileceği kanısını düşündürmüştür D vitamini zengin beslenen kişilerde hastalık seyrek ve hafif seyretmektedir. Bu hastalık Amerikan Kızılderilileri'nde görülmemekte (Nielsen ve ark., 2005) ve Avrupa ırkından gelenlerde daha fazla rastlanmaktadır. Bir kısım bilim insanı MS için hijyen teorisini öne sürmüştür. Bu teoride endüstrileşmiş ülkelerde hijyen ve temizlik şartlarının otoimmün hastalıklarda etkili olduğu düşünülmektedir. Hijyen Teorisi bunu şu şekilde tanımlar; küçük yaşta bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi gereklidir. Çünkü hastalık etmenlerine, parazitlere, mikroorganizmalara maruz kalmak, bağışıklık sistemini güçlendirecek etmenlerdir (Mirza, 2002).

2.1.2. MS Tedavisi ve Kullanılan İlaçlar

MS hastalığında iki çeşit ilaç kullanılır. İlki atak dönemi kullanılırken iken diğeri koruyucu tedaviler şeklinde uygulanmaktadır. Sadece atak geçirme zamanlarında kullanılan streoid(kortizon) tedavi yöntemidir. Bu tedavi yöntemi kısa süren ataklara uygulanan yöntemlerdir eğer ataklar uzun süre devam ediyorsa ve tam düzelme

sağlanmaya çalışılıyorsa streoid kullanılarak tedavi gerçekleştirilmektedir. Bu tedavide intravenöz (damar içi) şeklinde uygulanır ve metilprednizolon (Prednol®) tedavisinin günlük dozu 1000 mg şeklinde uygulanır. Genel olarak 3-10 gün boyunca hastalara bu tedavi verilir. Tedavi başarısını artırmak, atağın şiddetinin en aza indirilmesi için tedaviyi izleyen haftalarda tekrarlanması gerekebilir. Bu tedavide kortizon ağızdan alınır ve en fazla 1 ay kullanılabilir (McDonald ve ark., 2001).

Koruyucu tedavi amaçlı kullanılan ilaçlar atakların tekrarlanmasını azaltmayı hedeflemektedir. Yeni plakların oluşumunu engellemek ve hastaların uzun yıllar atak geçirmeden yaşamlarını sürdürmeyi sağlamaya çalışmaktır. Koruyucu tedaviler; birinci basamak tedaviler, ikinci basamak tedaviler ve üçüncü basamak tedaviler olarak gruplandırılır.

Hastalığın erken döneminde birinci basamak tedaviler kullanılır ve genellikle en güvenilir ve yan etkisi diğer tedavilere göre en az olan gruptur. Bu amaçla aşağıda verilen ilaçlar yaygın olarak kullanılmaktadır.

1. İnterferon β -1a (Avonex®): Avonex bir enjeksiyon tedavisi olduğundan ilaç intramüsküler olarak (kas içine) uygulanır. Haftada bir kez tek doz uygulanır.

2. İnterferon β -1a (Rebif®): Rebif, subkutan (cilt altı) kullanılan bir iğne tedavisi şeklindedir. Avonex'te kas içine uygulanan enjeksiyon Rebif'te daha yüksek dozda vücuda verilir. Gün aşırı enjeksiyon şeklinde vücuda alınır ve elektronik bir enjeksiyon aparatı olan RebiSmart ile kullanılmaktadır.

3. İnterferon β -1b (Betaferon®): Bu hastalık için çıkarılan ilk interferonlardır. Subkutan (cilt altı) enjeksiyon şeklinde uygulanır. Bu tedavilerde sedef (psöriasis) ile nöromiyelitis optika (NMO) hastalıklarını tetikleme durumu yan etkileri arasında görülmektedir.

4. Glatiramer asetat (Copaxone®): 20 ve 40 mg'lık ticari türü vardır. Uygulamada hergün 20 mg'lık türü, haftada üç kere olmak üzere de 40 mg'lık türü yapılmaktadır. Cilt altına enjeksiyon şeklinde uygulanmaktadır. İki türde de etki aynıdır. İlacın uygulanmasında yardımcı olan bir CSYNC oto enjektör/ Copaxone adında bir aparatı mevcuttur ve eczanelerde satışı bulunmaktadır.

5. Teriflunomid (Aubagio®): Bu tedavide ilaç her gün aynı saatte alınması gereken ve aynı zamanda enjeksiyon tedavisi olmayan bir tedavi şeklidir. 14 mg'lık tabletler halinde üretilmişlerdir. Etken madde olan Teriflunomid leflunomid etken maddesinden 1985 yılında türetilmiştir. Leflunomid romatoid ile psöriatik artritte de kullanılan bu ilacın iltihabı azaltıcı etkisi bulunmaktadır. 2011 yılında ilk klinik çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada 1088 hastaya uygulama yapılmıştır. Plasebo (boş ilaç) veya teriflunomidin 7 ve 14 mg'lık iki dozu verilmiştir. Her iki uygulama şeklinde de hastaların atak sayılarında azalma ile atak sırasındaki hastalığın şiddetinin azaldığı ve hastalık seyirlerinin daha düzene girdiği ve MR'larında yeni plak oluşumunun azaldığı görülmüştür.

Teriflunomid Amerikan İlaç Dairesi'nden (FDA) Eylül 2012'de geçerliliği kabul edilmiştir. Aynı yıl içinde ABD'de Aubagio® piyasa adıyla 7 ve 14 mg'lık türler halinde günde bir kez alınarak kullanımı uygun görülmüştür. İlacın Türkiye'de temin tarihi 2015 tir.

6. Dimetil fumarat: 2006 yılında MS tedavisinde denemelere başlanan bu ilaç, ilk olarak 1234 hasta kişide, 240 mg'lık doz, iki grupta incelenmiştir. Grubun birinde günde 2 diğesinde ise 3 kez olacak şekilde verilmiştir. Her iki deneme yapılan grupta da ilacın iyileştirici etkisi olduğu görülmüştür.

Tedavi sırasında görülen yan etkiler şunlardır; ishal, karın ağrısı, bulantı, ciltte kızarma ve karaciğer enzimlerinde geçici bozulma şeklindedir. (Goldenberg, 2012).

Dimetil fumaratın 120 ve 240 mg'lık kapsüllerler halindedir ve günde 2 defa ağızdan alınır. İlaçın başlangıç dozu olarak günde 240 mg olarak önerilmiştir.

Birinci basamak tedavilerde oldukça güvenli olan enjeksiyon tedavileri olarak sayılabilir. Birinci basamak ilaçlar uzun yıllardır yüz binlerce insan tarafından kullanılan piyasada mevcut olan ilaçlardır. Bu ilaçlarda bazı belirtiler ortaya çıkabilmektedir. Bu belirtiler;

- Enjeksiyon yerine bağlı olarak görülen kızarıklık, şişlik, yanma gibi reaksiyonlar.

- İnterferon alan hastalarda grip benzeri bir reaksiyonun ilacın yapıldığı gün veya ertesi güne kadar uzaması.
- Seyrek görülen bir diğer belirti ise, karaciğer enzimlerinde yükselme şeklinde ortaya çıkabilmektedir (Öztürk ve ark., 2017).

Birinci basamak tedavilerle hastalığı kontrol altına alınamayan veya birinci basamak tedavilerin yan etkilerinden dolayı tedaviye yanıt alamayan hastalarda ikinci basamak tedaviler verilmektedir. İkinci basamak tedavide Natalizumab, Okrelizumab ve Fingolimod kullanılmaktadır.

1. Natalizumab (Tysabri®): Yılda 12 kere (aylık olarak) intravenöz (damar içi) olarak kullanılır. Birinci basamakta yer alan ilaçlara yanıt vermeyen hastalarda kullanılır fakat Progresif multifokal lökoensefalopati (PML) adında bir hastalığa sebep olma olasılığı vardır. (Goldenberg, 2012). 2006 yılında ilk klinik çalışma yayınlanmıştır. Natalizumab SGK tarafından belirli koşullarda ödenmektedir. Bu koşullar;

- Birinci basamak tedaviye rağmen atak geçiren
- Beyin MR’ında aktif plaklara sahip olan hastalara ödeme yapılmaktadır.
- Bazı durumlarda ilk ilaç olarak verilebilmektedir. Böyle durumlarda Sağlık Bakanlığından alınan özel izin ile temin edilebilmektedir.

İlacın dozu 300 mg’dır ve 4 haftada bir kere damardan uygulanmaktadır.


2. Okrelizumab (Ocrevus®) Okrelizumab bir anti-CD20 monoklonal antikör türüdür. MS’in sebeplerinde yer alan B lenfositlerini yok eden antikördür. CD20 molekülü B lenfositlerinin yüzeyinde bulunur ve ilaç bu kısma bağlanarak hücrelerin kandaki sayısının uzun bir süre azalmasını sağlayarak bağışıklık sistemini baskılar. Bu şekilde hasarı ortaya çıkaran faktörler kandan temizlenerek merkezi sinir sistemi korunmuş olur. (Goldenberg, 2012).

2.1.3. Fingolimod

MS hastalığında kullanılan Fingolimod 2010 yılında Amerika’da, AB ve Türkiye’de piyasaya sürülmüştür. Fingolimod’un molekül yapısı Şekil 2.2.’de verilmiştir. Fingolimod, lenfositlerin (otoimmün sistemi hücreleri) kana karışmasını engelleyerek beyinde olabilecek hasarları engellemek amacıyla kullanılır (Aktas ve ark., 2010). MS

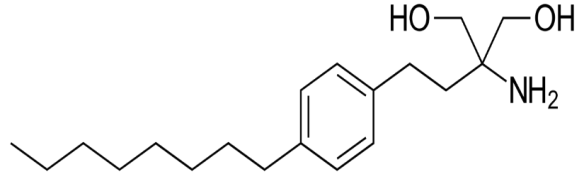
tedavisinde fingolimod kullanan hastalar üzerinden günümüze kadar çok sayıda çalışma yapılmıştır. Çalışmada 1272 hastada yeni bir tedavi denemesi yapılmıştır. Yapılan bu deneme sonucunda günlük 0,5 mg'lık doz verilmiştir. Hastaların klinik muayenelerinde ve radyolojik bulgularında düzelme olduğu görülmüştür. İki yıllık bir takiple gerçekleştirilen bu çalışmada ilaç alan hastaların atak sıklıklarında % 60'a varan azalma görülmüştür. Aynı zamanda hasta kişilerin beyinlerinde görülen beyaz maddelerde (plak) azalma olduğu, nörolojik olarak kötüleşmede gerileme olduğu görülmüştür. Düşük doz ilaç alan hastalarda yan etki daha azdır ve bu yüzden piyasaya düşük dozu sürülmüştür. Kas içine uygulanan interferonlarla yapılan karşılaştırmada fingolimod daha etkindir (Azari ve ark., 2016).

Fingolimod'un yan etkileri olarak,

- 
- Gözde makülada ödem
 - Enfeksiyon
 - Kalp atım hızında azalma
 - Karaciğer enzimlerinde yükselme
 - Yüksek tansiyon

görülmektedir.

MS hastalığı için fingolimod kullanımına başlamadan önce eğer hastanın suçiçeği aşısı yoksa yapılması gereklidir (Loebermann ve ark., 2012). Retinada ödem ortaya çıkabilmekte ve bu yüzden ilaç kullanımı öncesi ve sonrası göz muayeneleri takip edilmelidir. Hastalar fingolimodun ilk dozunu 6 saatlik gözlem ile hastane ortamında almalıdır. Birinci basamak hastalıkta birinci basamak tedavilerden olmasına rağmen Sağlık Bakanlığından alınan özel izni ile temin edilebilmektedir (Kappos ve ark., 2014).



Şekil 2.2. Fingolimod Molekül Yapısı

2.1.3.1. Fingolimod Farmakokinetik Etkileşimler

Fingolimod CYP4F2 ile metabolize olmaktadır. Metabolizmaya katkıda bulunan diğer enzimler güçlü induksiyon durumunda CYP3A türündedir. Fingolimoda güçlü inhibitörlerin taşıyıcı proteinlerin dispozisyonuna etkisi beklenmemektedir. Fingolimod ve ketokonazol ile eşzamanlı olarak uygulandığında CYP4F2 inhibisyonu meydana gelmektedir. Bu inhibisyonda fingolimod ve fingolimod fosfat maruziyetinde bir artış olduğu kanısına varılmıştır ve bu artışın eğri altında kalan alanda (EAA) 1,7 katlık bir artış olduğu belirlenmiştir. Makrolidler grubu CYP3A4'ü inhibe eder ve birlikte kullanılmasına dikkat edilmesi gerekmektedir. Makrolidler grubu; telitromisin, klaritromisin ve proteaz inhibitörleri azol anti-fungalleri gibi yapılardır. Karbamazepin ve fingolimodun eşzamanlı uygulamasında günlük 600 mg karbamazepini iki kere ve 2 mg'lık tek doz fingolimod alınması durumunda kendisinin ve metabolitinin EAA değerini yaklaşık % 40 azalttığı görülmektedir. Bir diğer güçlü CYP3A4 enzim indükleyiciler fenobarbital rifampisin, fenitoin, efavirenz ve St. John's wort (sarı kantaron) gibi yapılar ile indüklendiğinde fingolimod ve metabolitinin EAA değerini azaltabilecek etkisi vardır. Fingolimod sarı kantaron ile eşzamanlı uygulama yapılmaması önerilmektedir. Fingolimodun diğer maddeler üzerindeki farmakokinetik etkilerine bakılacak olunursa CYP450 enzimleri ile etkileşime girmez. Fingolimod, siklosporin ile eşzamanlı olarak uygulanabilmektedir. Fingolimod etinilöstradiol ve levonorgestrel ile eşzamanlı olarak uygulanması olasıdır. Bu tür ilaç grubu oral kontraseptifler olarak bilinir ve maruziyetinde değişiklik görülmemektedir. Etkileşim çalışması yapılmayan oral kontraseptiflerden olan Progestajenler ile etkileşim çalışması yapılmamış olmasına karşın ve fingolimod maruziyeti üzerinde bir etki göstermeleri beklenmemektedir. (Fatma Gök, 2020).

2.1.3.2. Fingolimodun Multipl Skleroz Üzerine Terapötik Etkisinin Mekanizması

Fingolimodun S1P1 ana mekanizmalarının MS hastalığına yararlı etkisi bulunmaktadır. Lenfositler üzerin yer alan S1P1 modülasyonu, T-hücrelerinin lenf dokularından ayrılmalarını önler ve oto-agresif (enfeksiyon veya bağışıklık durumunda aktifleşen) lenfositlerin merkezi sinir sistemine girmelerini engeller. Kan dolaşımı ve lenfatik sisteme uygulanması hedeflenen antijenik uyarılmayı takiben hassas T-hücrelerinde farklılaşma meydana gelir. Lenf düğümlerinden göç eden merkezi sinir sistemindeki T-hücrelerinin büyük çoğunluğu ve MBT hücrelerinden oluşur. Esasen S1P1 lenfositler üzerinde tanımlanır ve fingolimodun MS hastalığındaki terapötik etkinliğinde önemli rol oynamaktadır. Lenfositlerden CCR7 reseptörü içerenler kan ile lenf sistemi arasında dolaşımı kontrol etmektedir. Bellek T, T-17 ve B- hücreleri CCR7 içeren hücrelerdir. Fingolimod fosfat S1P1' in en güçlü antagonist yapısıdır ve hücreyi S1P1'in lenf düğümünde kalmasını sağlar. Bu durum, fingolimod tedavisinde CCR7-negatif EBT hücrelerinin dolaşımda kalmasını sağlar. Aynı zamanda CCR7- pozitif lenfositlere etki ederek oto-indükleyici MBT hücrelerinin lenf düğümünde kalmalarını sağlamış olur. Böylelikle hücrelerin merkezi sinir sistemine göçü azalır (Brinkmann ve ark., 2010; Webb ve ark., 2004).

Literatür ve deneysel verilere bakıldığında, fingolimod yalnızca T-hücre retansiyonuna etki etmemiştir. Bunun yanında santral sinir sistemi hücrelerinde doğrudan koruyucu etki göstermiştir. Fingolimod lipofilik özellik göstermektedir. Bu sayede kan beyin bariyerini geçerek santral sinir sistemine girer ve miyelin içinde birikir (Balatoni ve ark., 2007).

İn vitro çalışmalarda; fingolimod astrositler, nöronlar, oligodendrositler üzerinde etkilidir. Bu yapılar merkezi sinir sisteminde MS için önemli parçalarıdır.

İn vivo çalışmalarda; fingolimod beyin ve modulla spinaliste demiyelinizasyonu azaltır ve hastalığın şiddetinin azalmasına yardımcı olur (Balatoni ve ark., 2007).

2.1.3.3. Fingolimodun Diğer İlaçlar ile Etkileşimi

Fingolimod, neoplastik (antikanser) ve immünosupresif (bağışıklık sistemi aktivitesini engelleyen veya önleyen) ilaçlarla birlikte kullanıldığında bağışıklık aditif (aynı yönde etki eden kimyasalların toplamı) şekilde baskılanabilir. Bu ilaçlarla birlikte kullanımı

durumunda dikkat edilmesi gerekmektedir. MS tedavisi sırasında kullanılabilir olan antidepresan, kortikosteroidler, antiepileptikler, parkinsonizm ve A tipi influenza vb. gibi grupta yer alan ilaçlardan bazıları ile etkileşme oranı yüksek değildir. Enfeksiyon riski bağlamında kortikosteroidler ile birlikte kullanımda risk gelişmezken, zayıflatılmış canlı aşı uygulamaları yapılması önerilmemektedir. Kardiyak etki gösteren ilaç gruplarının bir kısmı Fingolimod ile ortak özellik gösterebilmektedir. Bu sebepten dolayı birlikte kullanılmaları durumunda farmakodinamik etkileşimler olma ihtimali vardır (Gajofatto ve ark., 2015).

Anti-hipertansif ilaçların fingolimod ile birlikte kullanımı durumunda kalp atım hızında yapılan araştırmalarda; atenolol ve diltiazem ilaçları ile değerlendirme yapılmıştır. Bu iki ilaç birlikte kullanıldığında elektrokardiyografik bulgularda ve genel kan basıncında önemli bir klinik değişiklik gözlemlenmemiştir (Gajofatto ve ark., 2015). Fingolimodun hızlı kalp atışına yol açabilen sempatik sinir sisteminin (beta adrenerejik blokerler), kan damarlarının kasılmasına veya daralmasına neden olan kalsiyum iyonlarını bloke ederek kalbin iş yükünü azaltan kalsiyum kanal blokerleri, digoksin, antikolinesteraz inhibitörleri ve pilokarpin gibi bradikardiye (kalp atış hızının normalden yavaş olması durumu) yol açan ilaçlarla birlikte kullanılması önerilmemektedir (Altunrende ve ark., 2017).

2.2. Depresyon Tedavisi ve Kullanılan İlaçlar

Depresyon tedavisinde reçetelenmiş olan antidepresanlar etkilidir ve aynı zamanda psikoterapinin ayrı uygulanması veya her ikisinin birlikte uygulanmasının etkili olduğu bilinmektedir. En sık başvurulan tedavi yöntemi olan antidepresan reçete edilmesinin sebepleri arasında tüm dünyada depresyonun yaygınlaşması ve gün geçtikçe artan hasta sayısına karşı yeterli düzeyde psikoterapi yapabilecek teknik elemanın bulunmaması, sosyo-ekonomik sebepler ve zaman-mekan sorunlarıdır. Son 20 yılda batı ülkelerinde antidepresan kullanımında özellikle de seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) ve yeni nesil antidepresan kullanımında artış görülmektedir (Onur ve ark., 2007).

Majör depresyonda temel tedavi yaklaşımı, antidepresan ilaçların reçete edilmesidir. Depresyonun asıl nedeninin, beyindeki nörotransmitter sistemlerdeki işleyişin bozulmasıyla ilgili olduğu tahmin edilmektedir. Majör depresyonun tedavisinde noradrenalin, dopamin ve serotonin gibi bileşiklerle tedavi edilmektedir. Bu

nörotransmitterler sinaptik boşluktaki konsantrasyonunda artış sağlanabilmekte ve nörotransmitter geri-alım inhibisyonu, otoreseptörlerin bloke edilmesi veya MAO enziminin inhibisyonu ile sağlanabilmektedir (Stahl, 1998).

Depresyonun yaşam boyu sürebilen iyileşme ve tekrarlamalarla kendini gösteren bir hastalıktır. Tedavi edilmeyen olgular % 15 oranında olduğu düşünülmektedir. Yinelenen ataklar sosyal, iş, aile yaşamında önemli sorunlara yol açmaktadır (Örsel, 2004). Doğru tanı konulması Depresif bozuklukların tedavisinde ilk adımdır ve ardından tedavi amaçlarının belirlenmesi gerekir. Tedavide izlenen temel ilkeler:

1. Tedavide amaç ve süreç
2. Tedaviye uygun antidepresan seçimi
3. Olabilecek tıbbi sorunların ve tedavinin belirlenmesi
4. İntihar riskinin belirlenmesi
5. Tedaviye uyum ve uyumu sürdürme durumlarının değerlendirilmesi
6. Tedavi gidişatının değerlendirilmesi
7. Antidepresan ilaçların hastaya göre belirlenerek ilaçların doz ve kullanım süresinin belirlenmesi
8. Yan etkiler konusunda hastaya bilgi verilmesi
9. Tedaviye alınan yanıtın sürdürülmesi
10. Psikoterapi alınıp alınmaması durumunun değerlendirilmesi (Örsel, 2004)

olarak belirlenmiştir.

2.3. Antidepresan İlaçlar

Antidepresan ilaçlar, birçok duygu durum bozukluğu, zihinsel bozukluk ve madde kullanımıyla oluşan ruhsal bozukluklarının tedavisinde etkilidir ve iyi tolere edilebilirler. Uyku bozukluğu, anksiyete ve yeme bozuklukları, ağrılara bağlı gelişen psikolojik sendromlar, aritmi ve bağışıklık disfonksiyon tedavilerinde de kullanımı iyi bir seçenektir(Hamon ve ark., 2006). Dopamin, norepinefrin veya serotoninin Klinikte kullanılan antidepresan ilaçlar grubunda olduğu ve beyindeki etkilerini doğrudan veya dolaylı olarak artırarak işlev gösterirler (Örsel, 2004).

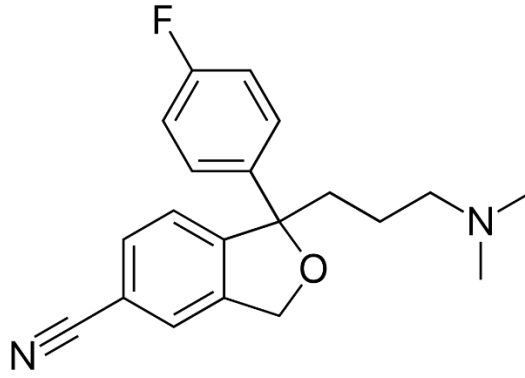
2.3.1. Sitalopram

Seçici serotonin geri alım inhibitörüdür (SSRI)(Keller, 2000). Sitalopramın IUPAC adı ,1-[3-(Dimetilamino)propil]-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-karbonitrildir. Molekül formülü $C_{20}H_{21}FN_2O$ şeklindedir (Şekil 2.3.) ve molekül ağırlığı 324,40'tır (Gürpınar ve ark., 2007). Serotonin özgüllüğü en yüksek olan r ve en seçici moleküldür. (Gürpınar ve ark., 2007). Sitalopram, norepinefrin ve dopamin geri alımı üzerinde minimum etkiye sahiptir. Diğer nöroreseptörler üzerinde önemli bir aktiviteye sahip değildir (Uzbyay, 2004).

Sitalopram depresyon tedavisinde kullanılmak üzere 1998 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Gürpınar ve ark., 2007). Depresyon ve anksiyete tedavisinde 12 yaşın üstündeki yetişkinlerde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından uygun görülmüştür. Bunun yanında panik bozukluk, sosyal aktivite bozukluk ile obsesif kompulsif bozukluk tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun yanında kadınlarda Premenstrüel sendrom belirtilerini aza indirir (Keller, 2000).

Sitalopram, yapısında florofenil ve dimetil-3-aminopropil gruplarının bağlandığı kiral bir merkeze sahiptir. S(+)-SIT ve R(-)-SIT olmak üzere iki enantiyomere sahiptir ve hem rasemik hemde saf enantiyomere sahip tek SSRI'dır (Macek ve ark., 2001).

Sitalopram ilk olarak 1972'de sentezlenerek 1989 yılında Danimarka ilaç şirketi Lundbeck tarafından pazarlanmıştır. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), 1998 yılında majör depresif bozukluğun tedavisi için kabul edilerek pazarlanmıştır (Macek ve ark., 2001).



Şekil 2.3. Sitalopram Molekül Yapısı

2.3.1.1. Sitalopramın Farmakokinetiği

Sitalopramın desmetilsitaloprama sitokrom P450 sistemi izozimlerinden % 38 oranında CYP2C19, % 31 oranında CYP3A4 ve % 31 oranında CYP2D6 tarafından biyotransformasyonu gerçekleştirilir. Sitalopramın birden fazla CYP enzimi tarafından metabolize edilmektedir. Biyotransformasyon inhibisyonunun bir enzimin inhibisyonunun diğer bir enzim tarafından dengelenebilme olasılığından daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu da sitalopram diğer ilaç ve ilaç türevleriyle birlikte alındığında, farmakokinetik olarak ilaç etkileşimleri oluşturma olasılığının düşük olduğunu göstermektedir (Uçkun, 2011).

Sitalopram;

- ✓ (5-HT) serotoninin SSS'de selektif olarak inhibe eder.
- ✓ 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}
- ✓ Dopamin D₁ ve D₂
- ✓ α_1 - , α_2 - ve β - adrenerjik
- ✓ Histamin H₁
- ✓ Gama aminobutirik asid (GABA)
- ✓ Muskarinik
- ✓ Kolinergik
- ✓ Benzodiazepin

reseptörleri üzerinde etkisi azdır.

Genel antidepresanların yan etkileri;

- 1) ağız kuruluğu

- 2) görmede bulanıklık
- 3) korku, heyecan, gerginlik veya anestezi amacı ile sedasyon
- 4) kardiyotoksik etkiler
- 5) ortostatik hipotansiyon

olarak sıralabilir.

Antidepresan etki 2-4 hafta içinde başlar ve doğrusal bir farmakokinetiğe sahiptir. Gıda alımı ile emilimi arasında herhangi bir ilişki olduğuna yoktur. Biyoyararlanım % 80'dir ve karaciğerde metabolize olur. Plazma proteinlerine bağlanma oranı % 80'dir. Otuz altı saatlik eliminasyon yarı ömrü vardır. Aktif metabolitleri; desmetilsitalopram, didesmetilsitalopram, sitalopram-N-metil, inaktif olan metaboliti deamin propionik aside dönüşür. Alınan günlük doz seviyesinin yaklaşık % 12'si doğrudan dışkılama ve idrar yolu ile atılır. Yetersiz hepatik fonksiyonları olan hastalarda eliminasyon oldukça yavaştır (Hariri ve ark., 2016).

Sitalopram'ın farmakokinetik özelliklerine baktığımızda emilimi neredeyse tamdır. Tmaks ortalama 3,8 saat ile besin alımından bağımsızdır. Yaklaşık %80 Oral biyoyararlanıma sahiptir. Görünür dağılım hacmi (Vd) β kg başına yaklaşık 12,3 L'dir. Plazma proteinine bağlanma oranı sitalopram ve ana metabolitleri için % 80'in altındadır. Sitalopram'ın biyotransformasyonu; aktif desmetilsitalopram, didesmetilsitalopram, sitalopram-N-oksit ve aktif olmayan bir deamine propiyonik asit türevine metabolize olarak gerçekleşir. Sitalopramın ana bileşikten daha zayıf olan aktif metabolitleri de SSRI'dır. Plazmada değişmeden kalan sitalopram en çok bulunan türdeki bileşiktir.

- 1) Yarılanma ömrü (T_{1/2}) yaklaşık 1½ gündür
- 2) Sistemik sitalopram plazma klirensi (K_l) yaklaşık 0,33 L/dk
- 3) Oral plazma klirensi (K_{loral}) yaklaşık 0,41 L/dakikadır.

Sitalopramın %85 lik önemli bir bölümü karaciğerden atılır. %15 lik kalan kısım ise böbreklerden atılır. %12'lik değişmemiş sitalopram idrarla atılır. Karaciğer (rezidüel) klirensi dakikada yaklaşık 0,35 L, böbrek klirensi dakikada yaklaşık 0,068 L'dir.

Farmakokinetiği doğrusaldır. 1-2 hafta içinde kararlı durum plazma seviyelerine varır. 40 mg'lik günlük doz kullanılarak 50 nmol/L'lik (100-500 nmol/L) ortalama derişimlere ulaştığı rapor edilmiştir. Sitalopram plazma seviyeleri ile terapötik yanıt veya yan etkiler arasında net bir ilişki yoktur (Uçkun , 2011).

2.3.1.2. Sitalopramın Diğer İlaçlar ile Etkileşimi

Sitalopram-metoprololün farmakokinetik/farmakodinamik etkileşim çalışmasında; metoprolol derişimlerinde iki kat artış gözlemlenmiştir. Buna rağmen sağlıklı gönüllülerden alınan kan basıncı ve kalp hızı üzerinde olan etkisinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir.

Sitalopram ve metoprolol eş anlı uygulaması önem arz etmektedir ve dikkat gerektirir. Doz ayarlamasında yine önemli bir durumdur (Hariri ve ark., 2016).

Sitalopram ve demetilsitalopramın diğer SSRI'larla karşılaştırıldığında; CYP2C9, CYP2E1 ve CYP3A4'ün ihmal edilebilir ölçüde inhibitörleri ve sadece CYP1A2, CYP2C19 ve CYP2D6'nın zayıf inhibitörleri ihmal edilebilir ve zayıf inhibitörleridir.

Levomepromazin, digoksin ve karbamazepin, klozapin ve teofilin, varfarin, imipramin ve mefenitoin, spartein, imipramin, amitriptilin, risperidon, varfarin, karbamazepin (ve metaboliti karbamazepin epoksit) metabolitleri ile birlikte verildiğinde herhangi bir değişim olmamıştır. Klinik olarak bakılacak olursa da önemli olmayan çok küçük değişiklikler görülmüştür.

Sitalopramın levomepromazin veya digoksin ile kullanımında, sitalopramın P-glikoproteini herhangi bir yönde etkilediğini gösteren bir bulgu görülmemiştir.

Desipramin, imipramine ait farmakokinetik bir çalışmada, sitalopram ve imipramin seviyelerinde herhangi bir etki olmazken, desipramin (imipraminin primer metaboliti) seviyelerinde artma olduğu gözlemlenmiştir. Bu sebepten Desipramin dozunun azaltılması gerekebilir.

Metoprolol ile Essitalopram (sitalopramın aktif enantiyomeri), CYP2D6 enziminin bir inhibitörüdür. Birlikte alımında dozaj ayarlaması yapılması gerekmektedir.

Metoprolol ile birlikte uygulama sonucunda metoprololün plazma seviyelerinde iki kat artışa neden olsa da metoprololün kan basıncı ve kalp ritmi üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmamıştır (Uçkun, 2011).

2.4. Ayırma ve Zenginleştirme Yöntemleri

Son yıllarda gelişen teknolojik aletlerin artmasına karşılık biyolojik örnek, çevre ve gıda örnekleri gibi türden matrislerde yer alan türlerin hassas ve doğru tayini için örnek

hazırlama yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü analizi yapılmak istenen analit oldukça düşük miktarlarda bulunmakta ve örnek ortamının bozucu etkileri bu durumu zorlaştırmaktadır. Örnek hazırlama yöntemleri genellikle ayırma ve zenginleştirme sağlayan ekstraksiyon yöntemleridir. Örnek hazırlama yöntemlerinin çoğu zaman alıcıdır ve fazla dozlarda kimyasal madde kullanımına ihtiyaç duyulan aşamalara sahiptir. Son yıllarda birçok farklı ekstraksiyon yöntemi gelişmeye başlamıştır. Bunların önemli özellikleri uygulanan işlemler kolaylıkla sağlanabilir, kimyasal tüketimini en aza indirmeyi hedefler, zamandan tasarruf sağlamayı amaçlar, çevre ve insan sağlığına zararlı zehirli atıklar için güvenli ortam sağlayarak en aza indirir ve otomasyona imkan sağlar (Kole ve ark., 2011; Mohamed, 2015; Vaghela ve ark., 2016).

Ekstraksiyon (Özütleme) yöntemleri, ayırma ve zenginleştirme yöntemlerinden en çok kullanılanıdır. İlgili analit bileşiklerinin bir fazdan başka bir faza taşınması işlemi ekstraksiyon olarak tanımlanır. Ekstraksiyon işlemleri oldukça basit ve hızlı olmalıdır. Bunun sebebi analiz süresini kısaltmaktır. Klasik tekniklerde bu işlemler uzun zaman gerektirmekte ve ekstrakte edilen maddeler kayıplara neden olmakta ve bozunmaya uğramaktadır. Yeni nesil ekstraksiyon yöntemlerinde ise ekstra saflaştırmaya gereksinim duyulmamalı ve artık çözücü içermemelidir. Çeşitli kaynaklarda, birçok ekstraksiyon yöntemi mevcuttur. Çalışmamızda, katı fazın tekrar tekrar kullanılabilmesi, desorpsiyonda düşük organik çözücü gereksinimi, tekrarlanabilirliğin iyi olması gibi avantajları nedeniyle ayırma zenginleştirme yöntemlerinden katı faz ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır.

2.5. Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi

Katı faz ekstraksiyonu (KFE), seçiciliği yüksek numune hazırlama için en popüler tekniklerden biridir. KFE kullanım amaçları arasında;

- Matriksi Saflaştırma
- Eser miktardaki hedef analiti zenginleştirme
- Tuzdan arındırma,
- Türevlendirme
- Sınıf fraksiyonlama

gibi işlemler bulunmaktadır.

Adsorban olarak kullanılacak madde sentezinin artması ve ticari olarak sunulması nedeniyle KFE yönteminin gelişimi ile kullanım alanları genişlemekte ve popülerliğini devam ettirmektedir. KFE'nin temel prensibinde hedef analiti içeren sıvı numune ortamı ile katı bir sorbent (katı faz adsorban) arasındaki ayrılmanın sağlanmasını içermektedir (Buszewski ve ark., 2012).

Genel prosedür; analiti içeren bir çözeltilerden seçimli olarak genellikle analiti katı faza yüklemek, analit dışındaki türleri uzaklaştırmak ve daha sonra hedeflenen analit yada analitleri katı fazdan bir başka çözücü ortamına sıyrarak toplamaktır. Analize uygun bir KFE ekstraksiyon adsorbanının belirlenmesi ve seçimi önemlidir (Bişgin ve ark., 2018).

Ekstraksiyon emici maddesinin seçiminde katı emici madde ve sıvı analit arasındaki etkileşim mekanizmaları arasındaki etkileşim dikkate alınmalıdır. Bu seçim için çözünen ve adsorbanın suyu sevip sevmeme durumu (hidrofobik-hidrofiliklik), kutupsal olup olmama ve iyonojenik özelliklerinin bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır. KFE'deki analitlerin tutunmasında ve sıyrmasında Van der Waals kuvvetlerine, dipol-dipol kuvvetlerine, hidrojen bağına, polar olmayan etkileşimlere, katyon-anyon etkileşimlerine (iyonik etkileşimler) dayanmaktadır (Andrade-Eiroa ve ark., 2016; Asgharinezhad ve ark., 2015). KFE metodunda tutunmanın gerçekleşmesinde ortamın pH değerlerine bağlı olarak analit ile sorbent arasında etkili bir bağlanma olması nedeniyle pH önemli parametrelerden biridir. Sorbentlerin yüzey özellikleri ve analitlerin moleküler yapısı, numune matrisinin pH'ına göre değişebilmektedir. Bu nedenlerle analit pKa değerlerindeki iyi bilinmesi ve doğru değerlendirmesi ile tutunma işlemi sırasında ortamın uygun pH'ya ayarlanması önemli olmaktadır (Andrade-Eiroa ve ark., 2016).

Katı faz ekstraksiyonu genellikle kolon ve çalkalama tekniği olarak iki şekilde uygulanmaktadır. Kolon tekniğinde katı faz sorbenti kolona doldurulur. Analiti içeren çözeltiler bu kolondan geçirilerek ayrılacak türlerin sorbente tutunması sağlanır. Sorbent yıkandıktan sonra uygun bir elüsyon çözeltilisi ile tutunan türler geri alınır. Çalkalama tekniğinde ise analizi yapılacak olan örnek çözeltili üzerine sorbent katılarak belirli süre çalkalama, vorteksleme ya da ultrasonik çalkalama vb ile analit ile sorbentin teması sağlanır. Analitin sorbente tutunması sağlandıktan sonra süzme, dekantasyon ya da sorbent magnetik ise miknatis ile çözeltili ortamından katı faz ayrılması sağlanır. Ayrılan

katı faz üzerindeki analit/analitlerin uygun çözücü ile elüsyonu yapılır ve bu sayede istenilen analit türü tayin edilir (Andrade-Eiroa ve ark., 2016; Hennion, 1999).

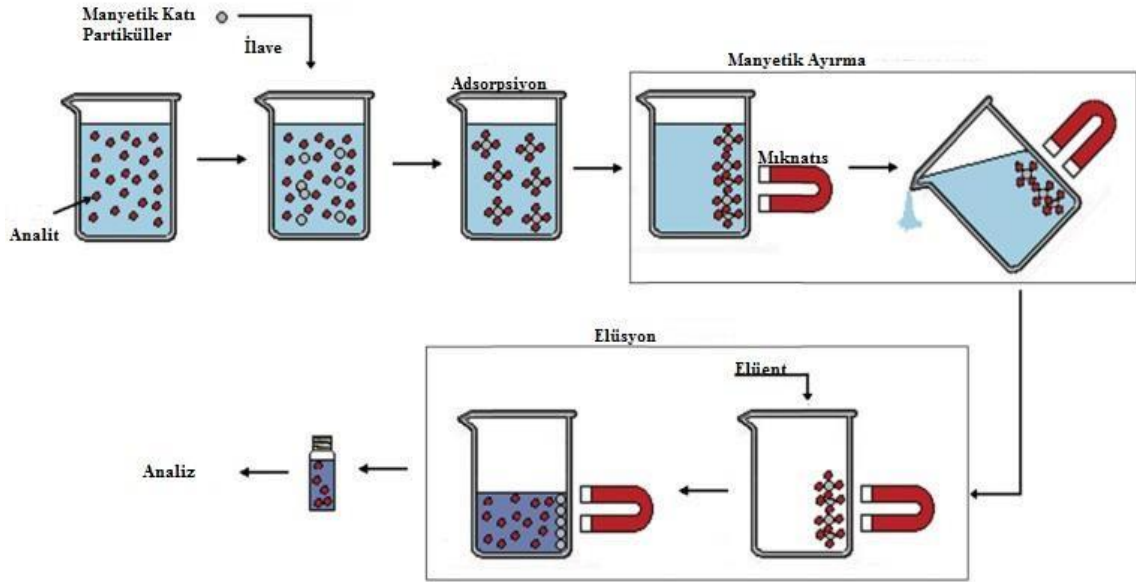
Katı faz ekstraksiyon metodunun geleneksel sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemine göre avantajları şu şekilde sıralanabilir.

- KFE metodu diğer yöntemlere göre çabuk sonuç verir.
- Örnek hazırlanması için uzun süreye ihtiyaç yoktur.
- Yöntem oldukça pratiktir ve bütün laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir.
- Kimyasal madde ve çözücü kullanımı azdır, bu maliyeti düşürür ve daha çevrecidir.
- Geri kazanım oranı genellikle daha yüksektir (Bişgin ve ark., 2018).
- Örnek ortamı, adsorban madde ve çözücüler arasında oluşabilecek bulaş riski az olduğundan daha hassas ölçümler alınabilir (Hemmati ve ark., 2018; Liljegren, 2005; Vasconcelos ve ark., 2017).
- Çözücü ve örnekler az miktarlarda kullanılır bu yüzden zehirli kimyasallar ile temasın azalmasına bağlı olarak çevreyi kirletme riskini de düşürür.
- Fazla sayıda örnek eş zamanlı analiz edilebilir ve analitik cihazlar ile otomasyonu sağlanabilir (Hemmati ve ark., 2018; Liljegren, 2005; Vasconcelos ve ark., 2017).

2.5.1. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi (MKFE)

Katı faz ekstraksiyon yöntemlerinden biri olan ve manyetik özellik taşıyan adsorban kullanılarak gerçekleştirilen bir yöntemdir. MKFE’de analitin de içinde bulunduğu çözelti ortamına sorbent olarak manyetik partiküllerin eklenmektedir. Eklenen manyetik partiküller magnetit (Fe_3O_4) adı verilen bir tür ve onun türevlerinden oluşur. Sol-jel tekniğine benzer teknikler kullanılır ve yüzeyleri silika, alümina oksitler vb. ile kaplanır. Yöntem uygulanırken hedef analit/analitler manyetik adsorban üzerine adsorbe edilme ilkesine dayanmaktadır (Sarıkaya ve ark., 2021). Ardından dışardan bir manyetik alan oluşturularak (mıknatıs gibi) sulu çözeltiden ayrılır. Manyetik adsorban üzerinde tutunan analitler uygun elüsyon çözücüleri kullanılarak aynı şekilde desorbe edilir (Şekil 2.4.) Birden fazla matriks çözeltilerinin bulunduğu durumlarda MKFE yöntemin tercih edilmesinin nedeni hedef analit ile uyumlu olan bir faz yüzeyine sahip oluşundandır. Geleneksel KFE tekniklerine göre manyetik partikül üzerine adsorbsiyon

daha kolaydır (Yuvali ve ark., 2020). Manyetik partiküllerin kullanılması KFE'deki ekstraksiyon prosedüründe yer alan birtakım aşamaların sayısını aza indirger ve analitlerin izolasyonu kolaylaştırarak zamandan tasarruf sağlar. MKFE' de kullanılan harici manyetik alan manyetik faz maddesi yüzeyine adsorbe edilen (bağlanan) analitlerin ayrılmasını oldukça pratikleştirir. MKFE oldukça çevreci bir yöntemdir ve yeşil kimya ilkeleri kapsamında organik çözücü kullanımını en aza indirgenir. Bu sebeple tehlikeli ve zehirli atıkların oluşumu önlenmiş olur (Hu ve ark., 2018; Li ve ark., 2014; Wierucka ve ark., 2014).



Şekil 2.4. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Şematik Gösterimi (Çaylak, 2019)

2.5.2. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemi

Modern analitik cihazların özellikleri sürekli gelişmesine rağmen karmaşık matrislere sahip analitlerin doğrudan tayinleri için kullanımında halen uygun olmayabilmektedir. Hedef analit moleküllerinin karmaşık bir matrisde bulunması ve düşük derişimler nedeniyle ön numune hazırlama işlemlerine gereksinim duyulmaktadır. Bunun için analizden önce ayırma ve zenginleştirme işlemleri için ön numune hazırlama basamağı gerekmektedir. Örnek hazırlama tekniklerinden birisi de katı faz ekstraksiyon tekniği olarak uygulanan fabrik faz ekstraksiyon (FFE) tekniği son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır (R. Kumar ve ark., 2014; Zilfidou ve ark., 2018).

2014'te Kabir ve Furton, yeni bir numune hazırlama tekniği geliştirdiler. Bu teknik yeşil kimyaya uygun çevreci bir yeni nesil numune hazırlama tekniğidir. Bu yeni katı faz ekstraksiyon tekniği Fabrik Faz Ekstraksiyon olarak literatüre girmiştir.

FFE tekniğinde sentetik ya da doğal bir kumaş yüzeyin üzeri ultra ince bir kaplama ile kaplanır. Bu teknik genelde Sol-Gel kaplama tekniğidir. Eşit bir kaplama sağlanması önemlidir çünkü, substrat ve polimer arasındaki kimyasal bağ nedeniyle FFE zarının yüksek termal, solvent ve kimyasal stabilitesini sağlar (R. Kumar ve ark., 2014). FFE'de öncelikle analitin bulunduğu numune katı faz ile temas ettirilerek analitin adsorban üzerinde tutulması sağlanır (hedef maddenin adsorpsiyonu). Ardından katı faz tamamen organik solvente daldırılır ve hedef analit organik solvente geri ekstrakte edilir (hedefin desorpsiyonu). FFE; çok çeşitli sorbent kullanımına izin veren tek mikro ekstraksiyon tekniğidir. Kullanılan fabrik fazlar %100 pamuk selüloz (hidrofilik) veya cam elyaf (nötr) veya polyester (hidrofobik) olabilir (R. Kumar ve ark., 2014; Zilfidou ve ark., 2018).

FFE, katı faz ekstraksiyonu veya mikroekstraksiyon tekniğinde birçok farklı özelliğe sahip yeni nesil bir numune hazırlama tekniği olarak ortaya çıkmıştır. FFE dünya genelinde popülerliğini artırmaktadır. Yöntemin birçok analit için kullanılabilceği öngörülmektedir. FFE'nin bazı avantajları;

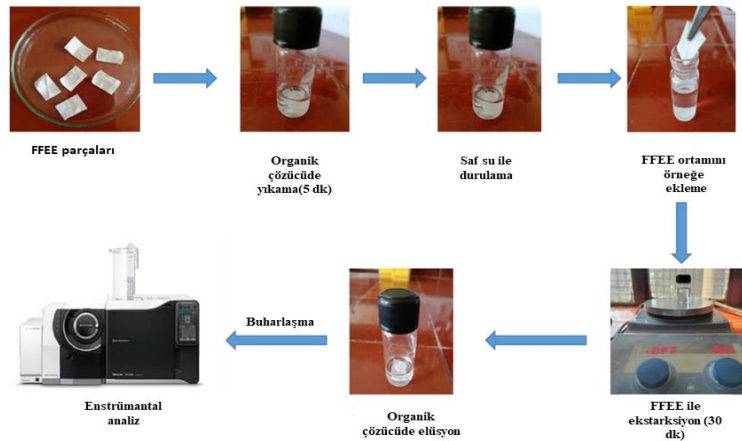
- Performans üstünlüğu ve yeniden kullanılabilirliği,
- Yeşil ve çevreci analitik ilkelerin uyumluluğu,
- Geniş pH çalışma aralığı,
- Basit işlem uygulaması, maliyeti düşük cihaz kullanımı ve hızlı adsorpsiyon yetenekleri
- Fabrik fazı numuneye doğrudan eklenebilmesi ve geri alınabilmesi nedeniyle uygulama kolaylığına sahip olması
- Daha az numune işleme adımı sayesinde olası hata kaynaklarını ve numune hazırlama maliyetini azaltılması,
- Adsorban olarak yüzlerce yeni kaplama ile kullanılabilir ve uygulama alanının geliştirilebilir olması,
- Adsorban ve fabrik madde matriksi arasındaki kimyasal bağ nedeniyle fabrik fazın yüksek kimyasal stabilitesinin sağlaması (Kabir ve ark., 2021; R. Kumar ve ark., 2014)

olarak sıralanabilmektedir.

Numune hazırlama adımlarının sayısının düşük olması analit kaybı ve mevcut deneysel hata risklerini en aza indireceğinden, FFE işlem basamağının az olması nedeniyle avantajlı bir tekniktir. FFE, geniş bir temas yüzey alanına sahiptir ve hedef analitleri hızla adsorbe edebilir. Kullanılan organik çözücünün düşük viskoziteye sahip olması ile hedef analitin 2-10 dakika içinde fabrik fazdan alınması mümkün olmakta ve daha az organik çözücü ile ekstraksiyon tamamlanabilmektedir (Kumar ve ark., 2014).

FFE farmasötik, çevresel, gıda, biyolojik ve toksikolojik örnekler dahil olmak üzere çok çeşitli numune matrislerinde uygulamalar bulmuştur. Tüm bu uygulamalarda FFE, sol-jel kaplama teknolojisinin yüksek gözenekli fabrik fazın substratına olan uyumu, çevresel numunelerin hedef moleküllere yüksek oranda tutunması gibi özellikleri sayesinde çok iyi bir numune hazırlama tekniği olduğu düşünülebilir.

FFE ortamının yüksek kimyasal kararlılığı, yüksek asidik ve bazik pH'larda çalışılabilme imkanı sağlamaktadır. Sol-jel sorbentin gözenekli yapısı ve fabrik fazın geçirgenliği, ekstraksiyon süresini en aza indirgeyerek FFE'yi sıkça kullanılan numune hazırlama tekniklerinden biri haline getirmiştir. FFE yönteminin uygulama basamakları Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemi Aşamaları (Jain ve ark.,2023).

Yeni FFE yöntemi üstün ekstraksiyon verimi, daha yüksek ön konsantrasyon faktörü, hassasiyet ve basitliği sağlamaktadır (Kabir ve ark., 2017). FFE'nin pek çok avantaja sahip olması araştırmacıya birçok uygulama için uygun yöntemi seçme konusunda daha fazla seçim yapma imkanı sağlamaktadır.

2.6. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi kalitatif ve kantitatif analize olanak sağlayan bir ayırma yöntemidir. Maddeleri saflaştırmak, tanımak ve analizini yapmak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

1903 yılında Michael Tswett tarafından keşfedilen kromatografide adsorbe edici (genellikle selüloz, nişasta vb.) bir madde ile dolu cam kolondan bitki pigmenti içeren çözeltiyi geçirmiştir. Bu sayede klorofil ve ksantofil gibi bitki pigmentlerinin ayrılmasını gerçekleştirmiştir.

Kromatografide sabit (durgun) ve hareketli fazlar bulunmaktadır. Bir çözelti içinde yer alan fiziksel ve kimyasal özelliklerinin farklılığından yararlanılarak çözeltinin hareketli faz aracılığı ile sabit bir faz üzerinden geçirilerek, fazlardaki farklı dağılım katsayılarından yararlanılarak ayırım gerçekleştirilir (Ersin, 2020; Ünsal, 2006).

Günümüzde kromatografik cihazlar organik analizde en yaygın kullanılan kalitatif ve kantitatif analiz yöntemlerinden biridir.

2.6.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler ayrılma mekanizmalara göre geliştirilmiş ve sınıflandırılmıştır. Analizi yapılacak olan madde bir hareketli faz tarafından sabit faz üzerinden belirli bir hızda hareket ettirilir. Sabit faz ile etkileşen türler belirli alıkonma sürelerine bağlı olarak birbirlerinden ayrılır. Kromatografik yöntemler, uygulama şekli, hareketli fazın ya da sabit fazın türüne göre farklı adlar alır.

Uygulama biçimine göre, düzlemsel kromatografi (kağıt kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi) ve kolon kromatografisi (Gaz Kromatografisi (GC), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve süperkritik akışkanlı sıvı kromatografisi) olarak ikiye ayrılır. (Araç ve ark., 2022; Bengü, 2021).

Ayrılma mekanizmasına göre kromatografik yöntemler; ayrılma mekanizmalarına göre adsorpsiyon kromatografisi (Yıldırım, 2020), partiyon kromatografisi (Konak ve ark., 2014), iyon değiştirme kromatografisi (Yıldırım, 2020) ve jel filtrasyon (Moleküler Eleme) kromatografisi (Konak ve ark., 2014) olarak ayrılır.

Kromatografik metotlar; kullanılan hareketli fazın türüne göre ise sıvı kromatografisi (sıvı-katı kromatografisi ve sıvı-sıvı kromatografisi), gaz kromatografisi ve süperkritik akışkanlı sıvı kromatografisi olarak tanımlanır.

2.6.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

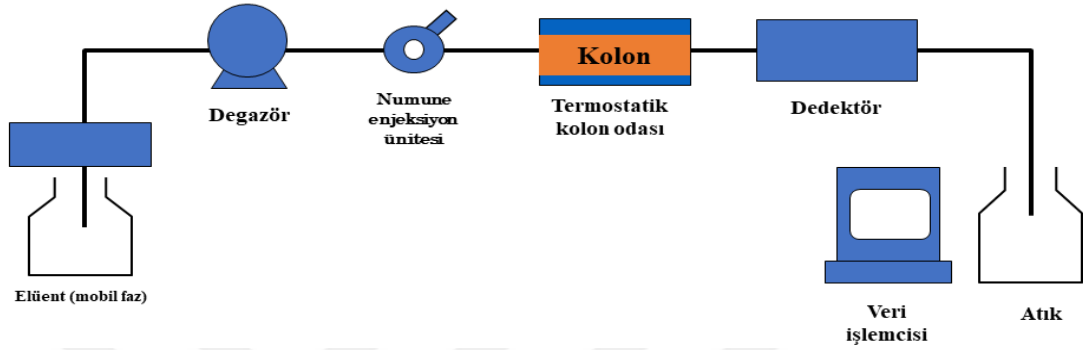
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi bir sıvı içinde çözülmüş bileşenler, kolon içinde bulunan hareketsiz (sabit) faz ile farklı etkileşimlere girerek kolon içinde farklı hızlarla hareket ederler. Farklı hızlarla hareket etme yeteneğinden dolayı kolonu farklı sürelerde terk ederek ayrılma sağlanır. (Eser, 2018; Ünsal, 2006)

HPLC, organik, inorganik, biyolojik ve çevresel örneklerde bulunabilecek birçok türü tayin etmek için kullanılan kromatografik bir yöntemdir. Son yıllarda ve günümüzde kullanım alanı ve kullanım sıklığı artmaktadır (D.A.Skoog ve ark.;2013). HPLC ilaçlar (Antibiyotikler, sedatifler, steroidler, analjezikler), biyokimyasallar (Amino asitler, proteinler, karbonhidratlar, lipidler), gıda maddeleri (Sunı tatlandırıcılar, antioksidanlar, aflatoxinler, katkı maddeleri), endüstriyel kimyasallar (Çok halkalı aromatikler, yüzey aktif maddeleri, iticiler, boyalar), pestisitler, herbisitler, fenoller, PCB'ler gibi kirletici ajanlar), klinik tıp (safra asitleri, ilaç metabolitleri, üre özütleri, östrojenler) ve uyuşturucular (Uyuşturucu ilaçlar, zehirler, kan alkolü, narkotikler) vb analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bengü, 2021).

Analitik ayırma sağlamak ve kalitatif ve kantitatif analiz amacıyla en yaygın kullanılan cihaz HPLC'dir. HPLC duyarlılığı yüksek, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilen, uçucu olmayan ancak sıcaklıkla hemen bozunabilen bileşiklerin kolaylıkla ayrılması ve tayini için uygundur. Sanayinin hemen her alanında kullanılabilir. Yaşamda sürekli kullanılan amino asitler, proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, ilaçlar ve pestisitler gibi türlerin analizinde de oldukça iyi sonuçlar vermektedir (Eser, 2018; Karaoğul, 2018).

2.6.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Bölümleri

HPLC analitik ayırmada en yaygın kullanılan cihazdır. HPLC cihazı degazör, pompa, oto örnekleyici, kolon (kolon firmı) ve dedektör olmak üzere (Şekil 2.6) temelde beş kısımdan oluşmaktadır (Yıldırım, 2020).



Şekil 2.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Şematik Gösterimi (Yıldırım, 2020)

Hareketli Faz: Hareketli faz analiti taşıma görevi yapar. Hareketli faz çözeltileri genel olarak su, sulu tampon çözelti, su veya tampon çözeltilerin metanol ve/veya asetonitril ile oluşturulmuş çözeltiler ya da organik çözücülerden oluşur. Ayırımın kolay ve doğru olabilmesini ortamın pH değeri ile mobil faz bileşimi etkiler. Hareketli faz seçilirken uygulanacak olan ayırma tipine dikkat edilmelidir. Aynı zamanda hareketli faz seçiminde, kullanılan teknik, numune tipi, kolon seçimi önemlidir ve dedektörün özelliklerine, sabit faz türüne ve yapılacak olan analizin biyolojik materyale uygunluk özelliklerine bağlıdır. Sabit faza hareketli faz aracılığı ile gelen numune etkileşime girer ve bir miktar alıkonulur. Bu nedenle sulu tamponlar, hidrokarbon türleri gibi farklı polaritelerde çözücülerin kullanıldığı faz sabit fazdır (Hakan & Yaylım, 2020). Dedeksiyon sisteminde girişim gerçekleşmemesi için kullanılacak tüm çözücüler oldukça saf olmalıdır. Eser miktardaki safsızlıklar dahi kolonu etkiler ve dedeksiyon sisteminde girişime neden olabilirler (Eser, 2018).

Hareketli fazın, saf olması, dedektöre uyumlu olması, örneği çözmesi, viskozitesinin düşük olması, kimyasal inertlik sağlaması ve düşük maliyetli olması istenir (Yaylım ve ark., 2020). Hareketli fazın uygulanmasına göre genellikle izokratik ve gradiyent olarak adlandırılır (Göktaş, 2019).

İzokratik elüsyonda; mobil faz analiz süresince sabit bileşime sahiptir. Bileşenlerin tamamı kolonda eş zamanlı sürüklenirken, farklı hızlarda göç ederek kolonu terkederler (Göktaş, 2019).

Gradiyenet elüsyonda; iki veya daha fazla çözücü sistemi kullanılır. Bu çözücülerin polarlıkları birbirinden farklıdır ve çözücü bileşimi analiz süresince sürekli ya da aşamalı olarak değiştirilir (Göktaş, 2019).

Degazör: Hareketli fazdaki hava kabarcıklarının ve çözünmüş havanın giderilmesini sağlar, mobil faz şişelerinden sisteme hareketli fazın taşınması durumunda kullanılır. Mobil faz sayısına ve pompa tiplerine göre uygun degazörler mevcuttur.

Pompa: HPLC sistemi içerisinde mobil fazın istenilen akış hızında yüksek basınçla hareket etme prensibini sağlayan kısımdır. Hareketli fazın analiz süresince enjektör, kolon ve dedektör üzerinden sabit akışını sağlar. Hareketli faz degazörden içerisindeki gazlar ayrılarak HPLC sistemi boyunca sabit akış hızında hareket eder. Analitik pompalar, genellikle akış hızı 0,1 – 5,0 mL arasında çalışır. Pompa sistemlerinin, izokratik (Tek Kanallı), binary gradient (Çift Kanallı Mikserli) ve quaternary gradient (Dört Kanallı Mikserli-Miksersiz) vb gibi farklı türleri mevcuttur (Araç ve ark., 2022). İzokratik sistemlerde; bileşimi sabit olan hareketli faz ve tek pompa kullanılarak yapılan ayrımları ifade eder. Gradient sistemlerde, mobil faz bileşimi ve istenilirse akış hızı analiz süresinde değişkenlik gösterir. Bu analizin kalitesini artırırken analiz süresini azaltır.

Örnekleyici: Örnekleyicinin görevi analit/analitleri kolon ve dedektöre göndermektir. Örnekler, HPLC'ye enjeksiyon ünitesinden ya manuel olarak ya da oto-örnekleyici ile enjekte edilir. Enjeksiyon ünitesinde bir enjeksiyon valfi ile örnek haznesi bulunmaktadır. Manuel enjeksiyonda örnek enjeksiyon öncesinde hareketli faz şartlarında çözüler ve bir şırınga yardımıyla valften enjekte edilir. Bu enjeksiyon işlemi yüksek basınç altında gerçekleştirilmeye uygun olarak dizayn edilmiştir. Numune yüksek basınçlı ortamdaki hareketli faza karışır ve kolona hareketli faz içinde çözünmüş olarak kolona ulaşır. Numune hacmi genellikle 5 -1000 µL civarında olur ve kolona doğrudan enjekte edilir. Enjeksiyon esnasında yapılan YBSK'da kesinliği düşüren en önemli faktörlerden birisidir. Otomatik enjektörler bu hatayı en aza indirir (Santhosh ve ark., 2014; Ünsal, 2006).

Kolon-Kolon Fırını: Sabit faz kolonuna hareketli fazda bulunan analit/analitleri taşıyan maddelerin, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre birbirinden ayrımının sağlandığı bölümdür. Kolonlar genellikle çelikten yapılır. Ayrıca, poliariletereterketon (PEEK) ve cam gibi maddelerden üretilen kolonlarda bulunmaktadır. Kolonların içi silika veya polimer gibi yüzey alanı büyük sabit faz dolgu maddesi ile doldurulur. Bu polimer veya silikalar genellikle fonksiyonel grup eklenerek dolgu maddesi olarak kullanılır. Son yıllarda silika bazlı kolonlar yerine daha iyi ve daha hızlı ayırma yapabilen mikro ve nano gözenekli polimer bazlı kolonlar üretilmeye ve kullanılmaya başlanmıştır. Polimer kolonlar daha uzun ömürlüdür ve rejenere edilebilirler. 4,5-5,0 mm iç çaplı kolonlar en sık kullanılanlardır ve bunların uzunlukları 2-30 cm aralığında olabilir. (Ünsal, 2006).

Kolon fırınının amacı, kolonu saklamak ve sıcaklığını sabit tutmaktır. Bazı ayırmalar sıcaklıktan çok fazla etkilendiğinden sıcaklık kolon fırını sayesinde sabit tutularak analizin güvenilirliği artırılır. Kolon fırınlarının genellikle blok ısıtıcılı, fanlı ve peltier olarak adlandırılan üç türü vardır (Ünsal, 2006). Peltier türü kolon fırınında sabit sıcaklığı sağlamak daha kolay olduğundan çok tercih edilen kolon fırınıdır (Bengü, 2021);

Dedektör: Dedektörler, kolondan alıkonma sürelerine göre çıkan analite bağlı olarak alınan cevap doğrultusunda sinyallerini kromatogram üzerinde pik olarak ifade eden cihazlardır. Dedektörler kolondan sonra yer alır. HPLC'de kullanılacak dedektörlerin, ölçebileceği konsantrasyon aralığı geniş olmalı, duyarlılığı yüksek olmalı, gürültü seviyesi düşük olmalı (S/N oranını iyileştirmek amaçlı) ve rezolüsyonun iyi olması istenir. Rezolüsyonun iyi olması için dedektör cevabı sıcaklık ve basınçtaki değişimlerden duyarsız olmalıdır. (Santhosh ve ark.,2014; Ünsal, 2006).

Sıvı kromatografisinde yaygın kullanılan dedektörler;

1. İletkenlik Dedektörü (Ünsal, 2006)
2. Elektrokimyasal Dedektör (Banu Bayram, 2011)
3. Refraktif İndeks (Kırılma İndisi) Dedektör(Karaoğul, 2018)
4. Floresans Dedektör (Kaynar, 2007)
5. Fotodiyot Dizisi Dedektör (PDA) (Emir, 2016)
6. Kütle Spektrofotometre Dedektör (MS) (Eser, 2018)
7. UV Dedektör (Ünsal, 2006)

olarak sayılabilir. Bunlar içinde en sık kullanılanı UV dedektör ve fotodiyot dizisi dedektördür.

2.6.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Türleri

HPLC ayrılma mekanizmalarına bağlı olarak normal faz kromatografisi, ters faz kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi, boyut dışlama (eleme) kromatografisi ve kiral ayırma kromatografisi olarak adlandırılmaktadır.

Normal faz kromatografisinde silikajel-polimer ve üzerine bağlanmış $-CN$, $-NO_2$ veya NH_2 dolgu maddeleri gibi polar sabit bir faz ile nanopolar ya da polaritesi düşük Etiler, Kloroform, Hekzan vb. çözücüler ve karışımları hareketli fazın oluşturduğu kromatografidir(Chaudhari ve ark., 2020). Polaritesi düşük olan analit ilk olarak kolondan çıkar. Bunun sebebi benzer benzeri çözer ilkesinden yararlanarak polaritesi düşük olan analit hareketli fazda iyi çözünerek kolonu en önce terkeder. Apolar yapıdaki analitin polar olan sabit faz ile az etkileşmesi sebebiyle kolonda kısa bir süre tutunur.

Ters faz kromatografisinde, silikajel-polimer ve üzerine bağlanmış onsekiz karbonlu düz zincirli C18, oktil veya fenil grupları, metil, etil ve $-NH_2$ gruplu dolgu maddeleri gibi apolar sabit faz ve metanol, ssetonitril, tetrahidrofuran gibi güçlü organik çözücülerin zayıf çözücü olan sulu veya tamponlanmış, pH ayarı yapılmış karışımları gibi polar mobil fazın oluşturduğu kromatografi sistemidir (Chaudhari ve ark., 2020).

Polaritesi yüksek olan analit kolonu ilk olarak terkeder. Yine benzer benzeri çözer ilkesinden yola çıkılarak polaritesi yüksek analit hareketli faz içinde oldukça iyi çözünür ve kolonu ilk olarak terkeder. Polar yapıdaki analit apolar yapıdaki sabit faz ile az etkileşerek kolonda kısa süre tutunur ve yine kolonu ilk terkeden grup olur.

Hareketli fazın polaritesi azaltılarak alıkonma süresi kısaltılır. Tam tersi durumda ise hareketli fazın polaritesi artırılarak alıkonma süresi artırılır.

İyon değiştirme kromatografisi, iyon yapıdaki bileşikleri ayırmada kullanılan bir tekniktir. Analitin katyon yapıda olduğu durumunda çoğunlukla kolonların dolgu maddeleri negatif yüklü fonksiyonel grup kullanılarak oluşturulur. Analitin Anyon yapıda olduğu durumda ise kolonların dolgu maddeleri pozitif yüklü fonksiyonel gruplu kullanılarak oluşturulur. Aynı zamanda molekülün kolonda tutunma gücü bir iyonun

molekül ağırlığı arttıkça artar. Bunun yanında suda çözünebilen organik maddeleri analiz etmede de kullanımını oldukça fazladır (Eser, 2018).

Boyut dışlama (eleme) kromatografisinde molekül ağırlıkları oldukça farklı olan analitleri bir arada analiz edilebilmesi amacıyla kullanılan bir tekniktir. Genelde kolonlardan mobil fazın geçişi kimyasal ve fiziksel etkileşimlerle olmasına rağmen bu teknikte tamamen fiziksel etkileşim mevcuttur. Molekül ağırlığı fazla olan analit kolon dolgu maddesindeki porlara sığmaz ve kolondan ilk olarak çıkar. Genel kullanım alanları büyük molekül yapıları polimerler, şekerler ve protein gibi tür analizlerinde kullanılır.

Eleme tekniği mobil fazın çözücü türüne göre; organik çözücünün kullanıldığı jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ve sulu çözeltilerin kullanıldığı jel filtrasyon kromatografisi (GFC) olarak ikiye ayrılır (Konak ve ark., 2014).

Kiral ayırma kromatografisi, sabit faz ile etkileşime giren fiziksel özellikleri aynı olan izomerlerin, izomer çifti olan diastereomere dönüştürülmesiyle gerçekleştirilir. Bunun için özel kiral kolonlar kullanılan bir yöntemdir (Topal ve ark., 2016).

2.7. Fingolimod ve Sitalopram Moleküllerinin Analizleri İçin Daha Önceden Yapılmış Olan Çalışmalar

Fingolimod ve sitalopramın farklı örneklerden ekstraksiyon ve analizlerine ilişkin literatür çalışmalarından bazıları aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

Azari ve ark.,(2015) Fingolimodun biyolojik sıvılarda spektrofotometrik tayini için sodyum dodesil sülfat (SDS) kaplı nanomiknatslar kullanarak karışık hemi-misel katı faz ekstraksiyonu önermişlerdir. Çalışmalarında sodyum dodesil sülfat (SDS) kaplı nano Fe₃O₄ bazlı karışık hemimisel katı faz destek maddesi kullanmışlardır. Bu yöntemi su, idrar ve plazma örneklerinde Fingolimod'un (FIN) ayrılması ve belirlenmesi için araştırmışlardır. Bu yeni sorbentlerin yüksek yüzey alanı ve sodyum dodesil sülfat (SDS) ile yüzey modifikasyonundan sonraki mükemmel adsorpsiyon kapasitesi nedeniyle iyi bir ekstraksiyon geri kazanımları üretilebileceğini öngörmüşlerdir. pH, yüzey aktif madde ve adsorban miktarları, iyonik güç, ekstraksiyon süresi ve desorpsiyon koşulları gibi ana faktörler incelemiş ve optimize etmişlerdir. Yöntemin

doğruluğu, eklenen numuneler üzerindeki geri kazanım ölçümleriyle değerlendirilmiştir ve su, idrar ve plazma için sırasıyla %96, %95 ve %88'lik iyi geri kazanımlar gözlemlenmiştir. Su, idrar ve plazma örnekleri için sırasıyla 0,998, 0,997 ve 0,995 tayin katsayılarıyla incelenen 2–26, 2–17 ve 2–13 mgL⁻¹ konsantrasyon aralıklarında uygun doğrusal davranışlar elde etmişlerdir (Azari ve ark., 2016).

Fracasso ve ark.,(2022) yaptıkları çalışmada, insan plazmasında Fingolimod ve aktif metaboliti Fingolimod-P'yi ölçmek için HPLC-MS/MS geliştirerek doğrulamışlardır. Yöntemde iç standartlar Fingolimod-D4 ve Fingolimod-P-D4'ün kullanılmıştır ve plazma proteininin asetonitril kullanılarak çöktürülmesine dayanmaktadır. Çöktürme yapıldıktan sonra tandem kütle spektrometrisi ile kromatografik ayırma gerçekleştirmişlerdir. Yöntem, “EMA biyoanalitik yöntem doğrulama yönergelerinde” belirlenen kriterlere uygun olarak doğrulanmıştır. Bu çalışmada açıklanan analitik yöntem, klinik yanıtlardaki bireyler arası değişkenliğin, ilaç biyoyararlanımındaki bireyler arası farklılıklarla açıklanıp açıklanamayacağını değerlendirmek için yararlı olabilmektedir(Fracasso ve ark., 2022).

Sarıkaya ve ark., (2021); idrar ve atık su örneklerinde Fluoksetin ve Sitalopram antidepresanlarının, fotodiyot dizi dedektörü ile birlikte sıvı kromatografisi ile hassas belirlenmesi için ekstraksiyon yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, antidepresan ilaçlar olan Fluoksetin (FLU) ve Sitalopram'ın (CIT) idrar ve atık sularda eser miktarda belirlenmesi için yeni bir analit ayırma ve zenginleştirme yöntemini manyetik katı faz ekstraksiyonundan (MKFE) sonra HPLC-DAD analizini kullanmışlardır. Önerilen yöntemde, FLU ve CIT, tamponun (pH 10.0) varlığında yeni sentezlenen manyetik sorbent (Fe₃O₄@PPy-GO) üzerinde tutularak ve daha sonra kromatografik tespitlerden önce daha düşük hacimli bir asetonitril içerisine desorbe etmişlerdir. HPLC analizinden önce tüm numuneler 0,45 µm PTFE filtreden filtrelendi. Optimum çalışma koşulları altında tespit limitini, doğrusallığı, zenginleştirme faktörünü ve diğer analitik değer rakamlarını belirlemek için etkileşim süresi, desorpsiyon solventi ve hacmi ve pH gibi deneysel parametreler incelemiş ve optimize etmişlerdir. Geliştirdikleri bu yöntemde, izokratik elüsyon ile 227 nm'de fluoksetin ve 238 nm'de sitaloprama karşılık gelen maksimum dalga boylarında diyot dizisi detektörü ile analizi gerçekleştirmişlerdir. Optimum koşullar altında FIN ve CIT için tespit limiti sırasıyla 1,58 ve 1,43 ng mL⁻¹ idi ve ölçüm limiti sırasıyla 4,82 ve 4,71 ng mL⁻¹ olarak belirlemişlerdir. 100 ng mL⁻¹ hedef

molekül içeren model çözeltilerinin üçlü analizleri için bağıl standart sapmaların (%RSD) % 5,0'dan az olduğunu bulmuşlardır. Yöntemi idrar (hem simüle edilmiş hem de gerçek sağlıklı insan) ve atık su örneklerine başarıyla uygulamış ve geri kazanım deneylerinde niceliksel sonuçlar elde etmişlerdir(Sarıkaya ve ark., 2021).

Kumar ve Sharma., (2021) fingolimod tablet analizlerinin rutin kalite kontrol çalışmaları için bir yöntem geliştirilmişlerdir. Yöntemde farmasötik dozaj formunda fingolimod varlığı tespiti ve tayini için yeni bir RP-HPLC yöntemi önermişlerdir. Kromatografik yöntemle gerçekleştirilen tayinde; fosfat tamponu (1,0 mL dk⁻¹) ve asetonitril (40:60 v/v) çözeltilerinden oluşan izokratik bir hareketli faz kullanılmıştır. Sabit faz olarak 30 °C ayarlanmış ODS kolonu (4,6 x 250 mm, 5 µm partikül boyutu) kullanılmıştır. Tayinler 260 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Sistem uygunluğu, doğrusalılık, hassasiyet, doğruluk, özgüllük, tespit limiti, kantifikasyon limiti, numune ve standart stok çözeltilerinin kararlılığı ve sağlamlık gibi doğrulama parametrelerini incelemişlerdir. Fingolimod için tutulma süresi 2,9 dakika olarak tespit edilmiş ve tabletlerin analizi için bağıl standart sapmanın % 2'den az olduğunu bulmuşlardır. Yöntem hızlı, doğru, kesin ve hassastır. Yöntemin LOD değeri 0,04 µgmL⁻¹ , geri kazanım değerleri %98-%102 aralığında yer almaktadır (Kumar ve ark., 2021).

Asgharinezhad ve ark.,(2015) yayımladıkları çalışmada polipirol/manyetik nanopartikül kompozitleri dispersif-m-katı faz ekstraksiyonu (D-m-SPE) için kimyasal oksidatif polimerizasyon prosesi yardımıyla sentezlemişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışmada idrar ve plazma örneklerinin HPLC-UV ile tespitini gerçekleştirmişlerdir. Bunu yapmadan önce her iki madde için ön deriştirme işlemi uygulamış ve numune pH'ı, sorbent miktarı, sorpsiyon süresi, eluent ve hacmi, tuz içeriği ve elüsyon süresi dahil olmak üzere çeşitli parametrelerin ekstraksiyon verimliliği üzerindeki etkisi araştırılmış ve optimize edilmiştir. Optimum koşullar; pH:9.0, sorbent miktarı 10 mg, sorpsiyon süresi 7 dk olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrileri 1–800 mgL⁻¹ aralığında doğrusal olduğunu ve sırasıyla LOD değerleri CIT için 0,2–1,0 mgL⁻¹ ve STR için 0,3–0,7 mgL⁻¹ aralığında olduğunu belirlemişlerdir. Yüzde ekstraksiyon geri kazanımları CIT için 93,4–99, ve STR için 94,0–98,4 idi. Bağıl standart sapmalar (n = 5) sırasıyla CIT için 4.8–8.4 ve STR için 4.3–9.2 aralığındaydı. Yöntemi insan idrar ve plazma örneklerinde CIT ve STR'nin ekstraksiyonu ve belirlenmesiyle başarıyla uyguladılar(Asgharinezhad ve ark., 2015).

Lahijani ve ark., (2017) insan plazma örneklerinde sitalopram hidrobromür ve nortriptilin hidroklorürün belirlenmesi için yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde HPLC-DAD ile birleştirilmiş ultrason destekli iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (UA-IL-DLLME) uygulanmıştır. Yöntem etkili ve çevre dostudur.

Optimize edilmiş koşullar altında doğrusallık $0,02-2,000 \mu\text{g L}^{-1}$ aralığında elde edildi. Tespit limitleri sitalopram için $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ve nortriptilin için $6 \mu\text{g L}^{-1}$ idi. Ön konsantrasyon faktörleri sitalopram için 920 ve nortriptilin için 800 idi. HPLC ile birleştirilmiş UA-IL-DLLME'nin mevcut yöntemi, insan plazmasının gerçek örneklerinde sitalopram ve nortriptilin ilaçlarının belirlenmesinde başarıyla kullanıldı. Yöntemde sitalopram için bulunan tayin sınırı değeri (LOD) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak tespit edildi. Yöntemin korelasyon katsayısı 0.9980 ve $50 \mu\text{g L}^{-1}$ lik çözeltinin %BSS değeri %3.2 olarak hesaplanmıştır (Lahijani ve ark., 2017). Çalışmamızda sitalopram yanında fingolimod tayini yapılarak literatüre ilk kez kazandırılmıştır. Bunun yanında çalışmamızda sitalopram için tayin sınırı $6,85 \text{ ng mL}^{-1}$ derişimlerinde tespit edilmiştir. Yöntemde sitalopram için tayin katsayısı 0,9941 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin %BSS değeri $5,32 (20 \mu\text{g mL}^{-1})$ olarak hesaplanmıştır.

Fahimirad ve ark.,(2016), yapmış oldukları bu çalışmada Doksepin, Sitalopram ve Fluvoksaminin tandem dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu HPLC_UV kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın ilk adımında, sulu bir numune çözeltisinde (8,0 mL) bulunan analitleri organik bir çözücüye ekstrakte etmiş ve daha sonra bu analitleri daha basit sulu bir kabul edici faza (50 L) geri ekstrakte etmişlerdir. Genel ekstraksiyon süresi 7 dakikadır ve en iyi ekstraksiyon verimliliğini elde etmek için organik çözücünün türü ve hacmi, iyonik kuvvetin etkisi gibi yöntemi etkileyen değişkenlerin optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yöntem $10-5000 \text{ ng mL}^{-1}$ aralığında iyi bir doğrusallık gösterdi. Tespit limitleri $3-10 \text{ ng mL}^{-1}$ aralığındaydı. Gün içi kesinlik değerleri sitalopram, doksepin ve fluvoksamin için sırasıyla % 9,2, % 4,5 ve % 4,8 olarak bulundu geri kazanımlar % 58,5, % 52,9 ve % 39,3 olarak bulunmuştur.(Fahimirad ve ark., 2016).

Beiranvand ve ark., (2017), Sitalopramın ön konsantrasyonu için bulutlanma noktası manyetik katı faz ekstraksiyonun spektrofotometrik tayinini kullanmışlardır. Bulutlanma noktası ekstraksiyonu için iyonik olmayan yüzey aktif madde Triton X-100 kullanmış ve sorbent olarak nikel çinko ferrit manyetik nanokompozit kullanmışlardır.

Bu manyetik malzeme yüzey aktif madde açısından zengin fazın adsorpsiyonunu sağlamıştır. Uygulanan yöntem, iyonik olmayan bir yüzey aktif madde ortamının misellerinde CPE ile hedef analitlerin başlangıçta ekstraksiyonunu ve ardından misel fazını geri kazanmak için nikel çinko ferrit manyetik nanokompozitinin kullanılmasını içermektedir. Optimum ekstraksiyon koşulları pH: 9, adsorban dozajı: 60 mg, Triton X-100 konsantrasyonu: 50 mg ve $t = 50$ °C de doğrusal dinamik aralık 3,00–800,00 ng mL⁻¹ ve RSD sırasıyla % 1.62 ve % 2,93 idi. Yöntem için 0,42 ng mL⁻¹ sitalopram tespit limiti elde etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, yöntemin gerçek örneklerde sitalopram analizi için başarıyla uygulandığını göstermiştir.(Beiranvand ve ark ., 2017).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Çözeltiler ve Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar, hazırlanan çözeltiler, laboratuvar malzemeleri, analitik cihazlar ve özellikleri ile deneysel çalışmalar bu bölümde verilmiştir.

3.1.1. Hazırlanan Çözeltiler

Deneysel çalışmalarda kullanılan reaktiflerin tümü analitik saflıktadır. Çalışmalar esnasında kullanılacak olan çözeltiler için MP Minipure Dest Up cihazından elde edilen deiyonize su ile hazırlanmıştır.

pH 2,0-10,0 Britton Robinson (BR) Tampon Çözeltisi

Derişimi $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ olacak şekilde H_2BO_3 , H_2PO_4 ve CH_3COOH asitleri kullanılarak oluşturulmuştur. pH 2,0-11,0 arasında asitlik sabitlerine göre uygun aralıklarda istenen tampon çözeltiler hazırlanmıştır ve Metler Toledo markalı pH metre ile kontrolü yapılmıştır. 0,1 M NaOH çözeltisinden az az eklenerek istenilen pH'lara ayarlanmıştır. Ardından ışıktan ve ısıdan korunarak uygun koşullarda saklanmıştır.

Fingolimod Stok Çözeltisi, 1000 mg L^{-1}

Analitik saflıktaki Fingolimod HCl'den ($\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$) 55,9 mg tartılarak balon jojeye aktarılmıştır. Bir miktar metanol ile çözülüp son hacim metanol ile 50,00 mL'ye tamamlanarak amber renkli şişede buzdolabında $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Sitalopram Stok Çözeltisi, 1000 mgL⁻¹

Analitik saflıktaki Sitalopram HBr'den(C₂₀H₂₁FN₂O.HBr) 62,3 mg tartılarak balon jojeye aktarılmıştır. Bir miktar metanol ile çözülüp 50,00 mL'ye metanol ile tamamlanarak amber renkli şişede buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

Fingolimod ve Sitalopram Stok Çözeltisi, 50 mgL⁻¹

Analitik saflıkta hazırlanmış olan 1000 mgL⁻¹'lik ana stok çözeltilerden yararlanılarak sırasıyla 5,0 mL fingolimod ve sitalopram çözeltileri mikropipet ile balon jojeye alınmıştır ve belirli miktar metanol ile çözülüp son hacim son hacim metanol ile 100,0 mL'ye tamamlanmıştır. Karışım çözeltisi amber renkli şişede buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

ACN/MeOH (% 50:50) Çözeltisi: 50 mL ACN (Merck) ve 50 mL MeOH (Sigma Aldrich) mezür yardımıyla alınarak karıştırılıp cam şişeye aktarılmıştır.

Kalibrasyon grafiği için hazırlanan çözeltiler

1000 µg mL⁻¹'lik ana stok fingolimod ve sitalopram çözeltilerinden 100 µg mL⁻¹'lik karışım çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu karışım çözeltilisinden sırasıyla 2, 5, 10, 20, 40, 60 µg mL⁻¹ derişimde kalibrasyon standartları hazırlanmıştır.

3.1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı İçin Kullanılan Reaktifler

HPLC ile ayırmalarda hareketli faz olarak HPLC saflıktaki çözücüler kullanılmıştır. Sulu tamponlar ise, analitik saflıktaki kimyasalların deiyonize suda çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Fosfat Tamponu: 2,72 g KH₂PO₄ (Merck) katısından tartılıp bir miktar deiyonize su ile çözüldükten sonra pH 3'e ayarlanarak hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Asetonitril çözeltisi (ACN): % 99 saflıkta ACN (Merck) çözeltisi kullanılmıştır.

Metil alkol: ≥ 99,9 saflıkta metil alkol (MeOH) (Sigma Aldrich) çözeltisi kullanılmıştır.

3.1.3. Manyetik ve Fabrik Faz Sentezinde Kullanılan Reaktifler

Manyetik ve fabrik faz sentezinde analitik saflıktaki kimyasallar kullanılmıştır. pH ayarlamalarında % 28-30 saflıktaki derişik amonyum hidroksit (Merck) kullanılmıştır. Silanlama ajanı olarak % 99,9 saflıktaki (Sigma-Aldrich) tetraetil ortosilikat (TEOS)

çözeltisi ve % 99,9 saflıktaki (Sigma-Aldrich) aminopropiltriasetilsilan (APTES) çözeltisi kullanılmıştır.

Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

1,0 M HCl çözeltisi: Derişik % 37 lik HCl (Merck) çözeltisinden 3,2 mL alınarak içerisinde bir miktar deiyonize su bulunana balon joje içerisinde aktararak son hacmi deiyonize su ile 100 mL ye tamamlanmıştır.

1,0 M NaOH çözeltisi: %98 saflıkta sodyum hidroksit (Merck) katısından 4,08 g tartılıp balon jojeye alınmıştır. Hacmi deiyonize su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

% 50 (v:v) MeOH çözeltisi: Bir mezür yardımıyla 50 mL metanol (Sigma Aldrich) ile 50 mL deiyonize su karıştırılarak hazırlanmıştır.

L-Tirozin çözeltisi: Molar kütlesi 181,19 g mol⁻¹ olan L-tyrosinden 0,2 g tartılarak % 50'lik metil alkolde çözülerek çözeltinin son hacmi 50,0 mL'ye tamamlanmıştır.

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Kromatografik ayırmalar ve tayinler Shimadzu (Prominence) HPLC (Kyoto, Japan) ile yapılmıştır. HPLC cihazı LC 20 AD kuaterner pompa, DGU-20A vakum gaz giderici CTO-10 AS VP kolon fırını ve SPD-M20 A PDA dedektör'den oluşmaktadır. Tüm ayırmalar fenil hekzil kolonda (Luna 5µm 100 A⁰/LC Kolon, 250 × 4,6 mm) gerçekleştirilmiştir. Kromatogramların değerlendirmesi LC Solution 2.0 yazılımı ile yapılmıştır. Katı faz ekstraksiyonu için kullanılan katı faz destek maddelerinin hazırlanmasında ve bu maddelerin karakterizasyonu için kullanılan cihazlar aşağıda verilmiştir.

Çözeltilerin pH'ını ölçülmesinde JP Mettler Toledo pH metre kullanılmıştır. Ekstraksiyon sırasında çözeltileri karıştırmak için vortex (Jeitech, Korea) cihazı kullanılmıştır. Çözeltileri çözmek ve degaze etmek için SK521 OHP model ultrasonik su banyosu kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemlerinde karıştırma işlemi Fisherbrand marka rotator ile yapılmıştır. Çözelti hazırlanırken karıştırma ve ısıtma işlemleri için M Tops Model manyetik karıştırıcılı ısıtıcı kullanılmıştır. Tartımlar 0,1 mg duyarlıklı AXIS marka analitik terazi kullanılmıştır.

Karakterizasyon işlemlerinde Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde bulunan Perkin Elmer 400 model Fourier Dönüşümlü-İnfrared

Spektrometresi, LEO 440 model taramalı elektron mikroskobu ve Bruker AXS D8 X-ışını kırınımı cihazı kullanılmıştır.

3.2. MKFE için Manyetik Fe₃O₄@L-Tirozin Parçacıklarının Sentezi

Manyetik katı fazın sentezi için 8,74 g FeSO₄.7H₂O ve 24,2 g Fe (NO₃)₃.9H₂O karışımı üzerine 100,0 mL deiyonize su eklenmiştir. Demir tuzlarının çözünmesini artırmak için 10,0 mL 1,0 mol L⁻¹ HCl eklenerek 80 °C de 600 rpm hızda magnetik karıştırıcı ile karışırken üzerine 100 mL % 50 metil alkol çözeltisi yavaş yavaş ilave edilmiştir. Sentez tepkimesi azot gazı ile oluşturulan inert bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Karışmakta olan çözeltiliye 60 mL derişik NH₃ ekleyip 2 saat karıştırılarak magnetit oluşması sağlanmıştır. Oluşan siyah renkli çözelti içerisindeki Fe₃O₄ taneleri uygulanan dış manyetik alan yardımıyla toplanmıştır. Bu magnetit kısım belli oranlarda MeOH/H₂O karışımı ile yıkanıp 60 °C deki etüvde 6 saat süreyle kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruyan malzemenin 3,0 g'ı %50' lik metanol çözeltisinde yıkanarak ve ortama 2,0 mL kadar derişik NH₃, 3,0 mL TEOS ve 2,0 mL APTES eklenerek manyetik nanopartikül yüzeyleri kaplanmıştır. Silanlama işleminin ardından yine inert azot atmosferi ortamında 500,0 rpm de karışmakta olan taneciklerin üzerine 45-50 °C iken, 0,2 g L-Tyrosin'in 50,0 mL %50 metil alkoldeki çözeltisi eklenerek 4 saat boyunca karışmaya bırakılmıştır. Ardından 6 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra MeOH/H₂O karışımı ile birkaç defa yıkanarak kurutulmuştur.

3.3. Fabrik Faz Destek Maddesinin Sentezi ve Hazırlanması

Katı faz destek maddesi olarak kullanılan fabrik fazlar, Amerika Florida Uluslararası Üniversitesi'ndeki paydaşlarından olan Prof. Dr. Abuzar Kabir tarafından üretilmiştir. Deneysel çalışmalarımızda farklı fabrik fazlarla denemeler yapılarak en iyi sinyaller sol-gel PCAP-PDMS-PCAP fabrik fazı ile elde edilmiştir.

Fabrik faz, dış kir, partiküller ve yüzeydeki kimyasal kalıntıları gidermek ve yüzey hidroksil gruplarını aktive etmek için emici madde ile kaplanmadan önce ön işleme tabi tutulmuştur. 100 cm²'lik yapısı selülozdan oluşturulmuş fabrik faz parçası ilk olarak 15 dakika boyunca ultrasonik su banyosu ortamında bekletilmiştir. Ardından olası kirlere arındırılmak için birkaç kez daha deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra 1,0 M NaOH ortamında silanol gruplarını aktivitesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için yine fabrik faz 1 saat ultrasonik su banyosunda merserizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bunun ardından,

yine deiyonize su birkaç kez yıkandıktan sonra bu kez 0,1 M HCl ortamında 1 saat ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir. Kaplama çözeltileri ile etkileştirilmeden önce uygun bir sıcaklıkta 1 gece boyunca soygaz akımında bekletilmiştir.

Fabrik fazın yüzey kaplaması için, 5,0 g polikaprolakton-polidimetilsiloksan-polikaprolakton polimeri, 5,0 mL sol-gel metiltrimetoksisilan (MTMS), organik çözücü içinde 10,0 mL metilen klorür: aseton (50/50 v:v) ve katalizör olarak 2,0 mL trifloroasetik asit eklenmiştir. Karışım 3 dakika vortekslendikten sonra 5 dakika santrifüjlenmiş ve daha sonra 2 dakika ultrasonik ortamda bekletilmiştir. Santrifüj sonrası fabrik faz alınarak yine inert ortamda kurutulmuştur. Elde edilen fabrik faz 1,0 cm²'lik eşit parçalar halinde kesilerek deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

3.4. Önerilen Manyetik Katı Faz ve Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemleri

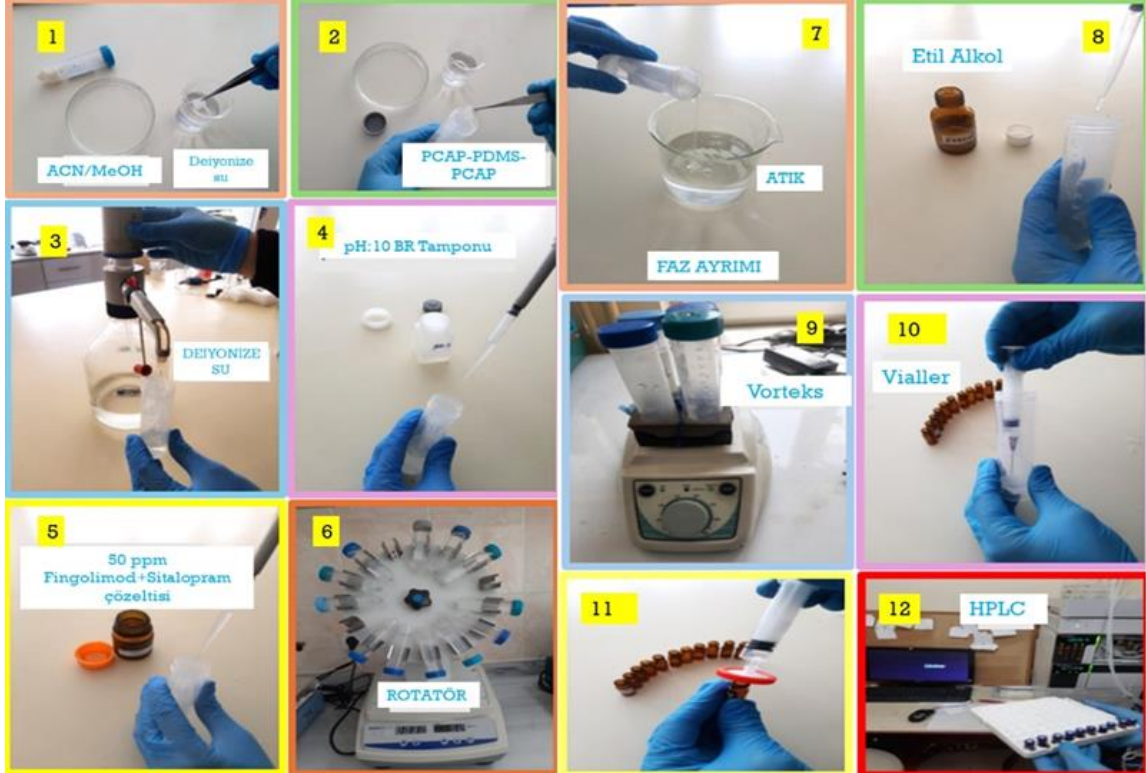
50 mL'lik falkon tüpe öncelikle sentetik idrar/sentetik tükürük çözeltilisine bilinen derişimde fingolimod ve sitalopram çözeltileri eklenmiştir. Ardından pH tamponları ile katı faz destek maddeleri onun üzerine eklenmiştir. Üzeri deiyonize su ile 50,0 mL ye tamamlanmıştır. Analit ile katı fazların arasındaki teması en etkili şekilde gerçekleştirmek için bir karıştırıcı ile adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Hedef analite bağlanmayı gerçekleştirdikten sonra uygun bir ayırma işlemi ile sıvı kısım ayrılmıştır. Katı faz destek maddeleri üzerinden tekrar analiti sıyırma işlemi yapabilmek için uygun bir çözücü ile desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözücü faz viallere alınarak analit tayinleri HPLC ile yapılmıştır.

3.4.1. Fabrik Faz Ekstraksiyon (FFE) Yöntemi

Geliştirilen yöntemde pH, desorpsiyon çözücüsü seçimi ve miktarı, adsorpsiyon süresi, vorteksleme süresi gibi parametreler optimize edilerek optimum koşullar altında FFE metoduna dayanan ayırma ve zenginleştirme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Fabrik fazlar kullanılmadan önce sırasıyla deiyonize su/ACN-MeOH çözeltisi/deiyonize su ile yıkama işlemi yapılmıştır. Daha sonra 50 mL'lik falkon tüplere 20,0'er mL deiyonize su, 50 µg mL⁻¹ derişimlerinde fingolimod ve sitalopram karışımı içeren ana stok çözeltiden 1,0 mL, 1,0'er mL pH:10 Br tamponu, 1,0 cm²'lik sol-gel PCAP-PDMS-PCAP fabrik fazlar eklenmiştir ve hacmi deiyonize su ile 50,0 mL'ye tamamlanmıştır. Falkon tüplerin kapakları iyice kapatılıp rotatör cihazına yerleştirilmiş ve 50 rpm'de 60

dakika çalkalanmaya bırakılmıştır. Çalkalanma tamamlandıktan sonra tüpler alınmış ve fabrik fazı sıvı fazdan ayırarak üzerlerine 500,0 µL etanol çözeltisi ilave edilip 60 s vortekslenmiştir. Böylelikle fabrik faza tutunan analit bileşenleri çözücü olarak belirlenen etanol'e geçişi sağlanmıştır. Bu desorpsiyon çözücü sıvı faz örnekleri enjektörlere alınarak 0,45 µm'lik politetrafloroetilen (PTFE) membran filtreden süzülerek, viallere aktarılmış ve HPLC ile tayinler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1)



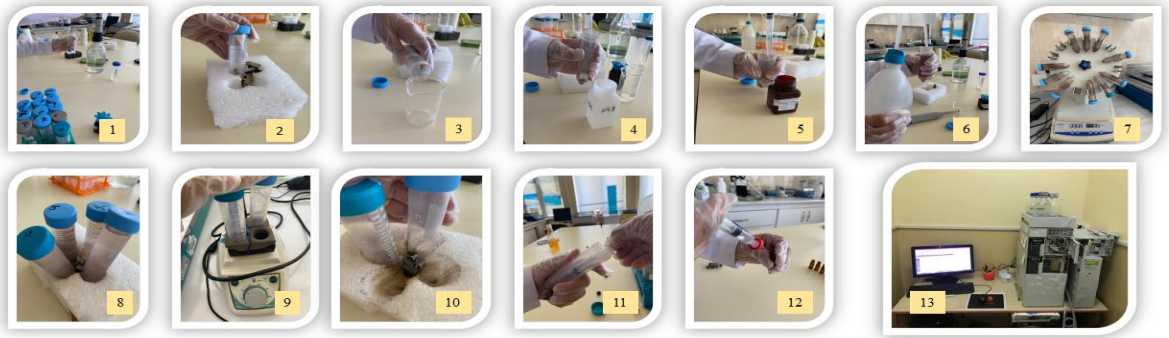
Şekil 3.1. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yönteminin Deneysel Aşamaları

3.4.2. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon (MKFE) Yöntemi

Geliştirilen yöntemde pH, desorpsiyon çözücüsü seçimi ve miktarı, adsorpsiyon süresi, vorteksleme süresi gibi yöntemin analitik parametreleri optimize edilerek optimum koşullar altında MKFE metoduna dayanan ayırma ve zenginleştirme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin optimum parametreleri belirlemek amacıyla model çözeltilerle deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 50,0 mL'lik falkon tüplere 50,0 mg manyetik katı faz eklenmiştir. Katı faz ACN-MeOH çözeltisi ile yıkanmıştır. Katı faz üzerine 20,0 mL

deiyonize su; 1,0 mL pH 8,0 Br tampon çözeltisi, 50,0 mg L⁻¹ derişimindeki fingolimod ve sitalopram karışım içeren ana stok çözeltiden 1,0 mL ilave edilerek son hacim deiyonize su ile 50,0 mL'ye tamamlanmıştır. Falkon tüplerin kapakları iyice kapatılıp rotatör cihazına yerleştirilmiş ve 50 rpm' de 30 dakika çalkalanmaya bırakılmıştır. Çalkalanma tamamlandıktan sonra tüpler alınmıştır ve manyetik faz bir dış magnet yardımıyla ayrılmıştır. Ardından 500,0 µL metanol çözeltisi ilave edilerek 40 s vortekslenmiştir. Böylelikle manyetik faza tutunmuş olan analit bileşenlerinin desorpsiyon çözücüsü metanol'e geçişi sağlanmıştır. Bu sıvı desorpsiyon çözücüsü enjektörlere alınarak 0.45 µm'lik PTFE membran filtreden süzöldükten sonra viallere aktarılmıştır. Metanol çözeltisindeki fingolimod ve sitalopram derişimleri HPLC ile analiz edilmiştir. Yöntemin basamakları şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3. 2. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Deneysel Aşamaları

3.5. Sentetik İdrar ve Sentetik Tükürük Çözeltilerinin Hazırlanması

İlaç analizleri için kullanılan moleköl tayinlerinin izlendiği örnek grupları genel olarak biyolojik örneklerdir. Biyolojik örnek ortamına benzemesi amacıyla yapay tükürük ve yapay idrar çözeltileri hazırlanmıştır ve uygulama aşamasında kullanılmıştır.

Sentetik İdrar Çözeltisi: 6,25 g üre, 0,27 g CaCl₂ .2H₂O, 0,25 g NH₃Cl, 0,4 g KCl, 0,35 g Na₂SO₄, 0,35 g KH₂PO₄, 0,73 g NaCl bir miktar deiyonize su ile çözümlenerek hacmi balon joje'de 250,0 mL ye tamamlanmıştır. Ardından pH'ı 0.1 M HCl çözeltisiyle pH 6,0'a ayarlanarak amber renkli şişede +4 °C' de saklanmıştır.

Sentetik Tükürük Çözeltisi: 4,2 g sodyum hidrojen karbonat (NaHCO₃), 0,5 g sodyum klorür (NaCl), 0,2 g Potasyum Karbonat (K₂CO₃) ve 30 mg sodyum Nitrit (NaNO₂) bir

miktar deiyonize suda çözülmüştür. Daha sonra hacmi 1,0 L ye tamamlanmıştır(Sri ve ark., 2015).

Gerçek örnek uygulaması amacıyla yapılan çalışmalarda, deney prosedüründeki 20,0 mL deiyonize su yerine sentetik idrar ve yapay tükürük çözeltileri konulmuştur (Paula ve ark., 2018).

3.6. Yöntemlerin Optimizasyon Basamakları

KFE temelli ayırma ve zenginleştirme yönteminde amaç önce analitlerin katı faza tutunmasını sağlayıp ardından analitlerin tamamının tekrar farklı bir çözücüye geçişini sağlamaktır. Bu sayede yüksek zenginleştirme sağlanmaktadır. 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 parametre optimize edilmiştir.

3.6.1. Çalışma Ortamının pH Etkisi

Numune ortamının pH'ı, kullanılan katı faz destek maddesinin yüzey yükünü etkilediğinden dolayı analitler ile diğer türler arasındaki reaksiyonları da etkiler. Ayrıca çalışmanın sonraki aşamalarındaki ekstraksiyon geri kazanımına etkisi vardır. Ortamın pH'ı asidik bölgeye değıştikçe ortamdaki pozitif yüklü iyonların miktarı artarken çözelti ortamındaki hidrofilik moleküllerin aktivitesini azalır. Bu amaçla hedef molekülün pKa değerleri, analitin katı faza yapışmasını ve farklı türler arasındaki reaksiyonları etkileyebilmektedir. Fingolimod ve Sitalopram'ın pKa değerlerinin sırasıyla 7,80 (Tamakuwala ve ark., 2016) ve 9,78 (Izadyar ve ark., 2016) olduğu bilinmektedir. Bu değerlerin çalışılan pH'ta hedef moleküllerin protonsuz formda olduğu ve yapılarının manyetik ve fabrik faz malzemelerin yüzeyine bağlanmaya daha uygun olduğu söylenebilmektedir.

Bu amaçla yönteme pH'nın etkisi model çözeltilerin pH'sı 2,0 ile 11,0 arasında ayarlanarak incelenmiştir. Optimum yöntem şartlarında pH uygun tampon çözeltilerle çalışılan pH'a ayarlanarak incelenmiştir.

3.6.2. Adsorbsiyon Süresinin Etkisi

Analitin numune ortamından katı faza yeterince tutulmasını sağlamak amacı ile optimize edilen koşullardan biridir. Katı fazdaki sorbent ile hedef moleküller arasındaki temas süresi etkileşimin artması için önemlidir. Aynı zamanda analitlerin yüksek ekstraksiyon verimliliği elde etmesinde de önemlidir. Temas süresi çalkalayıcı, vorteks, döndürücü vb. gibi çeşitli aparatlar kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada hedef moleküllerin manyetik/fabrik sorbent yüzeyine transferini kolaylaştırmak için rotatör cihazı kullanılmıştır. Bu amaçla yöntemde adsorbsiyon etkisi model çözeltilerin 0 ile 120 dk arasında değişen sürelerinde çalışılarak optimum adsorbsiyon süresi belirlenmiştir.

3.6.3. Desorpsiyon Çözücüsü Seçimi

Adsorbsiyon işleminin ardından katı fazdan analitin ayrılmasını sağlamak için çözücü seçimi optimizasyonu yapılmıştır. Belirlenecek olan çözücünün analit bileşenlerini tamamen çözebilecek ve HPLC cihazına da zarar vermeden analit bileşenlerini tayin edebilecek olması gerekmektedir. Bu amaçla çalışmada çözücü seçimi için HPLC sisteminin yürütücü fazına uygun ve katı faza tutunmuş olan bileşenleri kantitatif olarak çözebilecek çözücüler ile optimum çözücü belirlenmeye çalışılmıştır.

3.6.4. Desorpsiyon Çözücüsü Hacminin Etkisi

Katı faza tutunan analit türlerini çözebilecek en iyi çözücü hacminin optimizasyonu için yapılmaktadır. Çözücü miktarı zenginleştirme faktörünü doğrudan etkilemektedir. Yüksek zenginleştirme katsayısı elde edebilmek için düşük çözücü hacimlerine ihtiyaç vardır. Bu amaçla HPLC sistemine uygun olacak şekilde çözücü optimizasyonu yapılmıştır.

3.6.5. Desorpsiyon Süresinin Etkisi

Katı faza tutunmuş olan analit/analitlerin adsorban yüzeyinden verimli bir şekilde ayrılabilmesi için desorpsiyon süresi önemli bir parametredir. Katı faza tutunmuş olan analiti en verimli şekilde tekrar çözelti kısmına geçirilmesi gerekmektedir. Bu sebeplerden dolayı desorpsiyon süresi basit bir vorteks işlemi ile hızlandırılmıştır. Analitin adsorban yüzeyinden geri kazanımı için temas süresi artırılarak maksimum geri kazanım sağlanacağı düşünülen pik in seçimi üzerine çalışılmıştır.

4. DENEYSEL SONUÇLAR ve BULGULAR

Tez çalışmasında, düşük derişimlerdeki fingolimod ve sitalopram karışımının eşzamanlı HPLC ile tayinleri için fabrik ve manyetik destek maddelerinin katı faz olarak kullanıldığı ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle fabrik faz ve manyetik faz sentezlenerek katı faz olarak kullanılabilmesi için gerekli şartlar belirlenmiştir. Hızlı ve kolay bir ayırma işlemi sağlamak, düşük miktarda organik çözücü kullanımı ile çevre dostu bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Metodun doğru, tekrarlanabilir, düşük tayin limitli ve yüksek deriştirme faktörüne sahip olması ana hedefimiz olmuştur. Çalışmalarda elde edilen sonuçlar ve bulgular bu bölümde verilmiştir.

4.1. Fingolimod ve Sitalopram Molekülleri için Doğrudan Tayin Koşulları

Ön deriştirme (zenginleştirme) deneyleri yapılmadan önce fingolimod ve sitalopram molekülleri için HPLC ile doğrudan tayin koşulları belirlenmiştir. Bu amaçla sabit faz olarak farklı kolonlarla ön denemeler yapılmıştır ve en iyi pik ayrımı fenil hekzil kolonu ile elde edilmiştir. Farklı pH'larda tampon çözeltileri ile metanol, etanol, izopropil alkol ve asetonitril gibi yürütücü fazların karışımlarının ayrılmaya etkileri izokratik ve gradient elüsyon metotlarını kullanılarak incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda en uygun HPLC çalışma koşulları Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Doğrudan Tayin Koşulları

Parametre	Değer
Yürütücü faz programı	İzokratik
Yürütücü faz	% 10 MeOH, % 40 pH 3 PBS tampon çözeltisi, % 50 ACN
Yürütücü Faz Akış Hızı	1,0 mL dk ⁻¹
Yürütme süresi	15 dk
Kolon	Luna 5 µm Fenil Hekzil 100 A ⁰ (LC Kolon 250×4,6 mm)
Kolon Sıcaklığı	40 °C
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Sistem Basıncı (yaklaşık)	120 bar

HPLC ile doğrudan yapılan analizlerde alıkonma süresi, ölçüm dalga boyları ve kalibrasyon parametreleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Yöntemin analiz süresi yaklaşık 7 dk tamamlanmaktadır. Kalibrasyon doğrusunun lineer dinamik aralığı analiz için geniştir. Kalibrasyon doğrusunun korelasyon katsayısı 1’e oldukça yakındır.

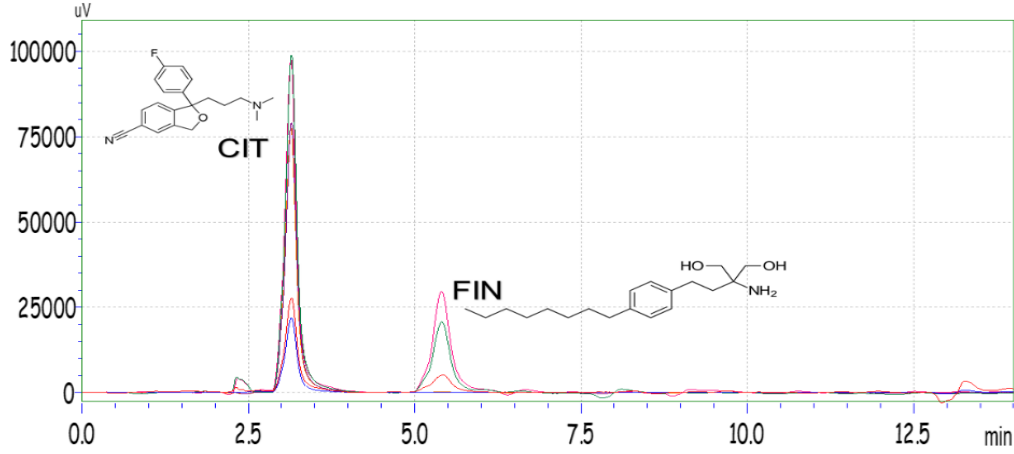
Tablo 4.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Doğrudan Tayin Koşulları

Parametre	Fingolimod	Sitalopram
Alıkonma Süresi, dk	5,4	3,2
Maksimum Soğurum λ’ları, nm	238	213
Kalibrasyon Aralığı	2,0-60,0 µg mL ⁻¹	2,0-60,0 µg mL ⁻¹
% BSS (20 µg mL ⁻¹)	4,2	5,3
R ²	0,9981	0,9939

4.2. Fingolimod ve Sitalopram Moleküllerine Ait Kromatogramlar

Üç farklı derişimdeki (2,0; 5,0 ve 10,0 µg mL⁻¹) standart çözeltiler hazırlanarak ön ayırma yapılmadan Tablo 4.1 de verilen şartlarda HPLC-DAD ile ayırmalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar şekil 4.1’ de verilmiştir. Sitalopram için

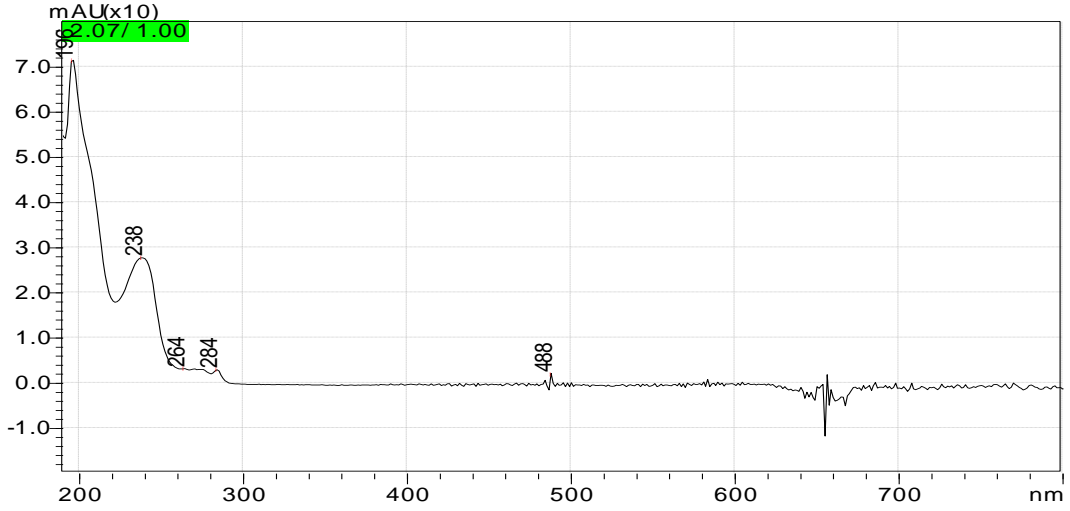
alınma zamanı 3,2 dk fngolimod için alınma zamanı 5,4 dk' dır. Analiz 7 dakikada tamamlanmıştır. İki etkin madde kromatogramda görüldüğü gibi ayrılmıştır.



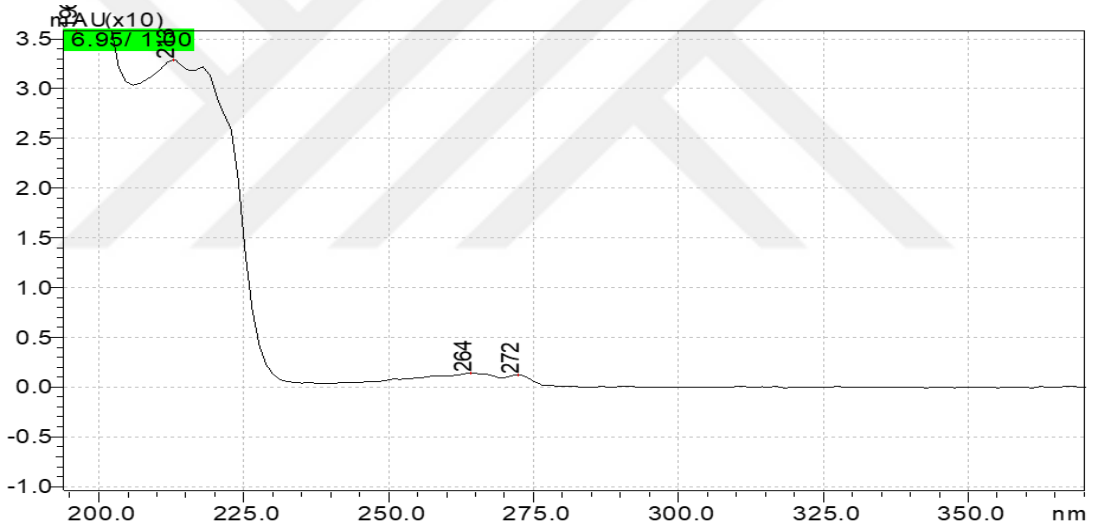
Şekil 4.1. Fingolimod ve Sitalopram moleküllerine ait ideal koşullarda elde edilen kromatogram

4.3. Fingolimod ve Sitalopram Molekül Piklerine ait DAD Dedektörden Elde Edilen UV-VIS Spektrumu

Kromatogramdaki piklerin fngolimod ve sitaloprama ait olduğunu doğrulamak için kromatogramdaki piklerin DAD dedektöründen elde edilen spektrumları sırasıyla Şekil 4.2 ve Şekil 4.3' te verilmiştir. İlgili spektrumların fngolimod ve sitalopram bileşiklerine ait olduğu orijinal spektrumlarla doğrulanmıştır.



Şekil 4.2. Fingolimod molekül pikinin Diyot Dizi Dedektörden elde edilen UV-VIS spektrumu

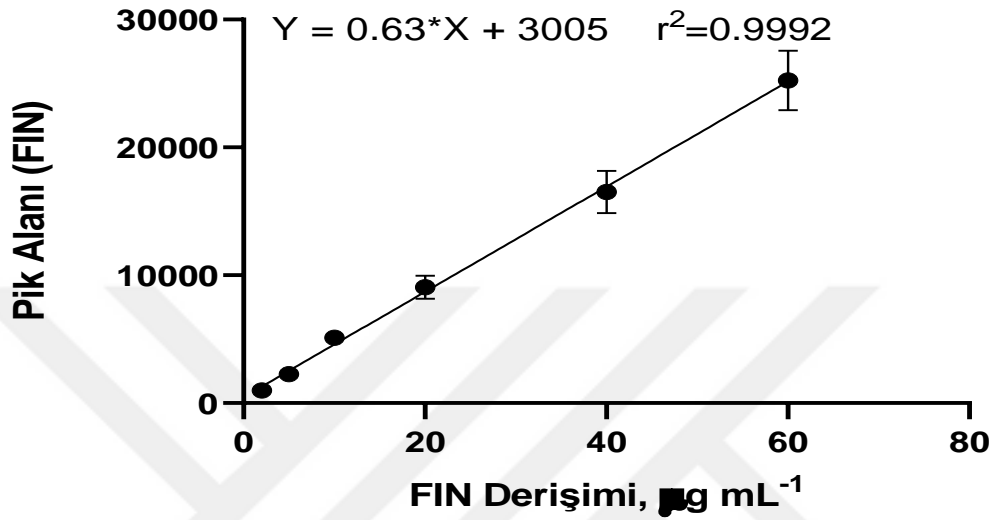


Şekil 4.3. Sitalopram molekül pikinin Diyot Dizi Dedektörden elde edilen UV-VIS spektrumu

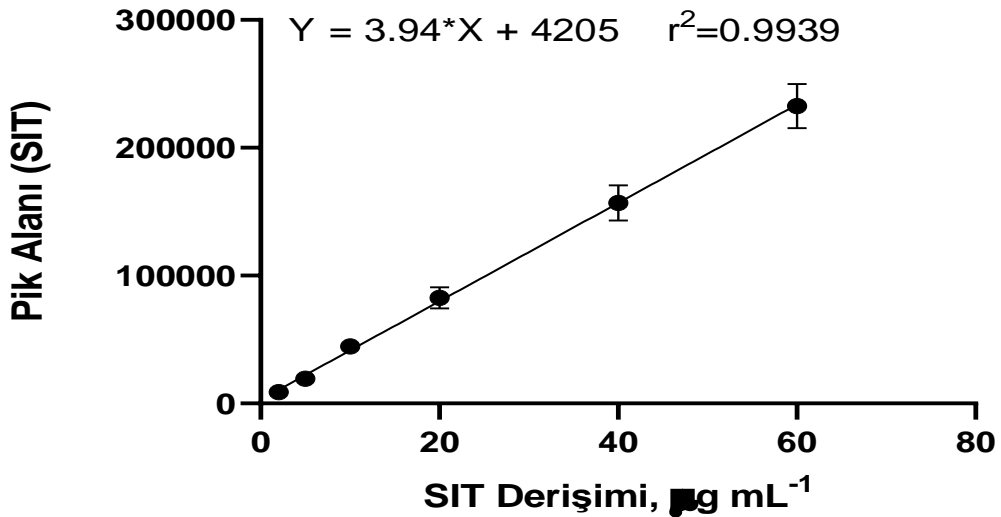
4.4. Fingolimod ve Sitalopram Moleküllerine ait Kalibrasyon Doğrularının Çizilmesi

Kalibrasyon doğruları $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $60,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimde standartlar hazırlanarak HPLC’de kalibrasyon doğrusunu çizmek için kullanılmıştır. Bu standart çözeltiler HPLC’ye 3 kez enjekte edilmiştir. Elde edilen verilerle kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Her iki molekül

için oluşturulan kalibrasyon grafikleri Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’ te verilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi fingolimod için $Y=0,63[X_{fn}]+3005$ sitalopram için $Y=3,94[X_{sit}]+4205$ ‘dır. Tayin katsayısı (R^2) değerleri ise fingolimod için 0,9992 sitalopram için 0,9939 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Fingolimod molekülü için zenginleştirme öncesi kalibrasyon grafiği



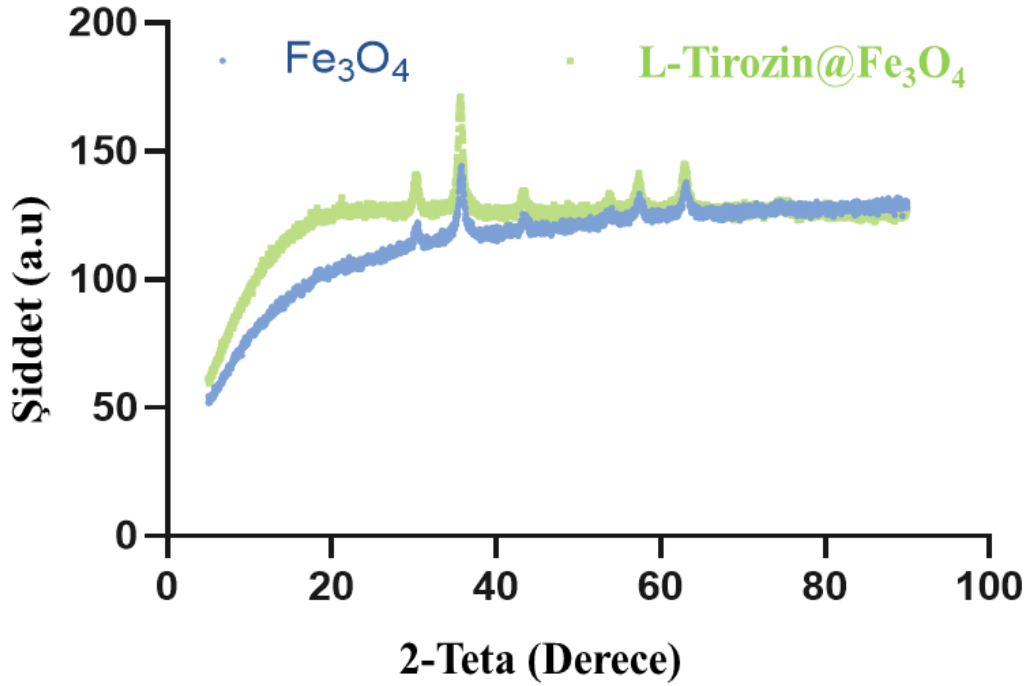
Şekil 4.5. Sitalopram molekülü için zenginleştirme öncesi kalibrasyon grafiği

4.5. Yöntemde Kullanılan Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonunun Karakterizasyonu

Bu çalışmada sentezlenmiş olan $Fe_3O_4@L$ -Tirozin katı faz destek maddesinin karakterizasyonu XRD, FTIR ve SEM cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.5.1. X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi

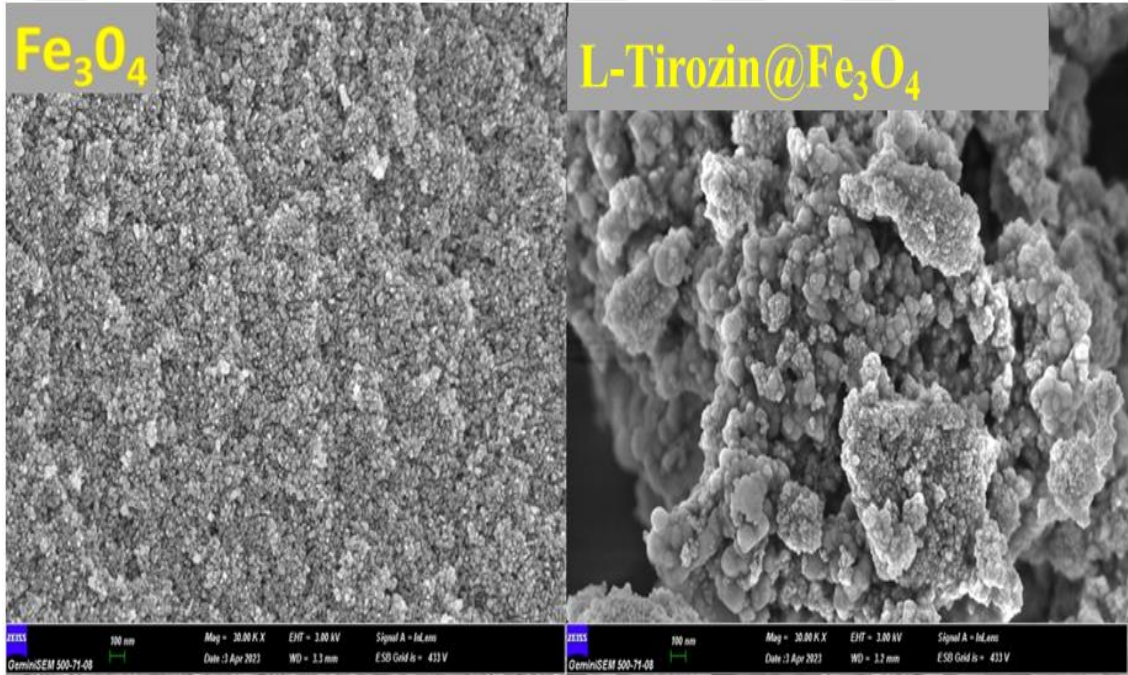
Fe_3O_4 ve $Fe_3O_4@L$ -Tirozin sentez ürünleri için XRD (X ışını Kırınımı) spektrumları alınmıştır. Şekil 4.6' da görüldüğü gibi Fe_3O_4 için elde edilen kırınım tepe noktaları $30,53^\circ$; $36,07^\circ$; $43,87^\circ$; $54,27^\circ$; $57,58^\circ$ ve $63,26$ (2theta) 'tür. Bu XRD kırınım tepe noktaları, Fe_3O_4 partikülleri için karakteristiktir. Modifiye edilmiş Fe_3O_4 için elde edilen kırınım tepe noktaları ise $18,24^\circ$; $21,26^\circ$; $48,68^\circ$ ve $53,75^\circ$ (2theta)'dir. Bu pikler başlangıç ürününden farklı olarak modifiye edilmiş Fe_3O_4 için spesifik karakteristik piklerdir.



Şekil 4.6. Sentezlenen Manyetik Malzemenin XRD Grafiği

4.5.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri

Manyetik temelli katı faz destek maddeleri, kıyaslamalı olarak foksiyonel grup kaplama basamağı öncesi ve sonrası (30000 kez) büyütmelede taramalı elektron mikroskobu ile Şekil 4.7’de verilen görüntüler elde edilmiştir. Elde edilen görüntüler ana çekirdek Fe_3O_4 taneciklerine ve bu taneciklerin L-Tirozin ile modifiye edilmiş haline aittir. Yapılar yüzey özellikleri olarak değerlendirildiğinde (30 k) büyütmede Fe_3O_4 için yapının küresel formda olduğu görülmektedir. $Fe_3O_4 @L$ -Tirozin yapısının yüzey özellikleri değerlendirildiğinde ise küresel formdaki magnetit yapıların L-Tirozin tabakası ile yüzeyini genişlettiği ve homojen bir dağılım gerçekleştirilerek yüzey alanında doğrusal bir artış olduğu belirlenmiştir.

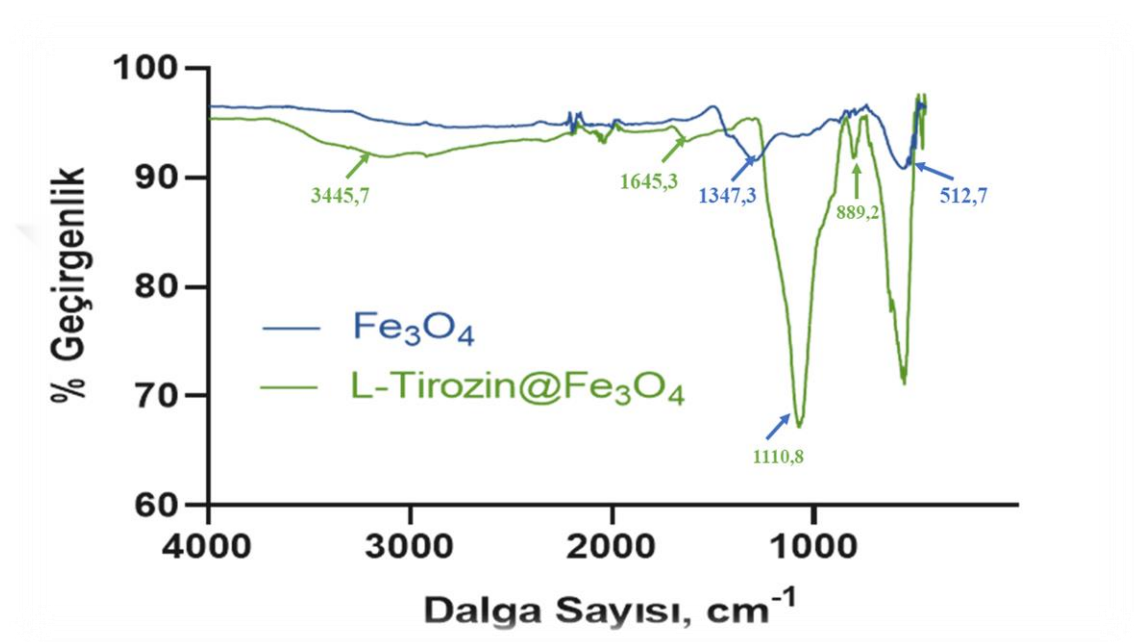


Şekil 4.7. Sentezlenen Manyetik Malzemenin SEM Görüntüleri

4.5.3. Fourier Dönüümlü-Infrared Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

Sentezlenen manyetik katı faz örneğinden elde edilen spektrumlar $4000-450\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında taranmıştır. Şekil 4.8’de görüldüğü gibi $3445,7\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda geniş bir spektrum olarak görülen bandın -OH (hidroksil) (H bağı) gerilme bandı olduğu ve $Fe_3O_4@L$ -Tirozin yapısında rastlanabildiği literatürde bulunmaktadır (Xie ve ark., 2020). $Fe_3O_4@L$ -Tirozin’in IR spektrumunda $1789,3$ ve $1645,3\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda

gözlenen pikler ise sırasıyla C-O ve C=O gerilme titreşimlerine aittir. 512 cm^{-1} dalga boyunda görülen pik Fe-O karakteristik pikine ait olabilmektedir 1347,3 ve 615,6 cm^{-1} dalga boyunda görülen spektrumların Fe_3O_4 kaynaklı olduğu bilinmektedir (Lu ve ark.,2010). 1110,8 ve 898,2 cm^{-1} dalga boylarında görülen spektrumlar ise C-O ve C-OH eğilme titreşimlerine aittir. Elde edilen pikler literatür çalışmalarıyla uyumludur (Xuan ve ark., 2007)



Şekil 4.8. Sentezlenen Manyetik Malzemenin FTIR Görüntüleri

4.6. Yöntemde Kullanılan Sol-gel PCAP-PDMS-PCAP Kaplı Fabrik Faz Ekstraksiyon Membranının Karakterizasyonu

Bu çalışmada sentezlenmiş olan PCAP-PDMS-PCAP katı faz destek maddesinin karakterizasyonları FT-IR ve SEM cihazları kullanılarak yapılmıştır.

4.6.1. Fourier Dönüşümü-Infrared Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

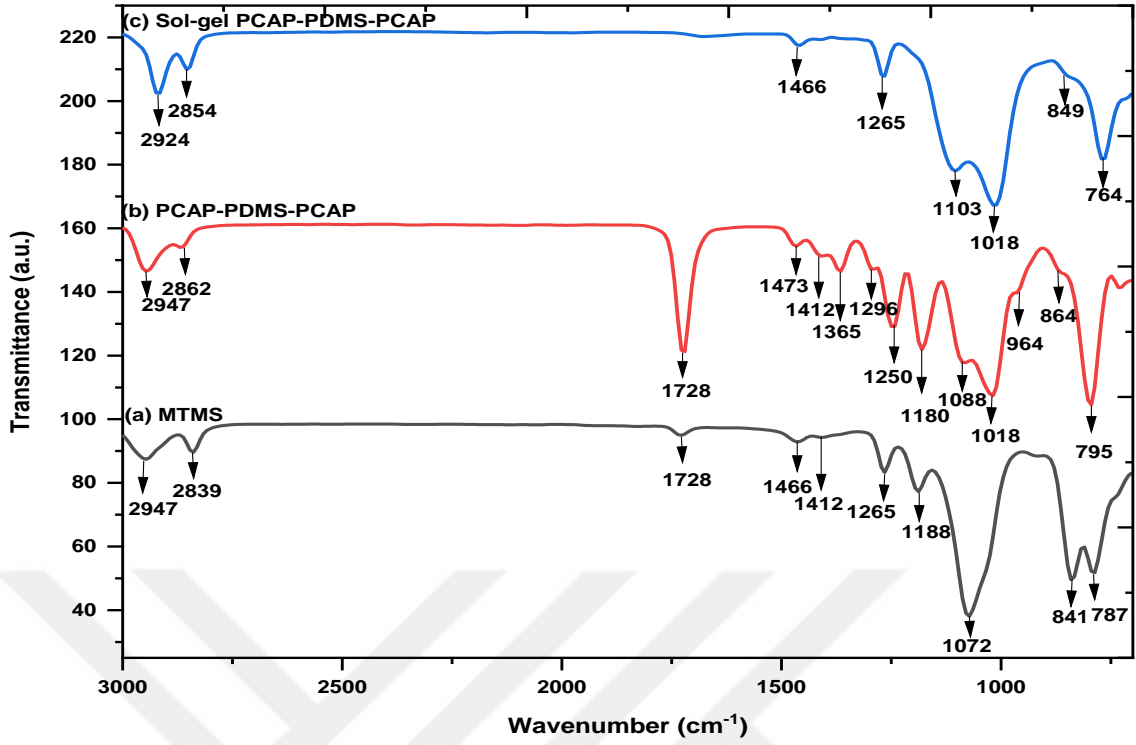
Fabrik fazların fonksiyonel özelliklerini ve sol-jel PCAP-PDMS-PCAP polimerinin fabrik faza başarılı bir şekilde kaplandığını anlayabilmek için Fourier Dönüşümlü-Infrared Spektroskopisi (FT-IR) gerçekleştirilmiştir ve Şekil 4.9’ da verilmiştir.

Metil trimetoksisilana ait FT-IR spektrumlarında karakteristik Si-CH₃ grubunu temsil eden C-H tek bağları 1265 cm⁻¹ ve 787 cm⁻¹ de yer almaktadır. 1188 cm⁻¹'deki keskin spektrum, metoksi grubunun -CH₃ titreşimine aittir.(Zhang ve ark., 2017).

1082 cm⁻¹ deki gerilme titreşimi PCAP-PDMS-PCAP polimerinin Si-O bağlarına ait olduğu tanımlanmıştır. Karbonil grubunun(C=O) gerilme titreşimi, polikaprolakton alt zincirindeki ester yapısına karşılık gelen 1728 cm⁻¹'de görülmektedir. (Yang ve ark., 2018). 2867 cm⁻¹ ve 2947 cm⁻¹'deki belirgin pikler, polimerin sırasıyla asimetric ve simetric CH₂ gerilmesine aittir.(Gordin ve ark., 2009).

Kaplanmamış selüloz kumaşın FT-IR spektrumlarının karakteristik pikleri sırasıyla 2913 cm⁻¹ ve 2848 cm⁻¹'de CH₂'nin asimetric ve simetric gerilmesine aittir. 1427 cm⁻¹'deki keskin spektrum CH₂ makaslamasını, 1315 cm⁻¹ CH₂ titreşimini, 1204 cm⁻¹ C-O gerilmesine karşılık gelebilmektedir, 1160 cm⁻¹'deki spektrum asimetric C-O-C gerilmesini ve 1063 cm⁻¹'deki spektrum C-O gerilmesini temsil etmektedir.(Gordin ve ark., 2009).

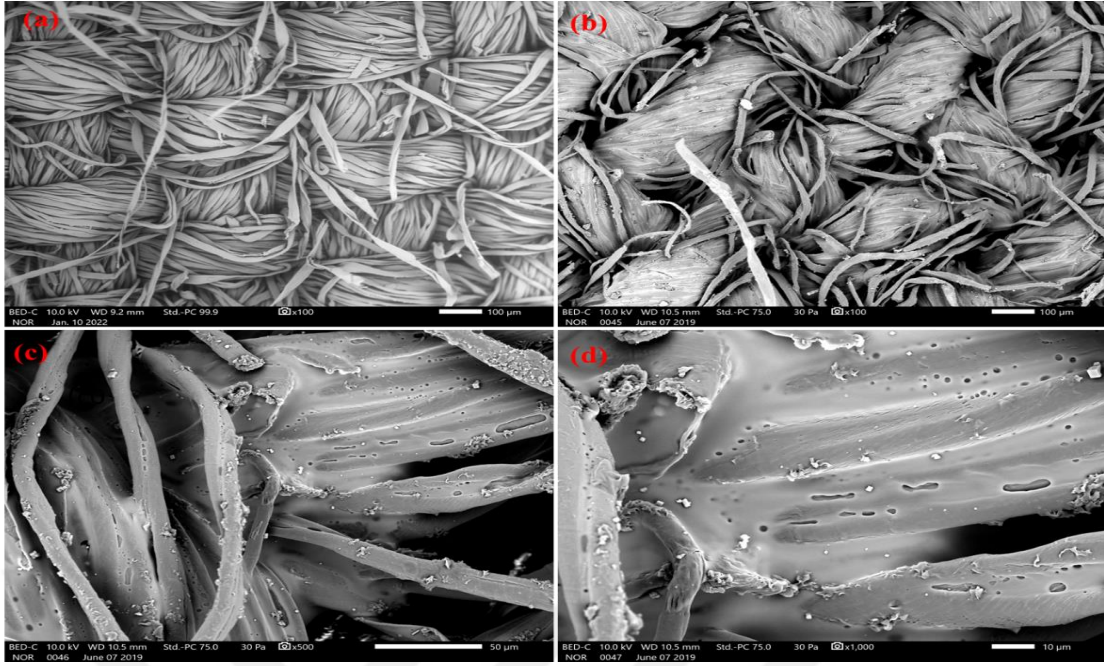
Metiltrimetoksilan ve sol-jel PCAP-PDMS-PCAP a ait spektrumlar görülmektedir. PCAP-PDMS-PCAP ve sol-jel PCAP-PDMS-PCAP kaplanmış yapıda da yine aynı anda çok sayıda spektrumlar mevcuttur. Bu durum sol-jel kaplamada etkili olan MTMS ile sol-jel aktif polimeri olan PCAP-PDMS-PCAP'ın fabrik faz yüzeyinde başarılı bir şekilde kaplandığını göstermiştir.



Şekil 4.9. Sentezlenen PCAP-PDMS-PCAP Malzemesinin FTIR Görüntüleri

4.6.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Kaplamasız %100 selüloz pamuklu kumaş ve sol-jel PCAP-PDMS-PCAP kaplı fabrik faz membranın taramalı elektron spektroskopisi görüntüleri Şekil 4.10'da verilmiştir. Kaplanmamış kumaş substratının SEM görüntüsü, aralarında net boşluklar bulunan selüloz kumaşın bireysel mikrofibrillerini göstermektedir. Şekil 4.10 (b)'de sunulan sol-jel PCAP-PDMS-PCAP sorbent kaplamanın mikrofibriller üzerine eşit şekilde dağıldığı görülmüştür. Kumaş substratının açık gözenekleri, Şekil 4.10. (c, d)'de daha yüksek büyütmelelerde görüldüğü gibi sol-jel sorbent kaplamadan sonra daralmakta, ancak sol-jel PCAP-PDMS-PCAP kaplı fabrik faz membranları herhangi bir müdahale gerektirmeden hala geçirgen olduğu belirlenmiştir. Sol-jel PCAP-PDMS-PCAP sorbent kaplı fabrik faz membranındaki, hedef analitlerin ekstraksiyonu sırasında sulu numunelerin fabrik faz membranından sürekli olarak nüfuz etmesine izin vererek daha hızlı bir ekstraksiyon dengesi ve kapsamlı bir sonuç sağladığı düşünülmektedir.



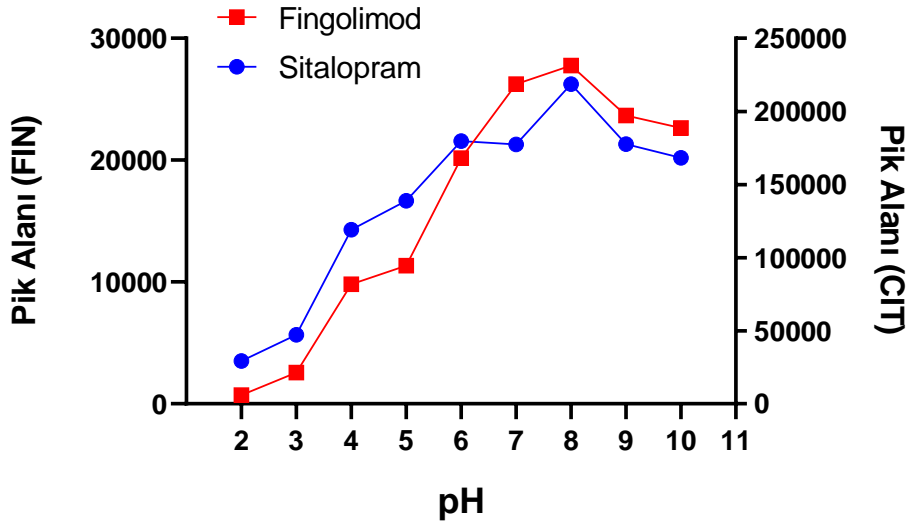
Şekil 4.10. Sentezlenen PCAP-PDMS-PCAP Malzemesinin SEM Görüntüleri

4.7. Fingolimod ve Sitalopram Analizi için Geliştirilen Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu

Sentezlenen manyetik katı faz adsorpsiyon kullanılarak fingolimod ve sitalopram'ın ön ayırma ve zenginleştirilmesi için yapılan katı faz ekstraksiyonuna örnek çözeltisinin pH'sı, adsorpsiyon süresi, desorpsiyon çözücü seçimi, desorpsiyon çözücü hacmi, desorpsiyon süresi gibi analitik parametrelerin etkisi incelenmiştir.

4.7.1. Örnek Çözeltisinin pH'sının Ekstraksiyona Etkisi

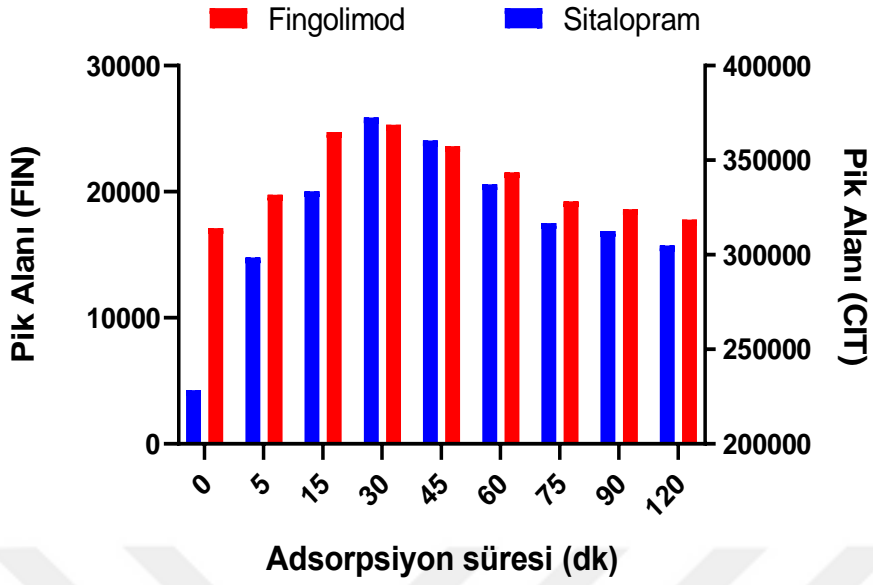
Örnek çözeltisinin pH'sı 2,0-11,0 aralığındaki Britton Robinson tamponları ile ayarlanarak geliştirilen manyetik katı faz ekstraksiyon yöntemi optimum şartlarda uygulanmıştır. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi en iyi pik alanı pH 8,0 tamponuyla ayarlanmış çözeltide elde edilmiştir. Bu nedenle sonraki çalışmalara ortam pH'sı pH 8 tampon çözeltisi kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 4.11. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemine pH Etkisi

4.7.2. Adsorbsiyon Süresinin Ekstraksiyona Etkisi

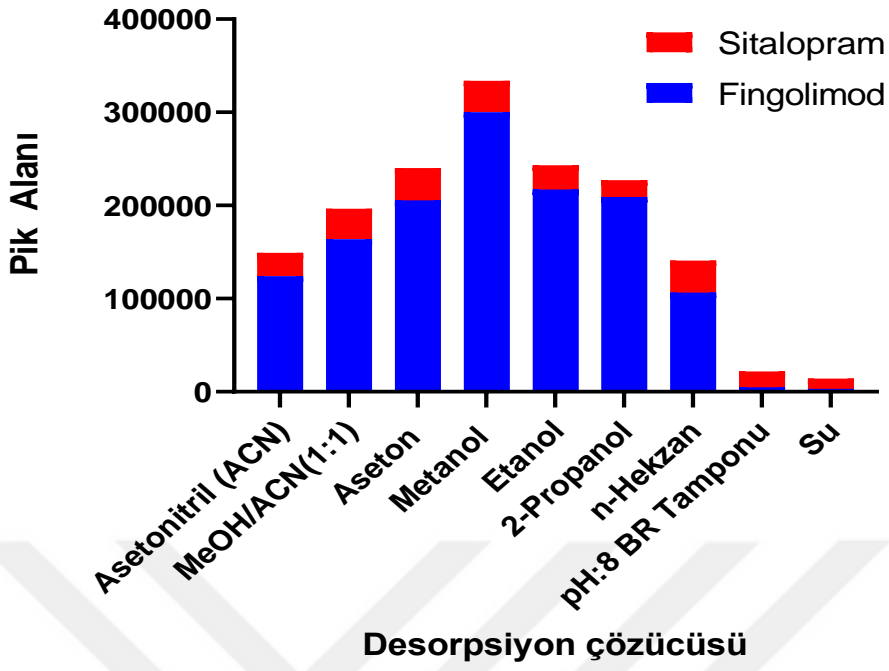
Bu çalışmada hedef moleküllerin manyetik sorbent yüzeyine transferini kolaylaştırmak için rotatör kullanılmıştır. Rotatör süresinin ilaç moleküllerinin adsorpsiyonuna etkisi 0-120 dk aralığında incelenmiştir. Şekil 4.12.'de görüldüğü gibi 30 dk karıştırmanın en uygun süre olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.12. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemine Adsorpsiyon Süresinin Etkisi

4.7.3. Desorpsiyon Çözücüsü Seçimi

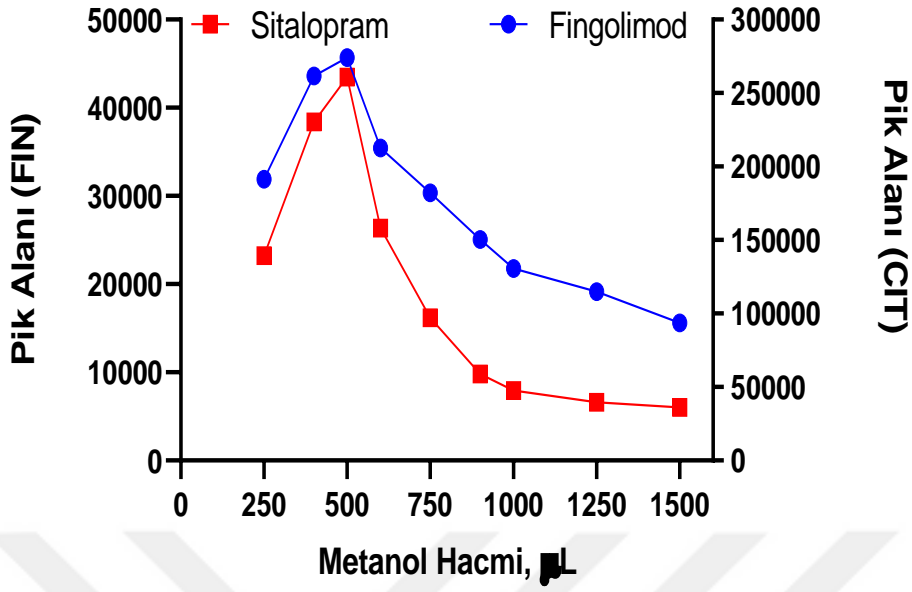
İlaç moleküllerinin desorpsiyonu için, desorpsiyon koşullarının optimizasyonu amacıyla asetonitril, asetonitril:metanol (1:1) karışımı, aseton, metanol, 2-propanol, n-hekzan, pH 8 tamponu ve suyun desorpsiyona etkisi incelenmiştir. Şekil 4.13'te görüldüğü gibi her iki molekül için de en yüksek pik alanları metanol ile yapılan elüsyonda elde edilmiştir. Bu nedenle en uygun çözücünün metanol olduğuna karar verilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda çözücü olarak metanol kullanılmıştır.



Şekil 4.13. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemine Desorpsiyon Çözücüsü Etkisi

4.7.4. Desorpsiyon Çözücüsü Hacminin Ekstraksiyona Etkisi

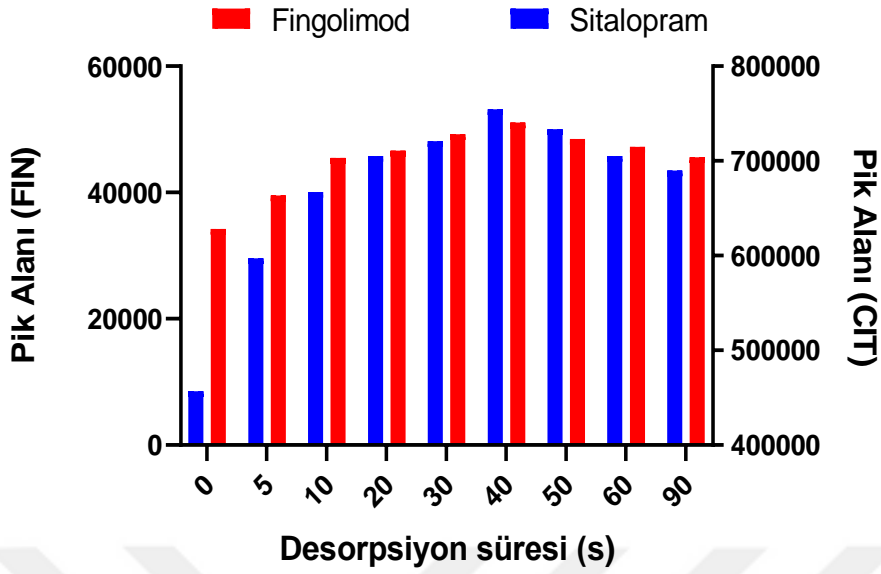
Metanolün hacminin ekstraksiyon verimine etkisini belirlemek amacıyla 250,0-1500,0 μ L aralığında farklı hacimlerin etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.14' de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi en yüksek pik alanı 500,0 μ L metanol ile elde edilmiştir. Bundan sonraki çalışmada eluent olarak 500,0 μ L metanol kullanılmıştır.



Şekil 4.14. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon yöntemine desorpsiyon çözücüsü hacminin etkisi

4.7.5. Desorpsiyon Süresinin Ekstraksiyona Etkisi

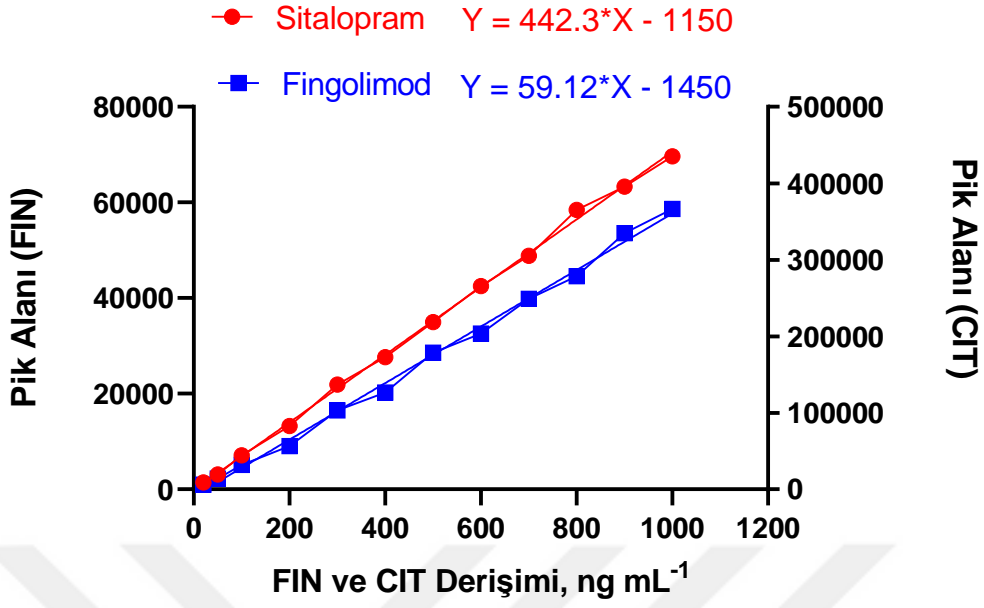
Çalışmanın önceki adımlarında desorpsiyon çözücüsünün tipi ve hacmi belirlendikten sonra vorteks işlemin süresinin 0-90 s aralığındaki etkisi incelenmiştir. Şekil 4.15’ de görüldüğü gibi 40 s vorteks desorpsiyon işlemi için yeterli olduğu görülmüştür. Bundan sonraki çalışmalarda vorteks süresi 40 s olarak uygulanmıştır.



Şekil 4.15. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon yöntemine desorpsiyon süresinin etkisi

4.7.6. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Analitik Performans Ölçütleri

Fingolimod ve sitalopram ekstraksiyonu için geliştirilen manyetik katı faz ekstraksiyon yönteminin doğruluk, tekrarlanabilirlik, geri kazanım, gözlenebilirlik sınırı (GS), tayin sınırı (TS), zenginleştirme ve ön konsantrasyon faktörü gibi analitik performans ölçütleri geliştirilen yöntemin optimum koşullardaki yapılan deneyleri ile hesaplanmıştır. Doğruluk çalışması için her iki ilaç molekülünü de içeren bir seri model çözelti hazırlanmış ve geliştirilen manyetik katı faz ekstraksiyon yöntemi uygulanarak kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Fingolimod için lineer dinamik aralığın; 25,0-1000,0 ng mL⁻¹, sitalopram için lineer dinamik aralığın 20,0-1000,0 ng mL⁻¹ aralığında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Sonrası Çizilen Kalibrasyon Grafiği

GS ve TS değerleri ICH yönergeleri dikkate alınarak hesaplanmıştır. MKFE sonrasında 100 ng mL⁻¹ konsantrasyon için % RSD'ler hesaplanmıştır. Zenginleştirme faktörü, ekstraksiyon öncesi ve sonrası numune hacminin oranından doğrudan bulunmuştur.

İyileştirme faktörü, her iki ekstraksiyon yöntemi için öncesi ve sonrası kalibrasyon grafiklerinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm parametreler üç tekrarlı deneylerle değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçların özeti Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi Analitik Performans Ölçütleri

Parametre	MKFE ile Zenginleştirme Öncesi		MKFE ile Zenginleştirme Sonrası	
	FIN	CIT	FIN	CIT
Doğrusal aralık	1,00-50,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,00-50,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$	25,00- 1000,00 ng mL^{-1}	20,00-1000,00 ng mL^{-1}
Gözlenebilme sınırı ^a	0,41 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,36 $\mu\text{g mL}^{-1}$	6,32 ng mL^{-1}	6,85 ng mL^{-1}
Tayın sınırı ^b	0,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,96 $\mu\text{g mL}^{-1}$	18,38 ng mL^{-1}	18,65 ng mL^{-1}
BSS (%)	4,20 (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	5,32 (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	3,82 (100 ng mL^{-1})	4,84 (100 ng mL^{-1})
Kalibrasyon Duyarlılığı	0,63	3,94	59,12	442,30
Tayın Katsayısı (R^2)	0,9992	0,9939	0,9914	0,9941
Zenginleştirme Faktörü ^c	-	-	100	100
İyileştirme Faktörü ^d	-	-	94	112

^{a,b} ICH Guidelinas kaynağında ifade edildiği şekilde hesaplanmıştır.

^c Zenginleştirme faktörü; zenginleştirme öncesi başlangıç sulu faz hacminin (50 mL) , zenginleştirme sonrası elde edilen final hacime (0,5 mL) oranı alınarak hesaplanmıştır.

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

4.7.7. Geliştirilen Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Uygulaması

Yeni geliştirilen ve optimize edilen MKFE/HPLC-DAD yöntemi, sentetik tükürük ve idrar numunelerindeki FIN ve CIT moleküllerinin miktarlarını analiz etmek için uygulanmıştır. Bu amaçla önerilen yöntem bölüm 3.4.2' de bahsedildiği gibi hazırlanan örneklere 5 tekrarlı olarak okutulmuştur. Sonuçlar Tablo 4.3 ve 4.4'de görülmektedir. Yeni geliştirilen bu yöntemle eklenen iki farklı konsantrasyona sahip numuneler analiz edilerek geri kazanım değerleri % 96,6 ile % 105,4 arasında ve bağıl standart sapmalar ise % 4,5 ile % 5,5 arasında değişmektedir. Bu verilere göre geliştirilen yöntemin doğruluğu ve tekrarlanabilirliğinin yeterli olduğu söylenebilir.

Tablo 4.4. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Sentetik İdrar ve Yapay Tükürük Örnekleri Üzerine Uygulanması

Örnekler	Eklenen ng mL ⁻¹	Bulunan ^a ng mL ⁻¹		% BSS		% Geri Kazanım	
		FIN	CIT	FIN	CIT	FIN	CIT
Sentetik İdrar	0.0	<GS	<GS	-	-	-	-
Çözeltilisi	250.0	261,2±13,8	256,3±11,8	5,3	4,6	104,5	102,5
Sentetik Tükürük	500.0	509,3±26,5	496,5±22,4	5,2	4,5	101,9	99,3
Çözeltilisi	0.0	<GS	<GS	-	-	-	-
Sentetik Tükürük	250.0	263,5±13,1	241,5±13,2	5,0	5,5	105,4	96,6
Çözeltilisi	500.0	512,4±26,5	486,5±24,5	5,2	5,0	102,5	97,3

^a 3 tekrarlı ölçümün ortalaması ± standart sapması, GS: Gözlenebilme Sınırı

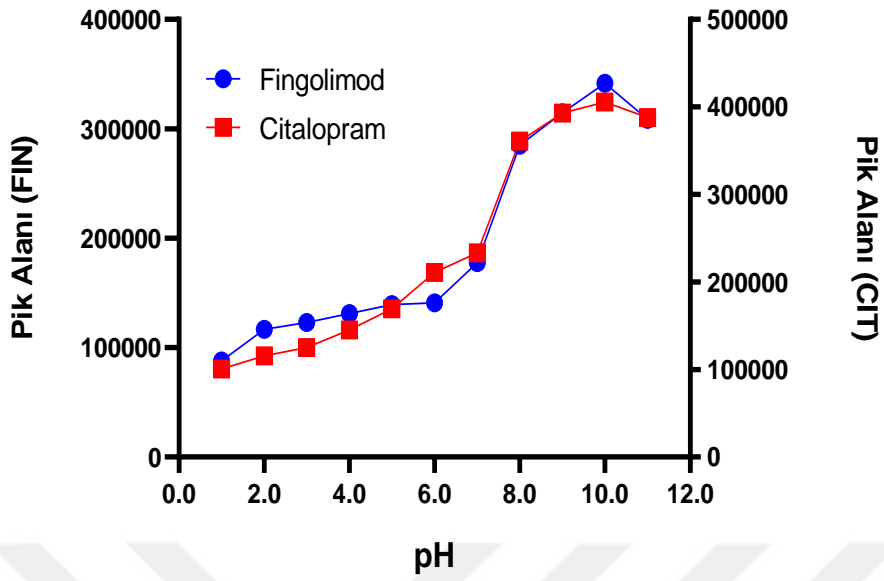
4.8. Fingolimod ve Sitalopram'ın Ön Ayrılması ve Zenginleştirilmesi İçin

Geliştirilen Fabrik Faz Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu

Fingolimod ve sitalopram'ın HPLC ile analizleri öncesi fabrik faz ekstraksiyonu ile ayrılması ve zenginleştirilmesi amacıyla geliştirilen yöntemin optimizasyonu; örnek çözeltilisinin pH'sı, adsorpsiyon süresi, desorpsiyon çözücüsü seçimi, desorpsiyon çözücüsü hacmi ve desorpsiyon süresi incelenerek gerçekleştirilmiştir.

4.8.1. Örnek Çözeltilisinin pH'sının Fabrik Faz Ekstraksiyonuna Etkisi

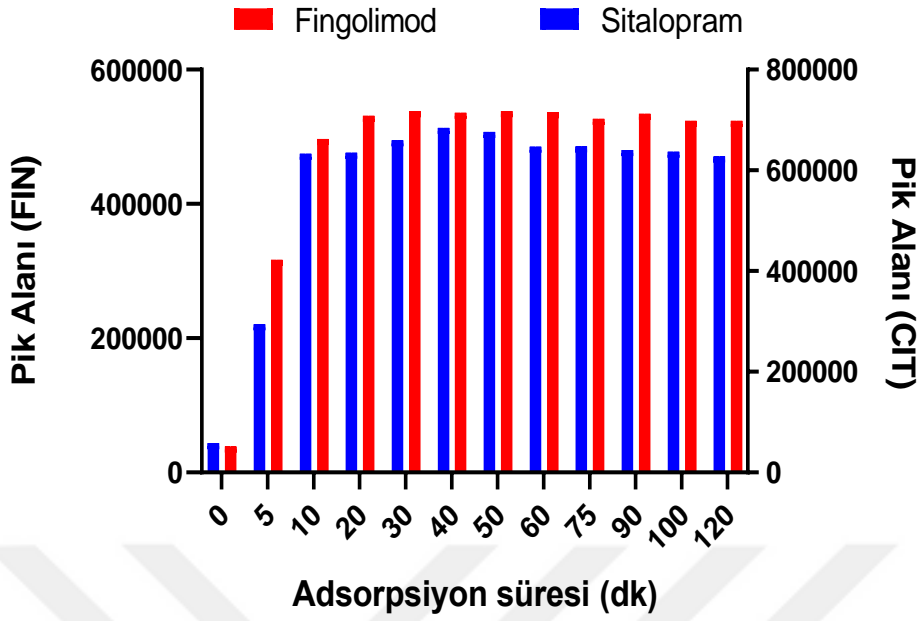
Ekstraksiyonlarda pH adsorpsiyona etki eden en önemli faktörlerden birisidir. Fabrik faz ekstraksiyon yöntemine pH'nın etkisi pH'sı 2,0-11,0 aralığındaki Britton Robinson tamponları ile ayarlanmış bilinen derişimlerde fingolimod ve sitalopram içeren model çözeltiler kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.17'de görüldüğü gibi en iyi pik alanı sinyalleri pH 10,0 tamponuyla elde edilmiştir. Bu nedenle sonraki fabrik faz ekstraksiyon çalışmalarında ortamın pH'sı, pH 10,0 tampon çözeltilisi ile ayarlanarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.17. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemine pH Etkisi

4.8.2. Adsorbsiyon Süresinin Fabrik Faz Ekstraksiyonuna Etkisi

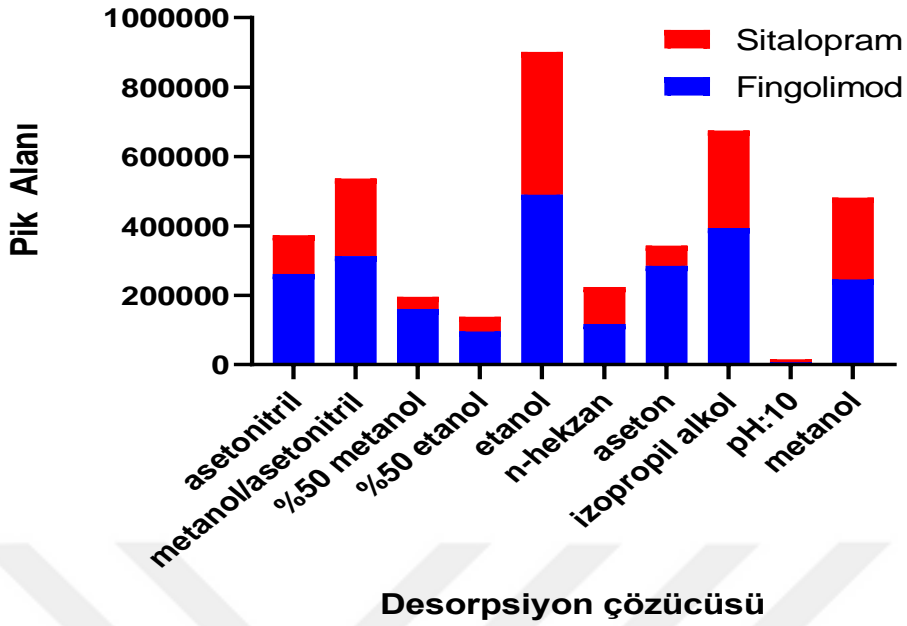
Bu çalışmada hedef moleküllerin fabrik faz yüzeyine transferini kolaylaştırmak için rotatör kullanılmıştır. Rotatör süresinin ilaç moleküllerinin adsorpsiyonuna etkisi Şekil 4.18’de görüldüğü gibi 0-120 dk aralığında incelenmiştir. Bu optimizasyon sonucunda kantitatif ekstraksiyonda hedef molekülleri için 40 dk adsorpsiyon süresinin yeterli olduğu görülmüştür. Bundan sonraki çalışmalarda rotatör süresi 40 dk olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.18. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemine Adsorpsiyon Süresinin Etkisi

4.8.3. Desorpsiyon Çözücüsü Seçimi

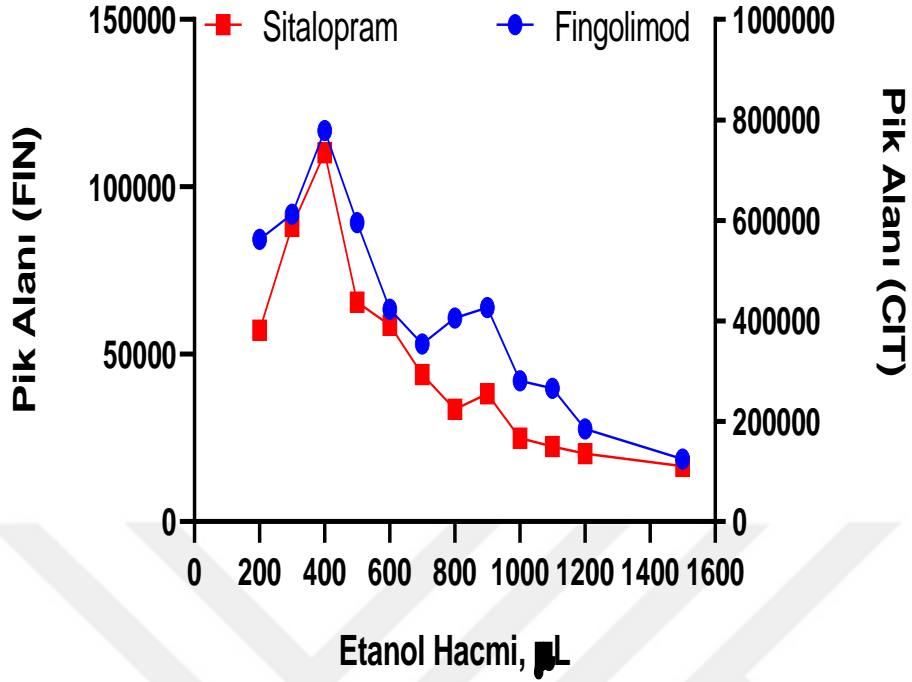
İlaç moleküllerinin, desorpsiyon koşullarının optimizasyonu amacıyla asetonitril, asetonitril:metanol (1:1) karışımı, % 50 metanol, % 50 etanol, etanol, n-heksan, aseton, izopropil alkol, pH 10,0 tamponu ve metanol'ün etkisi incelenmiştir. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi her iki molekül için de en yüksek pik alanları etanol ile elde edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda ve geliştirilen fabrik faz ekstraksiyon yönteminde elüent olarak etanol kullanılmıştır.



Şekil 4.19. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemine Desorpsiyon Çözücüsü Seçiminin Etkisi

4.8.4. Desorpsiyon Çözücüsü Hacminin Fabrik Faz Ekstraksiyonuna Etkisi

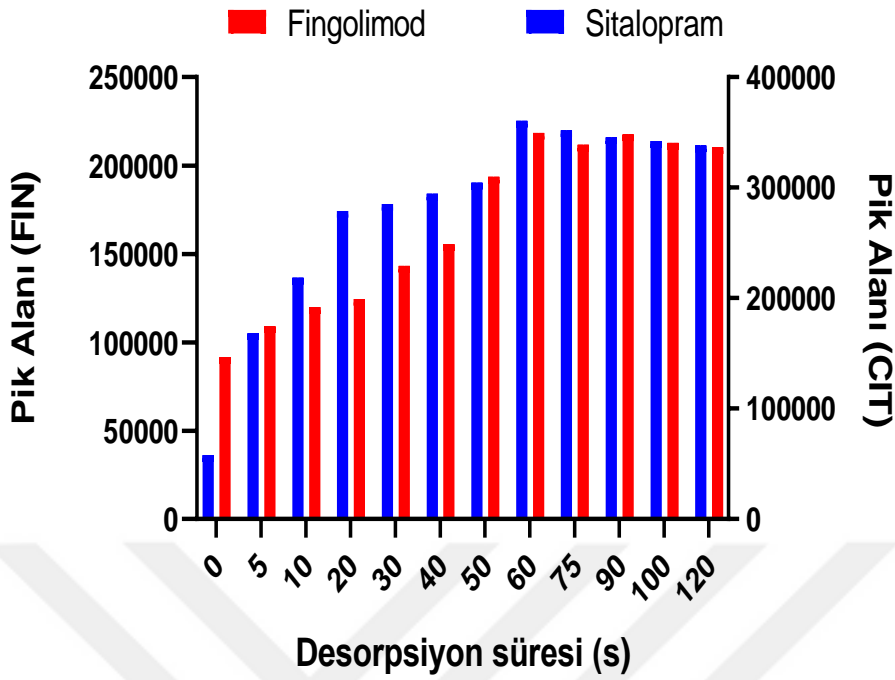
Geri kazanmanın en yüksek olduğu eluent hacminin belirlenmesi amacıyla 200,0-1500,0 μL aralığında etanol kullanılarak eluent hacminin etkisi incelenmiştir. Şekil 4.20’de görüldüğü gibi en yüksek pik alanı 400,0 μL etanol ile elde edilmiştir. Geliştirilen fabrik faz ekstraksiyon yönteminde elüent olarak 400,0 μL etanol kullanılmasına karar verilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda 400,0 μL etanol elüent olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.20. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemine Desorpsiyon Çözgen Hacminin Etkisi

4.8.5. Desorpsiyon Süresinin Fabrik Faz Ekstraksiyonuna Etkisi

Çalışmanın önceki adımlarında desorpsiyon çözücüsünün tipi ve hacmi belirlendikten sonra vorteks işleminin süresi de 0-90 s aralığındaki etkisi incelenmiştir. Bu optimizasyon sonucunda 60 s vorteksin desorpsiyon işlemi için yeterli olduğu şekil 4.21’ de görüldüğü gibi maksimum pik alanı ile en iyi desorpsiyonun sağlandığı görülmüştür.



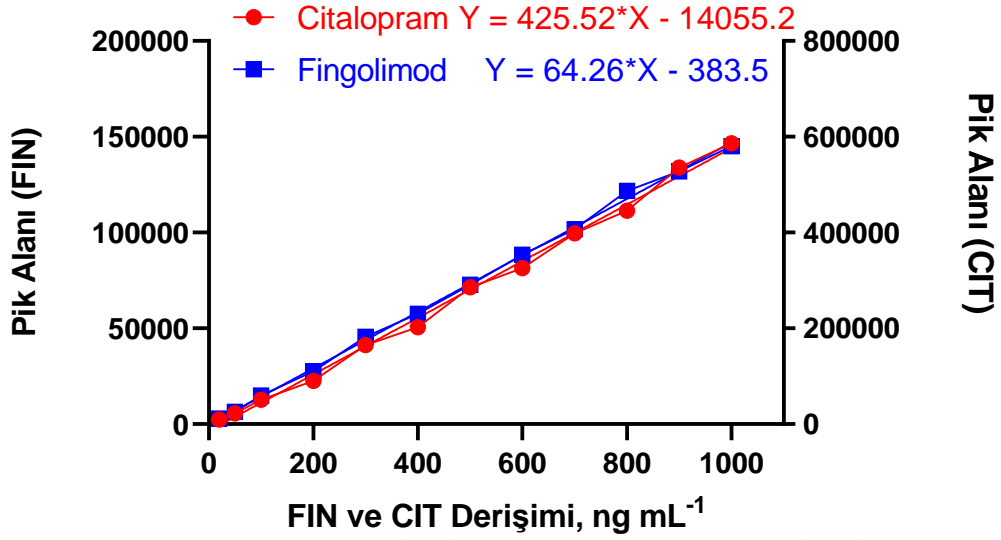
Şekil 4.21. FFE yöntemine desorpsiyon süresinin etkisi

4.8.6. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yönteminin Analitik Performans Ölçütleri

Fingolimod ve sitalopram ilaç moleküllerinin HPLC ile tayinleri öncesi ayrılması ve zenginleştirilmesi için geliştirilen fabrik faz ekstraksiyon yönteminin bazı analitik performans parametreleri belirlenmiştir.

Doğrusallık, tekrarlanabilirlik, geri kazanım, gözlenebilme sınırı (GS), tayin sınırı (TS), zenginleştirme ve ön konsantrasyon faktörü gibi analitik parametreler hesaplanmıştır.

Doğrusallık çalışması için her iki ilaç molekülünü de içeren bir seri model çözelti hazırlanmış ve geliştirilen fabrik faz ekstraksiyonu optimum koşullarda uygulanmıştır. Şekil 4.22.'de görüldüğü gibi fingolimod için lineer dinamik aralık 25,0-1000,0 ng mL⁻¹ ve sitalopram için lineer dinamik aralık 20,0-1000,0 ng mL⁻¹ aralığındadır.



Şekil 4.22. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemi Sonrası Kalibrasyon Grafiği

GS ve TS değerleri ICH yönergeleri dikkate alınarak hesaplanmıştır. FFE sonrasında 100 ng mL^{-1} konsantrasyon için % RSD'ler hesaplanmıştır. Zenginleştirme faktörü, FFE öncesi ve sonrası numune hacminin oranından doğrudan bulunmuştur. İyileştirme faktörü, her iki ekstraksiyon yöntemi için öncesi ve sonrası kalibrasyon grafiklerinin eğimi dikkate alınarak hesaplanmıştır. Tüm parametreler 5 tekrarlı deneylerle değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçların özeti Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yönteminin Analitik Performans Ölçütleri

Parametre	FFE ile Zenginleştirme Öncesi		FFE ile Zenginleştirme Sonrası	
	FIN	CIT	FIN	CIT
Doğrusal aralık	1,00-50,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,00-50,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$	25,00-1000,00 ng mL^{-1}	20,00-1000,00 ng mL^{-1}
Gözlenebilme sınırı ^a (GS)	0,41 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,36 $\mu\text{g mL}^{-1}$	7,46 ng mL^{-1}	5,97 ng mL^{-1}
Tayın sınırı ^b (TS)	0,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,96 $\mu\text{g mL}^{-1}$	24,38 ng mL^{-1}	19,78 ng mL^{-1}
BSS (%)	4,20 (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	5,32 (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,90 (100 ng mL^{-1})	4,40 (100 ng mL^{-1})
Kalibrasyon Duyarlılığı	0,63	3,94	64,26	425,52
Belirleme Katsayısı (R^2)	0,9992	0,9939	0,9990	0,9964
Zenginleştirme Faktörü ^c	-	-	125	125
İyileştirme Faktörü ^d	-	-	102	108

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

^c Zenginleştirme faktörü; zenginleştirme öncesi başlangıç sulu faz hacminin (50 mL) , zenginleştirme sonrası elde edilen final hacime (0,5 mL) oranı alınarak hesaplanmıştır.

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

4.8.7. Geliştirilen Fabrik Faz Ekstraksiyon Yönteminin Uygulaması

Yeni geliştirilen ve optimize edilen FFE/HPLC-DAD yöntemi, sentetik tükürük ve idrar numunelerindeki FIN ve CIT moleküllerinin miktarlarını analiz etmek için uygulanmıştır. Bu amaçla önerilen yöntem bölüm 3.4.1’ de bahsedildiği gibi hazırlanan örneklere 5 tekrarlı olarak okutulmuştur. Sonuçlar Tablo 4.5 ve 4.6’da görülmektedir. Yeni geliştirilen bu yöntemle eklenen iki farklı konsantrasyona sahip numuneler analiz edilerek geri kazanım değerleri % 93,1 ile % 105,0 arasında ve bağıl standart sapmalar ise % 4,0 ile % 6,2 arasında değişmektedir. Bu verilere göre geliştirilen yöntemin doğruluğu ve tekrarlanabilirliğinin yeterli olduğu söylenebilir.

Tablo 4.6. Fabrik Faz Ekstraksiyon Yönteminin Sentetik İdrar ve Sentetik Tükürük Üzerine Uygulanması

	Eklenen ng mL ⁻¹	Bulunan ^a ng mL ⁻¹		% BSS		% Geri Kazanım	
		FIN	CIT	FIN	CIT	FIN	CIT
Sentetik idrarçözeltilisi	0.0	<GS	<GS	-	-	-	-
	250,0	253,5±10,6	262,4±10,4	4,2	4,0	101,4	105,0
	500,0	516,7±24,8	492,5±22,3	4,8	4,5	103,3	98,5
Sentetik Tükürük çözeltilisi	0.0	<GS	<GS	-	-	-	-
	250,0	238,4±13,1	237,8±14,2	5,5	6,0	95,4	95,1
	500,0	415,5±28,9	512,4±27,8	6,2	5,4	93,1	102,5

^a 3 tekrarlı ölçümün ortalaması ± standart sapması, GS: Gözlenebilir Sınır

Tablo 4.7. Farklı ekstraksiyon yöntemleri için uygulanan t ve F testinin Fingolimod sonuçlarından hesaplanan verileri

Parametre	MKFE	FFE	
N	5	5	
Ortalama	261,2	253,5	
Standart sapma	13,8	10,6	$t_{kritik} > t_{deneysel}$
$t_{deneysel}$	$\frac{x_1 - x_2}{S_{bir} \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 \times N_2}}} = 0,35$		
t_{kritik}	Serbestlik derecesi =8 için ,% 95 Güven düzeyinde $t_{kritik} = 2,31$		
$F_{deneysel}$	$\frac{S_1^2}{S_2^2} = 0,59$		
F_{kritik}	% 95 Güven seviyesinde $F_{kritik} = 2,93$		$F_{kritik} > F_{deneysel}$

4.9. Manyetik Katı Faz ve Fabrik Faz Ekstraksiyon Yöntemlerinin t ve F Testiyle Değerlendirilmesi

Geliştirilen yöntemlerden elde edilen sonuçlar aynı model çözelti ile 5 tekrarlı yapılan ölçümlerin sonuçları t ve F testiyle fingolimod ve sitalopramın ayrı ayrı 250,0 ng mL⁻¹'lik standart eklemeli analiz sonuçları karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.8. Farklı ekstraksiyon yöntemleri için uygulanan t ve F testinin sitalopram sonuçlarından hesaplanan verileri

Parametre	MKFE	FFE	
N	5	5	
Ortalama	256,3	262,4	
Standart sapma	11,8	10,4	$t_{kritik} > t_{deneysel}$
$t_{deneysel}$	$\frac{x_1 - x_2}{S_{bir} \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}} = 0,31$		
t_{kritik}	Serbestlik derecesi =8 için ,% 95 Güven düzeyinde $t_{kritik} = 2,31$		
$F_{deneysel}$	$\frac{S_1^2}{S_2^2} = 0,78$		
F_{kritik}	% 95 Güven seviyesinde $F_{kritik} = 2,93$		$F_{kritik} > F_{deneysel}$

Yapılan hesaplamalarla manyetik katı faz ekstraksiyon yöntemi ile fabrik faz ekstraksiyon yöntemi karşılaştırılmak için değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme için iki farklı test yöntemi ile 250,0 ng mL⁻¹ konsantrasyonda iki farklı ilaç molekülü ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması için gerçekleştirilmiştir. Bu iki farklı ilaç

molekölünün ortalamalar açısından farklı olup olmadığını araştırmak amacı ile uygulanan t testi sonuçlarına bakıldığında, % 95 güven düzeyinde 8 serbestlik derecesi ile kritik değer deneysel değerden büyüktür. Aralarında anlamlı bir fark olmadığı ve bu farkın belirsiz hatalardan kaynaklanabileceği belirlenmiştir.

Uygulanan bir diğer test yöntemi ise F testidir. 250,0 ng mL⁻¹ 'lik konsantrasyonda iki farklı ilaç molekölünün varyanslarının kıyaslanması ile gerçekleştirilmiştir. F testi sonuçlarına bakıldığında % 95 güven düzeyinde kritik değerlerin deneysel değerlerden büyük olduğu, standart sapmalar açısından aralarında anlamlı bir fark olmadığı ve bu farkında belirsiz hatalardan kaynaklanabileceği belirlenmiştir.



5. TARTIŞMA

Fingolimod ve sitalopramın birini ya da ikisini birden farklı örneklerden ve matrislerden ekstraksiyonu ve analizlerine ilişkin literatür çalışmalarının bazı analitik verileri verilerek geliştirilen yöntemle karşılaştırılmıştır (Tablo 5.1).

Azari ve ark.,(2015) yaptıkları bu çalışmada spektrofotometrik tayin yöntemi geliştirirken fingolimod yanında sitalopram molekülü de eş zamanlı tayin edilebilmiştir. Azari ve ark bu çalışmada SDS kaplı karışık-hemi misel katı faz ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Tezde geliştirilen katı faz ekstraksiyon yöntemlerinde hem manyetik katı faz hem de fabrik faz katı faz sorbenti olarak kullanılmıştır. Azari ve ark, su, idrar ve plazma örnekleri için sırasıyla kalibrasyon doğruları 2–26, 2–17 ve 2–13 mg L⁻¹ konsantrasyon aralıklarında lineerdir. Kalibrasyon doğrularının korelasyon katsayıları matrisler için sırasıyla 0,998, 0,997 ve 0,995 şeklindedir. Bizim çalışmamızda zenginleştirme sonrası çizilen kalibrasyon doğruları fingolimod için 25,0-1000,0 ng mL⁻¹ ve sitalopram için 20,0-1000,0 ng mL⁻¹ aralığında doğrusaldır. Kalibrasyon doğrularının korelasyon katsayısı ise fingolimod için 0,9914, sitalopram için 0,9941'dir.

Fracasso ve ark.,(2022) yaptıkları çalışmada, insan plazmasında fingolimod ve aktif metaboliti fingolimod-P'yi ölçmek için HPLC-MS/MS yöntemi geliştirerek doğrulamışlardır. Çalışmamızda ekstraksiyon yöntemi geliştirilerek iki farklı katı faz ekstraksiyon tekniği ile çalışılmıştır ve tayin sınırı belirlemede HPLC-MS/MS ile yapılmış olan bu çalışma ile kıyaslanacak olduğunda klasik bir kromatografik ayırma yöntemiyle ng mL⁻¹ değerlerinde analiz gerçekleştirilebilmiştir.

Sarıkaya ve ark., (2021); idrar ve atık su örneklerinde fluoksetin ve sitalopram antidepressanlarının, fotodiyot dizi dedektörü ile birlikte sıvı kromatografisi ile hassas belirlenmesi için ekstraksiyon yöntemi geliştirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada iki farklı

molekül tek bir ekstraksiyon tekniği ile çalışılmışken bizim çalışmamızda yine kromatografik yöntemle iki farklı ekstraksiyon tekniği olan manyetik katı faz ekstraksiyon tekniği ve fabrik faz ekstraksiyon tekniği kullanarak sentetik idrar ve sentetik tükürük üzerinde çalışması gerçekleştirilmiştir.

Kumar ve Sharma., (2021) fingolimod tablet analizlerinin rutin kalite kontrol çalışmaları için bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde farmasötik dozaj formunda fingolimod varlığı tespiti ve tayini için yeni bir RP-HPLC yöntemi önermişlerdir. Yöntemin gözlenebilme sınırı $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$, geri kazanım değerleri %98-%102 aralığında yer almaktadır. Bu çalışmada gözlenebilme ve tayin sınırları $\mu\text{g mL}^{-1}$ düzeylerinde iken bizim çalışmamızda bu değer ng mL^{-1} düzeylerine inerek yaklaşık 6-7 katlık bir farkla daha düşük derişimleri tayin edebilme imkanı sağlamıştır.

Asgharinezhad ve ark., (2015) yayımladıkları çalışmada polipirol/manyetik nanopartikül kompozitleri dispersif-m-katı faz ekstraksiyonu (D-m-SPE) için kimyasal oksidatif polimerizasyon prosesi yardımıyla sentezlemişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışmada idrar ve plazma örneklerinin HPLC-UV ile tespitini gerçekleştirmişlerdir. Kalibrasyon eğrileri $1-800 \text{ mg L}^{-1}$ aralığında doğrusal olduğunu ve sırasıyla GS değerleri **CIT için $0,2-1,0 \text{ mg L}^{-1}$** ve STR için $0,3-0,7 \text{ mgL}^{-1}$ aralığında olduğunu belirlemişlerdir. Yüzde ekstraksiyon geri kazanımları **CIT için %93,4-99**, ve STR için %94,0-98,4 idi. Bağıl standart sapmalar ($n = 5$) CIT için %4,8-8,4 ve STR için 4,3-9,2 aralığındaydı. Yöntem insan idrar ve plazma örneklerinde CIT ve STR'nin ekstraksiyonu ve belirlenmesiyle başarıyla uygulamıştır (Asgharinezhad ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda iki farklı ekstraksiyon tekniği kullanılarak her iki teknik için benzer parametreler çalışılmıştır. Kalibrasyon aralığının $2,0-60,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ arasında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Gözlenebilme sınırları ekstraksiyon sonrasında ng mL^{-1} düzeylerinde hesaplanmıştır. Yöntem sentetik tükürük ve idrar örnekleri üzerine geri kazanım ve tekrarlanabilirlik açısından değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda elde edilen geri kazanım değerleri MKFE yönteminde **SIT için %96,6-102,5** ve FIN için 101,5-105,4 arasında olduğunu 5 tekrarlı ölçüm sonucunda %BSS değerleri **SIT için %4,5-5,5**, FIN için 5,0-5,3 arasında olduğu belirlenmiştir. FFE yönteminde **SIT için %95,1-105,0** ve FIN için %93,1-103,3 arasında olduğunu 5 tekrarlı ölçüm sonucunda %BSS değerleri **SIT için %4,0-6,2** arasında, FIN için 4,2-5,5 arasında olduğu belirlenmiştir.

Lahijani ve ark., (2017), insan plazma örneklerinde sitalopram hidrobromür ve norriptilin hidrolkorürün belirlenmesi için yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde HPLC-DAD ile birleştirilmiş ultrason destekli iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (UA-IL-DLLME) uygulanmıştır.

Yöntemde sitalopram için bulunan tayin sınırı değeri $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak tespit edildi. Yöntemin korelasyon katsayısı 0,9980 ve $50 \mu\text{g L}^{-1}$ lik çözeltinin %BSS değeri %3.2 olarak hesaplanmıştır (Vaghar-Lahijani ve ark., 2017). Çalışmamızda sitalopram yanında fingolimod tayini yapılarak literatüre ilk kez kazandırılmıştır. Bunun yanında çalışmamızda sitalopram için tayin sınırı $6,85 \text{ ng mL}^{-1}$ derişimlerinde tespit edilmiştir. Yöntemde sitalopram için tayin katsayısı 0,9941 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin %BSS değeri %5,32 ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemine göre daha düşük hacimde çözücü kullanımı ve daha düşük derişimleri tayin edebilme yeteneğinden dolayı katı faz ekstraksiyon tekniklerinden olan manyetik katı faz ve fabrik faz ekstraksiyon teknikleri kullanılmıştır.

Fahimirad ve ark.,(2016), yapmış oldukları bu çalışmada doksepin, sitalopram ve fluvoksaminin tandem dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu HPLC-UV kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Yöntemin sitalopram için $10 -5000 \text{ ng mL}^{-1}$ aralığında iyi bir doğrusallık gösterdiği belirtilmiştir. Tespit limitleri $3-10 \text{ ng mL}^{-1}$ aralığında olduğu rapor edilmiştir (Fahimirad ve ark., 2016). Çalışmamızdaki katı faz ekstraksiyon yönteminde lineer dinamik aralık benzerdir. Tezdeki yöntemde daha düşük çözücü kullanımı avantajına sahiptir.

Beiranvand ve ark., (2017), Sitalopramın ön konsantrasyonu için bulutlanma noktası manyetik katı faz ekstraksiyonun spektrofotometrik tayinini kullanmışlardır.(Beiranvand ve ark ., 2017). Çalışmamızda katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır bu yüzden daha düşük çözücü kullanımı avantajına sahiptir. Tez çalışmamızda, iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılırken eşzamanlı olarak fingolimod ve sitalopram moleküllerinin tayini gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemlerden biri olan MKFE yöntemi için $\text{Fe}_3\text{O}_4@L$ -Tirozin içeren yeni bir manyetik adsorban ilk kez bu çalışma için sentezlenerek karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonuçlarına bakılacak olunursa FT-IR, XRD ve SEM analizlerine göre sentez değerlendirilmesi yapılmıştır. FT-IR sayesinde bağlı gruplar hakkında bilgi

sahibi olunmuştur. SEM ile yüzey morfolojisi değerlendirilmiş ve XRD ile kırınım tepe noktaları arasındaki ilişki incelenmiştir. Diğer yöntem olan FFE yöntemi için de poly(caprolactone)-poly(dimethylsiloxane)-poly(caprolactone) (PCAP-PDMS-PCAP) içerikli fabrik faz adsorbantı sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Her iki katı faz ekstraksiyon yönteminde pH, adsorpsiyon ve desorpsiyon koşulları, zaman etkisi vb. deneysel değişkenleri adım adım incelenmiştir ve optimize edilmiştir. FIN ve CIT moleküllerinin HPLC analizi, %50 Asetonitril, %40 pH 3,0 fosfat tamponu ve %10 metanolden oluşan yürütücü fazın 1,0 mL dk⁻¹ akış hızıyla izokratik elüsyonu yoluyla gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen MKFE yöntemi için gözlenebilme sınırları , FIN için 6.32 ng mL⁻¹ iken CIT molekülleri için 6,85 ng mL⁻¹ 'dir. 100 ng mL⁻¹ hedef molekül analizinde % RSD değerleri %5,5' in altındadır. Sentetik idrar ve yapay tükürük çözeltilerinde geri kazanım değerleri her iki molekül için de %96,6-105,4 aralığındadır.

FFE yöntemi için gözlenebilme sınırları , FIN için 7,46 ng mL⁻¹ iken CIT molekülleri için 5,97 ng mL⁻¹dir. 100 ng mL⁻¹ hedef molekül analizinde % RSD değerleri % 6.2'nin altındadır. Sentetik idrar çözeltilerinde geri kazanım değerleri her iki molekül için de %93,1-105,0 aralığındadır.

Geliştirilen bu yöntemlerin her ikisinde de analiz edilmesi hedeflenen maddeler için en ideal tayin koşulları belirlenmiştir. Yeni geliştirilen yöntemlerin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği için sentetik idrar, sentetik tükürük çözeltileri ile standart ekleme yaparak geri kazanım çalışmaları ile test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kantitatif olduğu, yöntemin hem geri kazanım değerlerine bakıldığından doğruluğu hakkında hem de bağıl standart sapma değerlerine bakıldığında tekrarlanabilirliği hakkında kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğu anlaşılmıştır. Zenginleştirme öncesi ve sonrası belirlenen tayin sınırı, gözlenebilme sınırı, doğrusal aralık, kalibrasyon duyarlılığı, zenginleştirme ve iyileştirme faktörleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda doğrusal aralık, tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı değerleri µg mL⁻¹ seviyesinde iken ekstraksiyon ve zenginleştirme adımından sonra ng mL⁻¹ seviyelerine düşürülerek daha düşük derişimler tayin edilebilmiştir. Sonuç olarak ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak çok düşük derişimlerdeki analitlerin tayinleri DAD dedektörlü HPLC cihazı ile tayin edilebilmiştir.

Tablo 5.1. Literatürde Yer Alan Bazı Çalışmalarla Karşılaştırma

Hedef Molekül	Ekstraksiyon Yöntemi	Analiz Yöntemi	R ² Regresyon Katsayısı	Tayin Sınırı	Örnek	Kaynak
Fingolimod	-	HPLC-MS/MS	0,9954	0,10 ng mL ⁻¹	İnsan kanı	(Fracasso ve ark., 2022)
Fingolimod	Hemi-misel SPE	Spektrofotometre	0,9970	1,13 mg mL ⁻¹ 1,28 mg mL ⁻¹ 0,97 mg mL ⁻¹	İdrar Su Kan	(Azari ve ark., 2016)
Fingolimod	-	RPHPLC	0,9999	0,04 µg mL ⁻¹	-	(Kumar ve ark., 2021)
Sitalopram	D-µ-SPE	HPLC-UV	0,9944	0,6 µg mL ⁻¹	İnsan kanı	(Asgharinezhad ve ark., 2015)
Sitalopram	UA-IL-DLLME	HPLC-PDA	0,9980	6 µg L ⁻¹	İnsan kanı	(Vaghar ve ark., 2017)
Sitalopram	Tandem-DLLME	HPLC-UV	0,9950	3 ng mL ⁻¹	İnsan kanı İlaç atıksuyu	(Fahimirad ve ark., 2016)
Sitalopram	Bulut Noktası MSPE	Lüminesans Spektrometre	0,9996	0,42 ng mL ⁻¹	Tablet ve kan	(Beiranvand ve ark., 2017)
Sitalopram	MSPE	HPLC-DAD	0,9873	1,43 ng mL ⁻¹	İdrar ve atık su	(Sarıkaya ve ark., 2021)
Fingolimod	MKFE FFE	HPLC-DAD	0,9914 0,9990	6,32 ng mL ⁻¹ 7,46 ng mL ⁻¹	Sentetik Tükürük ve İdrar	Bu çalışma
Sitalopram	MKFE FFE	HPLC-DAD	0,9941 0,9964	6,85 ng mL ⁻¹ 5,97 ng mL ⁻¹	Sentetik Tükürük ve İdrar	Bu çalışma

6. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME

Bu tez çalışması, fingolimod ve sitalopram ilaç etken maddelerinin eş zamanlı tayini amacıyla başlatılmış olup, amacına uygun şekilde güvenilir analiz yöntemi belirlenmiştir. Bunun için HPLC-DAD tekniği ile kromatografik tayin için ilk olarak kolon sıcaklığı, numune hacmi, uygulama faz bileşenleri, basınç, akış hızı gibi parametreler optimize edilerek koşullar belirlenerek yöntem geliştirilmiştir. Daha sonra yöntemin matris bileşenlerinden daha kolay ayrılmasını sağlamak, daha düşük hacimlerini tayin edebilmek ve zamandan tasarruf sağlayarak maliyetide düşürmek amacıyla ayırma ve zenginleştirme yöntemleri uygulanmıştır. Bu amaçla iki farklı katı faz ekstraksiyon tekniği kullanılmıştır. Bunlar manyetik katı faz ekstraksiyon yöntemi ve fabrik faz ekstraksiyon teknikleridir. Ardından yöntemin optimizasyon koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için, ortam pH'ı, desorpsiyon solventinin hacmi ve seçimi, adsorpsiyon için etkileşim süresi ve bileşenin katı fazdaki maddeden salınması için geçen süre gibi parametreler optimize edilerek belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan katı faz ekstraksiyon tekniklerinin kolay uygulanabilir olması, düşük maliyetli olması, organik çözücü kullanımının en aza indirgenmesi, yüksek doğruluk ve kesinlikte metodların geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Yöntemin optimizasyon parametreleri belirlenip geliştirildikten sonra, geri kazanım çalışmaları için sentetik idrar ve yapay tükürük çözeltileri üzerinden geri kazanım çalışmaları yapılmıştır ve verilerinin oldukça iyi olduğu tespit edilmiştir.

Sonuçta kromatografik temelli, ayırma ve zenginleştirme yapılarak **eş zamanlı** tayin edilmesi hedeflenen fingolimod ve sitalopram için manyetik katı faz destek maddesinin sentezlenmesinin ardından her iki ekstraksiyon tekniği ile başarılı sonuçlar elde

edilmiştir. Yöntem sentetik idrar ve tükürük örnekleri ile matris ortamı oluşturularak örneklerin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği için geri kazanım çalışmalarında standart ekleme analizi ile 250,0 ve 500,0 ng mL⁻¹ lik örnek ortamında gerçekleştirilmiştir. ;Geri kazanım değerleri yöntemin doğruluğunun iyi olduğunu göstermektedir. Yöntemin tekrarlanabilirliği makul düzeydedir. Her iki ekstraksiyon yönteminde kullanılan katı faz destek maddeleri yeni sentezlenmiş olup, bu iki yöntemin birbiri ile uyumlu olup olmadığını kontrol etmek amacıyla t ve F testleri uygulanmıştır. Her iki tekniğin birbirleriyle uyumlu olduğu test sonuçları ile açıklanmıştır.

Sonuç olarak geliştirilen yöntemler sulu ortam, tükürük ve idrar gibi çeşitli matrislerde bulunan fingolimod ve sitalopram ilaç etken maddelerinin eş zamanlı tayinleri için güvenle kullanılabilceği görülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Aktas O, Küry P, Kieseier B, Hartung HP. Fingolimod İs A Potential Novel Therapy For Multiple Sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 2010;6(7); 373–382. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.76>
- Altunrende B, Birday E, Kasap M, Demir GA. Relapsing Remitting Multipl Skleroz Tedavisinde Fingolimod Kullanımı. *Turk Noroloji Dergisi*, 2017;23(4); 176–185. <https://doi.org/10.4274/tnd.62144>
- Alvarez JI, Cayrol R, Prat A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2011;1812(2); 252–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.06.017>
- Andrade EA, Canle M, Leroy CV, Cerdà V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2016; 80; 641–654. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>
- Araç D, Diraman H, Güner S. Helal Gastronomi Ve HelaSertificali Gıda (Beslenme) Kültürü. *Helal ve Etik Araştırmalar Dergisi*, 2022;4(1); 44–61. <https://doi.org/10.51973/head.1072453>
- Asgharinezhad AA, Karami S, Ebrahimzadeh H, Shekari N, Jalilian N. (). Polypyrrole/magnetic nanoparticles composite as an efficient sorbent for dispersive micro-solid-phase extraction of antidepressant drugs from biological fluids. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015;494(1); 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.001>
- Azari Z, Pourbasheer E, Beheshti A. Mixed hemimicelles solid-phase extraction based on sodium dodecyl sulfate (SDS)-coated nano-magnets for the spectrophotometric determination of Fingolomid in biological fluids. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016;153; 599–604. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.09.013>
- Balatoni B, Storch MK, Swoboda EM, Schönborn V, Koziel A, Lambrou GN, Hiestand PC, Weissert R, Foster CA. FTY720 sustains and restores neuronal function in the DA rat model of MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Research Bulletin*, 2007;74(5); 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.06.023>
- Bayram B. (2011). Zeytinyağı Fenoliklerince Zengin Diyetin Yaşlanma Hızlandırılmış Fare Modelinde Yaşlanmaya Bağlı Değişiklikler Üzerine Etkisi ve Zeytinyağındaki Fenolik Maddelerin Elektrokimyasal Dedektör ile Hplc

- Analizi,.*Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ,İstanbul 2011;s.:* 36-39
- Basogul C, Buldukoglu K.Psychosocial Interventions in Depressive Disorders. *Psikiyatride Guncel Yaklasimlar*, 2014;7(1);1. <https://doi.org/10.5455/cap.20140426072955>
- Baydan T,Sivrikaya SK. *Multiple Skleroz ve Mikrobiyata .Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi,2021: 10; 410–415.*
- Bengü AŞ. HPLC Tekniği ve Kullanım Alanları. *Bingöl Üniversitesi Sağlık Dergisi*, 2021;2(1); 64–69.
- Bişgin AT, Sürme Y, Uçan M,Narin I. Separation, Preconcentration and Spectrophotometric Determination of Rhodamine B in Industrial, Cosmetic and Water Samples by Cloud Point and Solid Phase Extraction. *Journal of Analytical Chemistry*, 2018;73(5); 452–458. <https://doi.org/10.1134/S1061934818050040>
- Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, Aradhye S, Burtin P. Fingolimod (FTY720): Discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010;9(11); 883–897. <https://doi.org/10.1038/nrd3248>
- Buszewski B,Szultka M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2012;42(3); 198–213. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>
- Çaylak O. Polimerik Reçine İle Cıva Türlemesi Ve Manyetik Nanoparçacık Kullanımıyla Eser Elementlerin Katı Faz Ekstraksiyonu,. *Doktora Tezi,Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,Denizli 2019;s.:* 24-33
- Chaudhari VS, Borkar RM, Murty US, Banerjee S. Analytical method development and validation of reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for simultaneous quantifications of quercetin and piperine in dual-drug loaded nanostructured lipid carriers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020: 186; 113325. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113325>
- Doyduk, D. Bor Çekirdekli Fingolimod Benzeri Yeni Bileşiklerin Sentezleri, Yapılarının Spektroskopik Yöntemlerle Doğrulanması Ve Biyoetkinliklerinin İncelenmesi,. *Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ,Ankara 2016 ; s.:* 3-38.
- Emir A, Önür MA. Galanthus fosteri üzerinde galantamin ve likorinin YBSK-DAD ile eşzamanlı miktar tayini. *Marmara Pharmaceutical Journal*,2016;20(3); 320–324. <https://doi.org/10.12991/mpj.201620053936>
- Özer D, Kocabıyık A, Girgin V, Demiraslan P. Ergenlerde Depresyon: Epidemiyoloji, Klinik Görünüm, Komorbidite, Seyir, Komplikasyonlar. *Düşünen Adam*, 2002;15(2); 90–96.
- Ersin E. Katı Faz Ekstraksiyonu İle Bazı Pestisitlerin Önderiştirilmesi Ve Tayinleri .Yüksek Lisans Tezi,Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü , Denizli 2020; s.: 10-17
- Eser B. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *Journal of Health Services and Education*, 2018;2(2); 51–57. <https://doi.org/10.26567/johse.2018250150>

- Karaoğul E, Alma MH. *Enzimatik, asidik ve sulu ekstraksiyon metotları ile çiriş (Asphodelus aestivus Brot.) yumrularının HPLC ile Őeker kompozisyonları.Ormancılık Araştırma Dergisi*, 2018;5, (1); 64 - 73, .
<https://doi.org/10.17568/ogmoad.401318>
- Fahimirad B, Asghari A, Bazregar M, Rajabi M, Fahimi E. Application of tandem dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of doxepin, citalopram, and fluvoxamine in complicated samples. *Journal of Separation Science*, 2016; 39(24); 4828–4834. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600673>
- Güven F. *Fingolimod tedavisi alan multiple skleroz hastalarında lenfopeninin yaş ve cinsiyet ile ilişkisi* ., Uzmanlık Tezi,Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı, Hatay 2020;s.:20-27
- Felthous A R.Book Review: Comprehensive Textbook of Psychiatry. *The Journal of Psychiatry & Law*, 1989;17(1);109–113.
<https://doi.org/10.1177/009318538901700110>
- Fracasso C, Passoni A, Brambilla L, Mantegazza R, Rossi S, Gobbi M, Lucchetti J. A Validated HPLC-MS/MS Method for Quantification of Fingolimod and Fingolimod-Phosphate in Human Plasma: Application to Patients with Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *Applied Sciences (Switzerland)*, 2022;12(12).
<https://doi.org/10.3390/app12126102>
- Gajofatto A, Benedetti MD. Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop? *World Journal of Clinical Cases*,2015; 3(7);545.
<https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i7.545>
- Ge Y. Multiple sclerosis: The role of MR imaging. *American Journal of Neuroradiology*, 2006;27(6); 1165–1176.
- Göktaş EF. Yarış Atlarının İdrar Örneklerinde Bazı İlaç Etkin Maddelerinin Eşzamanlı Analizleri İçin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Ve/Veya Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi İle Metot Geliştirilmesi Ve Analitik Metot Validasyonu,. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,İstanbul 2019; s.:91-110.
- Goldenberg MM. Multiple Sclerosis. *Pathy’s Principles and Practice of Geriatric Medicine: Fifth Edition*, 2012;1(3); 823–833.
<https://doi.org/10.1002/9781119952930.ch70>
- Gordin C, Rusu M, Delaite C, Salhi S, Elzein T, Brogly M. Crystallinity behaviour in poly(ε-caprolactone)-b- poly(dimethylsiloxane) diblock and triblock copolymers through ftir and DSC. *Materiale Plastice*, 2009;46(1); 37–42.
- Gürpınar D, Erol A, Mete L. Depresyon ve nöroplastisite. *Klinik Psikofarmakoloji Bulteni*, 2007;17(2); 100–110.
- Hakan M. T, Yaylım İ. “Moleküler Tıp” Özel Sayısı Sayı. *ÜCD Güncelleme Serileri*, 2020; 9(2); 21–24.
- Hamon M, Bourgoın S. Pharmacological profile of antidepressants: a likely basis for their efficacy and side effects? *European Neuropsychopharmacology*, 2006; 16(SUPPL. 5). [https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(06\)70008-6](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(06)70008-6)
- Yüzbaşıoğlu D, Yılmaz EA, Ünal F. Antidepressan İlaçlar Ve Genotoksisite. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 2016; 9(1); 17-28

- Hemmati M, Rajabi M, Asghari A. Magnetic nanoparticle based solid-phase extraction of heavy metal ions: A review on recent advances. In *Microchimica Acta* 2018 : (Vol. 185, Issue 3). Microchimica Acta. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2670-4>
- Hennion MC. Solid-phase extraction: Method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1999:856(1–2), 3–54. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00832-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00832-8)
- Hu M, Huang P, Suo L, Wu F. Polydopamine-based molecularly imprinting polymers on magnetic nanoparticles for recognition and enrichment of ochratoxins prior to their determination by HPLC. *Microchimica Acta*, 2018:185(6). <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2826-2>
- Izadyar A, Arachchige DR, Cornwell H, Hershberger JC. Ion transfer stripping voltammetry for the detection of nanomolar levels of fluoxetine, citalopram, and sertraline in tap and river water samples. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2016:223; 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.09.048>
- Kabir A, Mesa R, Jurmain J, Furton KG. Fabric phase sorptive extraction explained. *Separations*, 2017:4(2); <https://doi.org/10.3390/separations4020021>
- Kabir A, Samanidou V. Fabric phase sorptive extraction: A paradigm shift approach in analytical and bioanalytical sample preparation. *Molecules*, 2021: 26(4); <https://doi.org/10.3390/molecules26040865>
- Kappos L, Cohen J, Collins W, De Vera A, Zhang-Auberson L, Ritter S, Von Rosenstiel P, Francis G. Fingolimod in relapsing multiple sclerosis: An integrated analysis of safety findings. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 2014: 3(4); 494–504. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2014.03.002>
- Kaynar P, Canbolat M, Bİngöl M, Polat A. Quantitative Determination of Vitamin B 2 by HPLC in Enteral Nutritional Products. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2007:64(3), 5–9.
- Keller MB. Citalopram therapy for depression: A review of 10 years of European experience and data from U.S. clinical trials. *Journal of Clinical Psychiatry*, 2000:61(12); 896–908. <https://doi.org/10.4088/JCP.v61n1202>
- Kole P L, Venkatesh G, Kotecha J, Sheshala R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography*, 2011:25(1); 199–217. <https://doi.org/10.1002/bmc.1560>
- Konak Üİ, Turhan İ, Certel M. Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması. *Akademik Gıda*, 2014:12(2); 79–87.
- Kumar BA, Sharma PK. RP-HPLC Method Development and Validation for the Estimation of Sacubitril and Valsartan in Pharmaceutical Dosage Form. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2021:14(11); 5797–5802. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2021.01008>
- Kumar R, Gaurav Heena, Malik AK, Kabir A, Furton KG. Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 2014:1359, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.013>

- Li Y, Chen Y, Xiao C, Chen D, Xiao Y, Mei Z. Rapid screening and identification of α -amylase inhibitors from *Garcinia xanthochymus* using enzyme-immobilized magnetic nanoparticles coupled with HPLC and MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2014: 960, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.041>
- Liljegren, G. *Development and Investigations of Novel Sample Preparation Techniques*,. Doktora Tezi, Uppsala Üniversitesi, İsviçre 2005; s.: 11-25.
- Loebermann M, Winkelmann A, Hartung H P, Hengel H, Reisinger EC, Zettl UK. Vaccination against infection in patients with multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 2012; 8(3); 143–151. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2012.8>
- Lu W, Shen Y, Xie A, Zhang, W. Yeşil sentez ve süperparamagnetik Fe₃O₄ nanopartiküllerinin karakterizasyonu. *Manyetizma ve Manyetik Malzemeler Dergisi*, 2010; 322 (13); 1828-1833.
- Macek J, Ptáček P Klíma J. Rapid determination of citalopram in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001: 755(1–2); 279–285. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00121-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00121-9)
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, Van Den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*, 2001; 50(1); 121–127. <https://doi.org/10.1002/ana.1032>
- Mirza M. Multiple Sklerozun Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi, *Erciyes Tıp Dergisi*, 2002: 24 (1) ;40-47.
- Mohamed HM. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2015; 6; 176–192. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.010>
- Nielsen NM, Westergaard T, Rostgaard K, Frisch M, Hjalgrim H, Wohlfahrt J, Koch-Henriksen N, Melbye M. Familial risk of multiple sclerosis: A nationwide cohort study. *American Journal of Epidemiology*, 2005; 162(8); 774–778. <https://doi.org/10.1093/aje/kwi280>
- Onur E, Yemez B, Polat S, Gürz NY, Cimilli C. Konsültasyon liyezon psikiyatrisi uygulamaları ve farmakoterapi tercihlerindeki değişim. *Klinik Psikiyatri Bülteni*, 2007; 17(4); 167–173.
- Örsel S. (). Depresyonda Tedavi: Genel İlkeler ve Kullanılan Antidepresan İlaçlar. *Klinik Psikiyatri*, 2004; Ek 4, 17–24.
- Öztürk S, Aytaç G, Kızılay F, Sindel M. Multiple Sclerosis. *Akdeniz Medical Journal*, 2017; 3(3); 137–147. <https://doi.org/10.17954/amj.2017.86>
- Paula LO, Sene AC, Manfroi LA, Vieira AA, Ramos MAR, Fukumasu NK, Radi PA, Vieira L. Tribo-Corrosion and Corrosion Behaviour of Titanium Alloys with and Without DLC Films Immersed in Synthetic Urine. *Journal of Bio- and Tribo-Corrosion*, 2018; 4(3); 1–12. <https://doi.org/10.1007/s40735-018-0166-8>
- Pirdadeh-Beiranvand M, Afkhami A, Madrakian T. Cloud point-magnetic dispersive




- solid phase extraction for the spectrofluorometric determination of citalopram. *Journal of Molecular Liquids*, 2017:241; 43–48.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.139>
- Rolak LA. Multiple sclerosis: it's not the disease you thought it was. *Clinical Medicine & Research*, 2003:1(1);57–60. <https://doi.org/10.3121/cmr.1.1.57>
- Santhosh G, Nagasowjanya G, Ajitha A, Rao YUM. Hplc Method Development And Validation: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis*, 2014:4(4); 274–280.
- Sari E, Günaydin N. Çözüm Odaklı Depresyon İle Basa Çıkma Egitiminin Depresyon Belirtileri Üzerindeki Etkileri. *Anadolu Psikiyatri Dergisi*, 2016:17(5); 369–375.
<https://doi.org/10.5455/apd.208951>
- Sarıkaya M, Ulusoy HI, Morgul U, Ulusoy S, Tartaglia A, Yılmaz E, Soylak M, Locatelli M, Kabir A. Sensitive determination of Fluoxetine and Citalopram antidepressants in urine and wastewater samples by liquid chromatography coupled with photodiode array detector. *Journal of Chromatography A*, 2021:1648.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462215>
- Sri A, Amal S, Hussain S, Amin Jalaluddin M. Preparation of Artificial Saliva Formulation. *Int. Conf. Icb Pharma Ii*, 2015:A2; 6–12.
<http://hdl.handle.net/11617/6203>
- Stahl SM. Basic psychopharmacology of antidepressants, part 1: antidepressants have seven distinct mechanisms of action. *Journal of Clinical Psychiatry*, 1998:59(4); 5–14.
- Tamakuwala M, Stagni G. Fingolimod Hydrochloride Gel for Dermatological Applications: Optimization of Formulation Strength and Effect of Colloidal Oatmeal (Aveeno®) as Penetration Enhancer. *AAPS PharmSciTech*, 2016:17(4); 907–914. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0415-9>
- Tamar M, Özbaran B. Çocuk ve Ergenlerde Depresyon. *Klinik Psikiyatri Dergisi*, 2004:7(2); 84–92.
- Topal G, Canpolat M. *The Preparation Of A New Protein Based Hplc Column Packing. Middle East Journal Of Science (MEJS)*, 2016:2;77–89.
- Tütüncü M. Primer Progresif Multiple Sklerozda Nöroinflamasyon Mu Nörodejenerasyon Mu Ön Plandadır Ve Prognostik Faktörler., Uzmanlık Tezi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, İstanbul 2010; S.: 52-60
- Uzbay, T. Anksiyete ve Depresyonun Nörobiyolojisi. *Klinik Psikiyatri Dergisi*, 2004:7(4); 3–11.
- Uçkun Z. *Major depresyon hastalarında sitalopramin farmakogenetik ve farmakokinetik yönünden araştırılması*. Doktora Tezi, ankara üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü, ankara 2011; s.: 23
- Vaghar-Lahijani G, Aberoomand-Azar P, Saber-Tehrani M, Soleimani M. Application of ionic liquid-based ultrasonic-assisted microextraction coupled with HPLC for determination of citalopram and nortriptyline in human plasma. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2017:40(1); 1–7.
<https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1274999>

- Vaghela A, Patel A, Patel A, Vyas A, Patel N. (). Sample Preparation In Bioanalysis : A Review. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 2016:5(05); 6–10.
- Vasconcelos I, Fernandes C. Magnetic solid phase extraction for determination of drugs in biological matrices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2017:89; 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.11.011>
- Webb M, Tham CS, Lin F F, Lariosa-Willingham K, Yu N, Hale J, Mandala S, Chun J, Rao TS. Sphingosine 1-phosphate receptor agonists attenuate relapsing-remitting experimental autoimmune encephalitis in SJL mice. *Journal of Neuroimmunology*, 2004:153(1–2);108–121. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.04.015>
- Wierucka M, Biziuk M. Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2014:59, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.007>
- Xie H , Liu H , Vang M , Tava H , Gao C. Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller üzerinde desteklenen L-Tirozin-Pd kompleksi : C–C kuplajı ve sülfür sentezi için yeni bir katalizör . *Appl Organometal Chem* . 2020 ; 34 : e5256 . <https://doi.org/10.1002/aoc.5256>
- Xuan S, Hao L, Jiang W, Gong X, Hu Y, Chen Z. Karbon kapsüllü Fe₃O₄ çekirdek/kabuk kompozitleri üretmek için kolay bir yöntem. *Nanoteknoloji* , 2007:18 (3); 035602.
- Yang J, Zhou Q, Shen K, Song N, Ni L. Controlling nanodomain morphology of epoxy thermosets templated by poly(caprolactone)-: Block -poly(dimethylsiloxane)-block -poly(caprolactone) ABA triblock copolymer. *RSC Advances*, 2018:8(7); 3705–3715. <https://doi.org/10.1039/c7ra12826f>
- Yıldırım S. *Yeni nesil kolonlar kullanılarak bazı florokinolon grubu antibiyotiklerin biyolojik sıvılarda eş zamanlı tayini için sıvı kromatografik yöntem geliştirilmesi ve validasyonu*. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon 2020 ;s.: 35-65.
- Yuvali D, Narin I, Soylak M, Yılmaz E. Green synthesis of magnetic carbon nanodot/graphene oxide hybrid material (Fe₃O₄@C-nanodot@GO) for magnetic solid phase extraction of ibuprofen in human blood samples prior to HPLC-DAD determination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020:179. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113001>
- Zhang Z, Guan D, Gao G, Wu G, Wang H. Gasochromic properties of novel tungsten oxide thin films compounded with methyltrimethoxysilane (MTMS). *RSC Advances*, 2017:7(65); 41289–41296. <https://doi.org/10.1039/c7ra03648e>
- Zilfidou E, Kabir A, Furton K G, Samanidou V. Fabric phase sorptive extraction: Current state of the art and future perspectives. *Separations*, 2018:5(3); 1–23. <https://doi.org/10.3390/separations5030040>

22% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çıkarılan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Ön Sıradaki Kaynaklar

- 20%  İnternet kaynakları
- 14%  Yayınlar
- 12%  Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Bütünlük Bayrakları

İnceleme için 1 Bütünlük Bayrağı



Değiştirilen Karakterler

17 sayfada 38 şüpheli karakter

Harfler başka bir alfabeden benzer karakterlerle değiştirilmiştir.

Sistemimizin algı-ritmaları bir belgede, onu normal bir gönderiden ayıracak her türlü tucaşızlığı derinlemesine inceler. Tuhaf bir şey fark ederseniz incelememiz için bayrak ekleriz.

Bir Bayrak mutlaka bir sorun olduğunu göstermez. Ancak daha fazla inceleme için dikkatinizi vermenizi öneririz.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Esra DURGUN

Uyruğu : T.C.

EĞİTİM

DERECE

KURUM

MEZUNİYET

Lisans

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi

Kimya Bölümü

2008-2012

Yüksek Lisans

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya ABD

2012-2015

Doktora

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya ABD

2019-2024

Yabancı Dil

İngilizce

A. MAKALELER

A.1. Altunay, N., Gürkan, R., & **Olgaç, E.** (2017). Development of a new methodology for indirect determination of nitrite, nitrate, and total nitrite in the selected two groups of foods by spectrophotometry. *Food Analytical Methods*, 10(7), 2194-2206. **SCI-ExP**

A.2. **Olgaç, E.**, & Gürkan, R. (2020). Coupling of ion pair ultrasound assisted-cloud point extraction to microvolume UV-Vis spectrophotometry for speciation analysis of ionic NO₂⁻, NO₃⁻ and total NO₂⁻/NO₃⁻ without and with reduction in the selected beverage and food matrices. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(11), 1811-1830. **SCI-ExP**

- A.3.** Ulusoy, H. İ., Yiğit, İ. N., Polat, Ü., **Durgun, E.**, Gürbüzler, A., & Ulusoy, S. (2023). Simultaneously HPLC Analysis of B1, B9 and B12 Vitamins at Trace Levels via Cloud Point Extraction. *Cumhuriyet Science Journal*, 44(4), 716-722.
- A.4.** **Durgun, E.**, ULUSOY, H. İ., & NARİN, İ., (2024). Sensitive, reliable and simultaneous determination of Fingolimod and Citalopram drug molecules used in multiple sclerosis treatment based on magnetic solid phase extraction and HPLC-PDA. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol.1237.

B. ULUSAL VE ULUSLARARASI KONGRE BİLDİRİLERİ

- B.1.** Kir Ufuk, Gürkan Ramazan, **Olgaç Esra**, Altunay Nail (2013). Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu İle Zenginleştirme Sonrası Spektrofotometre İle Bazı Asidik Meyve Suyu Örneklerinde Arsenik Belirlenmesi. XIII. Ulusal Spektroskop kongresi, 15-18 May. Burdur, Turkey.
- B.2.** **Esra Olgaç**, Gürkan Ramazan, Kir Ufuk, Altunay Nail (2013). Karışık Misel Ortamda Klorpromazin İle Eser Düzeylerde Nitritin Katalitik Kinetik Belirlenmesi. XIII. Ulusal Spektroskop kongresi, 15-18 May. Burdur, Turkey.
- B.3.** Altunay Nail, Gürkan Ramazan, Eser Merve, **Olgaç Esra**, Kir Ufuk (2013). Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu İle Zenginleştirme Sonrası FAAS İle Bazı İçme Suyu Ve Asidik İçeceklerde Çözünür İnorganik Antimon Türlerinin Belirlenmesi. XIII. Ulusal Spektroskop kongresi, 15-18 May. Burdur, Turkey.
- B.4.** Altunay Nail, Gürkan Ramazan, **Olgaç Esra**, Kir Ufuk (2013). Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu ile Zenginleştirme Sonrası FAAS ile bazı İçecek Örneklerinde Çözünür İnorganik Toplam Antimonun Belirlenmesi. XIII. Ulusal Spektroskop kongresi, 15-18 May. Burdur, Turkey.
- B.5.** Kir Ufuk, Gürkan Ramazan, Altunay Nail, **Olgaç Esra** (2013). Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu İle Zenginleştirme Sonrası Spektrofotometri İle Bazı Kozmetik Örneklerinde Eser Kadmiyum Belirlenmesi. XIII. Ulusal Spektroskop kongresi, 15-18 May. Burdur, Turkey.
- B.6.** **Esra Olgaç**, Gürkan Ramazan, Altunay Nail, Kir Ufuk (2014). Indirect cloud point extraction and spectrophotometric determination of trace nitrite different beverage samples. III. Eser Analiz Çalıştayı, 15-18 May, Tokat, Turkey.
- B.7.** Altunay Nail, Gürkan Ramazan, **Olgaç Esra**, Metin Tuğçe (2014). Quick and inexpensive determination of oxalate in vegetable samples with CPE UV VIS. III. Eser Analiz Çalıştayı, 15-18 May, Tokat, Turkey
- B.8.** Gürkan Ramazan, Kir Ufuk, Altunay Nail, **Olgaç Esra** (2014). A novel preconcentration procedure using cloud point extraction for determination of

inorganic dissolved arsenic species in some beverage samples using spectrophotometry. III. Eser Analiz Çalıştayı ,15-18 May,Tokat,Turkey.

- B.9.** Ş. Temiz., **Durgun E.**, Morgül Ü., Ulusoy S., Ulusoy H.İ (2021). Sensitive Determination of Ketoprofen and Ibuprofen in Urine Samples. 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences(13thISOPS), 22-25 June 2021, Ankara, Turkey.
- B.10.** E. **Durgun**, H.İ. Ulusoy, S. Kilit, Ü. Polat, A. Gürbüzler, A. Tartaglia, M. Locatelli, A. Kabir(2022). Determination of Phenobarbital at Trace Levels in Urine Samples by using Magnetic Solid Phase Extraction. 2nd European Sample Preparation e-Conferance , 14 march 2022,Oslo, Norveç.
- B.11.** E. **Durgun**, H.İ.Ulusoy, Ü. Morgül, E. Yılmaz ,İ. Narin(2022). Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon Yardımı ile Amitriptilin ve Sitalopram Antidepresanlarının Duyarlı Analizleri için Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi. 10.Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 7-11 Eylül 2022, Muğla, Türkiye.
- B.12.** E.**Durgun**, İ. Narin, H.İ. Ulusoy, (2023), Development Of Chromatographic Method For Sensitive And Reliable Analysis Of Fingolimod And Citalopram Molecules, 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA2023), 3-7 Temmuz 2023, Ankara
- B.13.** M. Turkel, S. Ulusoy, E. **Durgun**, U. Polat, H.I. Ulusoy, (2023) Development HPLC Method For Determination Of Naproxen Sodium Drug in Urine Samples By Solid Phase Microextraction Techniques, 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (FBA2023), 3-7 Temmuz 2023, Ankara
- B.14.** E. **Durgun**, (2024) İlaç Analizlerinde Kullanılan Örnek Hazırlama Yöntemleri, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Öğrencileri Kongresi, (CÜSÖT), 23-25 Mayıs 2024, Sivas, Türkiye

KATILDIĞI KONGRELER

- XIII. Ulusal Spektroskop Kongresi. 15-18 Mayıs (2013) **Burdur, Türkiye.**
- III. Eser Analiz Çalıştayı. 15-18 Mayıs (2014), **Tokat, Türkiye.**
- 13. International Symposium on Pharmaceutical Science (ISOPS-13) June 22-25 (2021) **Ankara, Turkey.**
- 2nd European Sample Preparation e- Conference 14-16 March, 2022, **Oslo, Norveç.**
- 10.Ulusal Analitik Kimya Kongresi 8-11 Eylül 2022, **Muğla, Türkiye**
- 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (FBA2023), 3-7 Temmuz 2023, **Ankara**

- İlaç Analizlerinde Kullanılan Örnek Hazırlama Yöntemleri, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Öğrencileri Kongresi,(CÜSÖT), 23-25 Mayıs 2024, **Sivas ,Türkiye**

