

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**TABLET FORMUNDAKİ İLAÇ PREPARATLARINDA
ELEMENTEL KİRLİLİKLERİN ÖNDERİŞTİRME
YÖNTEMLERİYLE TAYİNİ VE İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN
STABİLİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

SÜLEYMAN GÖKCE

DENİZLİ, TEMMUZ - 2023

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**



**TABLET FORMUNDAKİ İLAÇ PREPARATLARINDA
ELEMENTEL KİRLİLİKLERİN ÖNDERİŞTİRME
YÖNTEMLERİYLE TAYİNİ VE İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN
STABİLİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

SÜLEYMAN GÖKCE

DENİZLİ, TEMMUZ - 2023

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından 2022FEBE020 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

SÜLEYMAN GÖKCE

ÖZET

TABLET FORMUNDAKİ İLAÇ PREPARATLARINDA ELEMENTEL KİRLİLİKLERİN ÖNDERİŞTİRME YÖNTEMLERİYLE TAYİNİ VE İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN STABİLİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

SÜLEYMAN GÖKCE

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. AYŞEN HÖL)

DENİZLİ, TEMMUZ - 2023

Bu tezde, ilaç etken maddesinin stabilitesinin değerlendirilmesi, ilaç tabletlerinde eser elementlerin manyetik katı faz yöntemiyle önderiştirilmesi ve ilaç etken maddesinin tablet formundan hidrofobik derin ötektik çözücü sıvı-sıvı ekstraksiyonu tekniği ile önderiştirilmesi olmak üzere 3 yöntem geliştirildi. Birinci bölümde, 2019 yılının sonlarında Çin’de ortaya çıkan SARS-COV-2 virüsü kaynaklı COVID19 hastalığının tedavisinde kullanılmış olan Favipiravir etken maddesinin tayini için UPLC metodu oluşturuldu ve yöntem validasyonu LC-MS/MS tekniği ile yapıldı. Favipiravirin, zorlanmış koşullar altındaki stabilitesinin değerlendirmesi LC-MS/MS tekniği ile yapıldı ve favipiravir tablet formundan tayin edildi. İkinci bölümde, ilaç preparatlarında Pb(II), Zn(II), Cu(II), Co(II) eser metal iyonlarının önderiştirilmesi için yeni bir manyetik katı faz ekstraksiyonu yöntemi geliştirildi. Bu kapsamda adsorban olarak 8-hidroksikinolin ile kaplanmış Fe₃O₄ (Fe₃O₄-8HQ MNPs) manyetik katı faz sentezlendi ve karakterizasyon çalışmaları FT-IR, SEM, VSM ve TGA teknikleri ile yapıldı. Ekstraksiyon yönteminin optimizasyonundan sonra analitler MIS-FAAS ile tayin edildi. Geliştirilen yöntem ilaç, atık su ve kompozit malzeme örneklerine uygulandı. Ayrıca CRM çözeltisine yöntem uygulandı ve MIS-FAAS ile elde edilen sonuçlar, ICP-MS tekniği ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Üçüncü bölümde, yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan, santral etkili antihipertansifler ilaç grubunda bulunan Metildopa ilaç etken maddesinin, hidrofobik derin ötektik çözücü (HDÖÇ) sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu ile önderiştirilmesi ve HPLC-UV tekniği ile tayini çalışması yürütüldü. Bu kapsamda ilk olarak etken maddenin HPLC-UV metodu oluşturuldu ve yöntem validasyonu yapıldı. Hidrofobik derin ötektik çözücü olarak mentol-bütanol çözücü karışımı kullanıldı. Mentol-Bütanol hidrofobik derin ötektik çözücüsünün, FT-IR ile karakterizasyonu yapıldı. Optimizasyonu yapılan HDÖÇ mikroekstraksiyon yöntemi metildopa içeren tablet örneklerine uygulandı. Zenginleştirme faktörü 44.4 olarak bulundu.

ANAHTAR KELİMELELER: Stabilitate değerlendirme, UPLC-MS/MS, Mikroekstraksiyon, Fe₃O₄-8HQ MNPs, FAAS, Hidrofobik derin ötektik çözücü, Önderiştirme, HPLC-UV

ABSTRACT

DETERMINATION OF ELEMENTAL IMPURITIES IN TABLET FORM DRUG PREPARATIONS BY PRECONCENTRATION METHODS AND EVALUATION OF STABILITY OF DRUG ACTIVE INGREDIENTS

PH.D THESIS

SÜLEYMAN GÖKCE

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF. DR. AYŞEN HÖL)

DENİZLİ, JULY 2023

In this thesis, three methods were developed: evaluation of the stability of the drug substance, preconcentration of trace elements in drug tablets by magnetic solid phase method, and preconcentration of the drug substance from tablet form by hydrophobic deep eutectic solvent liquid-liquid extraction technique. In the first part, the UPLC method of the active ingredient Favipiravir, which was used in the treatment of COVID19 disease caused by the SARS-COV-2 virus that emerged in China at the end of 2019, was created and the method validation was done with the LC-MS/MS technique. The stability of favipiravir under forced conditions was evaluated by LC-MS/MS technique and determined from favipiravir tablet form. In the second part, the method for the preconcentration of Pb(II), Zn(II), Cu(II), Co(II) trace metal ions in drug preparations was developed. In this context, magnetic solid phase Fe₃O₄ (Fe₃O₄-8HQ MNPs) coated with 8-hydroxyquinoline as adsorbent was synthesized and characterization studies were performed with FT-IR, SEM, VSM and TGA techniques, method parameters were optimized with FAAS technique. After optimization of the extraction method, analytes were determined by MIS-FAAS. The developed method was applied to drug, wastewater and composite material samples. In addition, the method was applied to the CRM solution and the results obtained with MIS-FAAS were compared with the results obtained with the ICP-MS technique. In the third part, Methyldopa active ingredient in the centrally acting antihypertensives drug group used in the treatment of high blood pressure was preconcentrated by hydrophobic deep eutectic solvent (HDES) liquid-liquid microextraction and determined by HPLC-UV technique. In this context, first of all, the HPLC-UV method of the active substance was created and the method was validated. A menthol-butanol solvent mixture was used as the hydrophobic deep eutectic solvent. Menthol-Butanol hydrophobic deep eutectic solvent was characterized by FT-IR. The optimized HDES microextraction method was applied to tablet samples containing methyldopa. The enrichment factor was found to be 44.4

KEYWORDS: Stability indicating, UPLC-MS/MS, Microextraction, Fe₃O₄-8HQ MNPs, FAAS, Hydrophobic deep eutectic solvent, Preconcentration, HPLC-UV

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. FAVİPİRAVİR İLAÇ ETKEN MADDESİNİN UPLC-MS/MS TEKNİĞİ İLE STABİLİTESİNİN BELİRLENMESİ	6
2.1 Çalışmanın Amacı	6
2.2 Favipiravir İlaç Etken Maddesinin Stabilesinin Değerlendirilmesi ...	7
2.2.1 Favipiravir Etken Maddesinin Stabilesine Çalışmaları İle İlgili Literatür Bilgileri	8
2.3 Deneysel Bölüm	9
2.3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	9
2.3.2 Standart Stok Favipiravir Çözeltilisinin Hazırlanması	9
2.3.3 Tablet Çözeltilisinin Hazırlanması.....	9
2.3.4 Favipiravirin Maksimum Absorbans Yaptığı Dalga Boyunun (λ_{max}) Belirlenmesi	10
2.3.5 Kromatografik Şartlar	11
2.3.6 Kütle Spektroskopi Şartları.....	11
2.3.7 Metot Validasyonu.....	12
2.3.7.1 Yöntemin Doğrusal Çalışma Aralığı.....	12
2.3.7.2 Yöntemin Seçiciliği.....	14
2.3.7.3 Yöntemin Kesinliği	15
2.3.7.4 Yöntemin Doğruluğu	16
2.3.7.5 Yöntemin Sağlamlığı	17
2.3.7.6 Yöntemin Uygunluğu.....	18
2.3.8 Standart Çözeltilerin Stabilesi	18
2.3.9 Etken Madde Stabilesinin Değerlendirilmesi	19
2.3.10 Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması.....	21
2.3.11 Yöntemin Literatür ile Karşılaştırılması	21
3. 8-HİDROKSİKİNOLİN KAPLI MANYETİK NANOPARÇACIK KULLANILARAK, Co(II), Cu(II), Pb(II) VE Zn(II) ESER METAL İYONLARININ ÖNDERİŞTİRİLMESİ VE MİKRO ENJEKSİYON ÖRNEKLEMELİ ALEVLİ ATOMİK ABSORBSİYON SPEKTROMETRESİYLE TAYİNLERİ	23
3.1 Çalışmanın Amacı ve Genel Bilgi.....	23
3.2 Analitler ve Özellikleri	24
3.3 Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu	25
3.4 Manyetit (Fe ₃ O ₄)	27
3.5 Manyetik Nanoparçacık ve 8-Hidroksikinolin ile İlgili Literatür Bilgileri	28
3.6 Deneysel Bölüm	30

3.6.1	Kullanılan Aletler	30
3.6.2	Reaktifler ve Standart Çözeltiler.....	30
3.6.3	Manyetik Katı Faz Sentezi, Yapısı ve 8-Hidroksikinolin ile Kaplanması	31
3.6.4	Karakterizasyon Çalışmaları.....	32
3.6.4.1	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi	32
3.6.4.2	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-EDX) Analizi.....	33
3.6.4.3	Termogravimetrik Analiz (TGA).....	34
3.6.4.4	Titreşimli Numune Manyetometresi (VSM) Analizi	35
3.6.5	Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu (MSPE) Yöntemi	37
3.6.6	Sonuçlar ve Yorum	37
3.6.6.1	pH Etkisi	38
3.6.6.2	Elüent Türü, Hacmi ve Konsantrasyonu Etkisi.....	39
3.6.6.3	Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Çalkalama Süresinin Etkisi.....	41
3.6.6.4	Fe ₃ O ₄ -8HQ MNPs Miktarı Etkisi ve Tekrar Kullanılabilirlik	43
3.6.6.5	Numune Hacminin Etkisi.....	44
3.6.6.6	Yabancı İyon Etkisi.....	45
3.6.6.7	Adsorpsiyon Kapasitesi ve İzotermi	46
3.6.7	Yöntemin Analitik Değerlendirilmesi	49
3.6.8	Yöntemin Kesinliği ve Doğruluğu.....	52
3.6.9	Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması.....	54
3.6.10	Fe ₃ O ₄ -8HQ MNPs Yöntemi ile MIS-FAAS, ICP-MS Tekniklerinin Karşılaştırılması ve Literatür Değerlendirmesi	56
4.	DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ SIVI FAZ MİKROEKSTRAKSİYON TEKNİĞİ İLE METILDOPA İLAÇ ETKEN MADDESİNİN ÖNDERİŞTİRİLMESİ VE HPLC-UV İLE TAYİNİ.....	59
4.1	Çalışmanın Amacı	59
4.2	Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü (HDÖÇ) Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	61
4.3	İlaç Etken Maddesinin Önderiştirilmesi.....	62
4.3.1	HDÖÇ Kullanılarak İlaç Etken Maddelerinin Önderiştirilmesi ile İlgili Literatür Çalışmaları	62
4.4	DeneySEL Bölüm	65
4.4.1	Kullanılan Aletler	65
4.4.2	Reaktif ve Standart Çözeltiler.....	65
4.4.3	Tablet Örnek Çözeltilisinin Hazırlanması.....	66
4.4.4	Metildopa İlaç Etken Maddesinin Maksimum Absorbans Yaptığı Dalga Boyu (λ _{max}) Belirlenmesi	66
4.4.5	Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Yöntemin Optimizasyonu	67
4.4.6	Kromatografik Yöntemin Validasyonu	67
4.4.6.1	Yöntemin Seçiciliği.....	68
4.4.6.2	Yöntemin Doğrusallığı.....	69
4.4.6.3	Yöntemin Doğruluğu	71
4.4.6.4	Yöntemin Kesinliği	71
4.4.6.5	Yöntemin Uygunluğu.....	72
4.4.6.6	Yöntemin Sağlamlığı	73
4.4.7	Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü Hazırlanması	74
4.4.8	Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü Karakterizasyonu	75
4.4.9	HDÖÇ Mikroekstraksiyon Yöntemiyle Metildopa İlaç Etken Maddesinin Önderiştirilmesi ve HPLC ile Tayini	77

4.4.9.1 HPLC Şartlarının Belirlenmesi	77
4.4.9.1 HDÖÇ Mikroekstraksiyon Yöntemi	78
4.4.10 Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü Ekstraksiyonu Yönteminin Optimizasyonu	79
4.4.10.1 Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü Türü Etkisi.....	79
4.4.10.2 pH Etkisi	81
4.4.10.3 Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü Birleşimi Mol Oranları Etkisi	82
4.4.10.4 Tuz Etkisi	83
4.4.10.5 Vorteks Süresi Etkisi.....	85
4.4.10.6 Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü Hacmi Etkisi.....	86
4.4.10.7 Numune Hacmi Etkisi	87
4.4.11 Yöntemin Analitik Değerlendirmesi.....	88
4.4.12 Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması.....	90
4.4.13 Yöntemin Literatürdeki Diğer Çalışmalarla Karşılaştırılması.....	91
5. SONUÇ VE YORUM.....	93
6. KAYNAKLAR.....	105
7. ÖZGEÇMİŞ	117

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Favipiravir molekül yapısı	7
Şekil 2.2: Favipiravire ait UV spektrumu	10
Şekil 2.3: Favipiravire ait UPLC kromatogramı (10 mg L ⁻¹ , 222 nm)	11
Şekil 2.4: Favipiravire ait kütle spektrumu	12
Şekil 2.5: Favipiravire ait kalibrasyon grafiği.....	13
Şekil 2.6: Üst üste çakıştırılmış kromatogram (1, 2, 4, 6, 8, 10 µg mL ⁻¹).....	13
Şekil 2.7: Standart favipiravir çözeltisine ait kromatogram (10 µg mL ⁻¹).....	14
Şekil 2.8: Favipiravir içeren örnek çözeltiye ait kromatogram (4 µg mL ⁻¹)	15
Şekil 2.9: Kör çözeltiye ait kromatogram	15
Şekil 2.10: Zorlanmış koşullar altında etken maddenin stabilitesi	20
Şekil 3.1: Manyetik katı faz ekstraksiyonu yöntemi (Meszaros 2021).....	26
Şekil 3.2: Fe ₃ O ₄ Ters kübik yapı ve elektron geçişleri (Sakallıoğlu 2013)	27
Şekil 3.3: 8-hidroksikinolin kaplı Fe ₃ O ₄ manyetik nano partiküllerinin sentez şeması	32
Şekil 3.4: Fe ₃ O ₄ (kırmızı) ve Fe ₃ O ₄ @8-HQ MNPs'in (mavi) ATR-IR üst üste çakıştırılmış spektrumu	32
Şekil 3.5: (a) Fe ₃ O ₄ SEM görüntüsü, (b) Fe ₃ O ₄ @8-HQ MNPs SEM görüntüsü, (c) Fe ₃ O ₄ EDX, (d) Fe ₃ O ₄ @8-HQ MNPs EDX.....	34
Şekil 3.6: Termogravimetrik analiz grafiği, Fe ₃ O ₄ (kırmızı), Fe ₃ O ₄ @8-HQ (mavi)	35
Şekil 3.7: Histerisis eğrileri Fe ₃ O ₄ (mavi), Fe ₃ O ₄ -8HQ MNPs (kırmızı)	36
Şekil 3.8: Analit iyonlarının geri kazanımına pH etkisi.....	38
Şekil 3.9: Analitlerin geri kazanımına elüent türü etkisi (pH:8).....	39
Şekil 3.10: Analitlerin geri kazanımına elüent konsantrasyonu etkisi.....	40
Şekil 3.11: Analitlerin geri kazanımına elüent hacmi etkisi	41
Şekil 3.12: Analitlerin geri kazanımına adsorpsiyon süresinin etkisi	42
Şekil 3.13: Analitlerin geri kazanımına desorpsiyon süresinin etkisi	42
Şekil 3.14: Analitlerin geri kazanımına Fe ₃ O ₄ -8HQ MNPs miktarının etkisi ..	43
Şekil 3.15: Analitlerin geri kazanımına Fe ₃ O ₄ -8HQ MNPs'nin tekrar kullanılabilirliğinin etkisi	44
Şekil 3.16: Analitlerin geri kazanımına numune hacminin etkisi	45
Şekil 3.17: Fe ₃ O ₄ -8HQ MNPs'in Pb(II), Zn(II), Cu(II), Co(II) iyonları için adsorpsiyon kapasitesi.....	47
Şekil 3.18: Langmuir izotermi	48
Şekil 3.19: Freundlich izotermi.....	49
Şekil 3.20: Önderiştirmesiz ve önderiştirmeli kalibrasyon eğrileri	52
Şekil 4.1: Metildopa standart çözeltilerinin (5-30 µg mL ⁻¹) üst üste çakıştırılmış UV spektrumları.....	66
Şekil 4.2: Metildopa standart çözeltisine ait kromatogram (25 µg mL ⁻¹).....	68
Şekil 4.3: Metildopa içeren numune çözeltisine ait kromatogram (15 µg mL ⁻¹).....	68
Şekil 4.4: Kör çözeltiye ait kromatogram	69
Şekil 4.5: Metildopaya ait kalibrasyon grafiği	70

Şekil 4.6: Metildopa standart çözeltilerinin üst üste çakıştırılmış kromatogramı (çözelti konsantrasyonları: 5-30 µg mL ⁻¹).....	70
Şekil 4.7: Hidrofobik derin ötektik çözücü hazırlık aşamaları	75
Şekil 4.8: Bütanol, mentol, mentol-bütanol FT-IR spekturumları	76
Şekil 4.9: Mentol ve bütanol üç boyutlu molekülleri ve hidrojen bağı oluşumu	77
Şekil 4.10: Metildopa HPLC kromatogramı	78
Şekil 4.11: Etkin madde-HDÖÇ faz ayrımı	79
Şekil 4.12: Analitin geri kazanımına hidrofobik derin ötektik çözücü türü etkisi	80
Şekil 4.13: HDÖÇ türü kromatogramları; Bütanol-1 (Mavi), Laktik asit (kırmızı), Dekanoik asit (yeşil), Hekzanoik asit (pembe), Timol (sarı)	80
Şekil 4.14: Metildopa enantiyomerleri kimyasal yapıları	81
Şekil 4.15: Analitin geri kazanımına pH etkisi (Mentol-Bütanol, mol oranı 1-1)	82
Şekil 4.16: Analit pik alanına pH etkisi (mavi pH:2, kırmızı pH:3, yeşil pH:4, Pembe pH:5, sarı pH:6, mor pH:7, siyah pH:8)	82
Şekil 4.17: Analitin geri kazanımına mol oranı etkisi (pH 7)	83
Şekil 4.18: Analit pik alanına derin ötektik çözücü karışımı mol oranının etkisi, 1- 1 (kırmızı), 1-2 Yeşil, 0,5-1 (mavi) , 1-3 (pembe)	83
Şekil 4.19: Analitin geri kazanımına tuz etkisi (pH:7, mentol-bütanol mol oranı: 1-1)	84
Şekil 4.20: Analit pik alanına tuz etkisi (a/h) %2 mavi, %4 kırmızı, %6 yeşil, %8 pembe, %10 yeşil	84
Şekil 4.21: Analit geri kazanımına vorteks süresinin etkisi (pH:7, mentol-bütanol mol oranı: 1-1)	85
Şekil 4.22: Analit pik alanına vorteks süresinin etkisi 0 dk (Mavi), 1 dk (Kırmızı), 2 dk. (Yeşil), 3 dk. (Pembe), 4dk. (Sarı)	85
Şekil 4.23: Analit geri kazanımına santrifüj süresinin etkisi (pH:7, mentol-bütanol mol oranı: 1-1, vorteks 3dk.)	86
Şekil 4.24: Analit pik alanına santrifüj süresinin etkisi; 0 dk (Mavi), 10 dk (Kırmızı), 15 dk. (Yeşil), 20 dk. (Pembe)	86
Şekil 4.25: Analit geri kazanımına HDÖÇ hacmi etkisi (pH:7, mentol-bütanol mol oranı: 1-1, vorteks: 3dk., santrifüj: 15 dk.)	87
Şekil 4.26: Analit geri kazanımına numune hacmi etkisi (pH:7, mentol-bütanol mol oranı: 1-1, vorteks: 3dk., santrifüj: 15 dk., HDÖÇ hacmi: 300 µL)	88
Şekil 4.27: Önderiştirmesiz kalibrasyon eğrisi	89
Şekil 4.28: Önderiştirmeli kalibrasyon eğrisi	89

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Favipiravire ait kalibrasyon grafiği istatistiksel analiz sonuçları	14
Tablo 2.2: Gün içi ve Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları (Favipiravir konsantrasyonu: 1, 4, 10 µg mL ⁻¹)	16
Tablo 2.3: Yöntemin doğruluğu	17
Tablo 2. 4: Sağlamlık çalışması	18
Tablo 2.5: Standart çözeltilerin stabilitesi.....	19
Tablo 2.6: Favipiravir parçalanma ürünleri	20
Tablo 2.7: Yöntemin tablet formdaki piyasa preparatlarına uygulaması	21
Tablo 2.8: Favipiravir etken maddesi stabilite çalışmasının literatür ile karşılaştırılması	22
Tablo 3.1: FT-IR spektrum verileri ve literatür ile karşılaştırma	33
Tablo 3.2: Titreşimli numune manyetometresi analizi sonuçları	36
Tablo 3.3: Analitlerin geri kazanımına yabancı iyon etkisi	46
Tablo 3.4: Fe ₃ O ₄ -8HQ MNP üzerinde analit iyonlarının adsorpsiyon izoterm sabitleri	49
Tablo 3.5: Yöntemin analitik değerlendirmesi.....	51
Tablo 3.6: Geri kazanım değerlerinin tekrarlanabilirliği (Örnek hacmi:10 mL, pH:8).....	53
Tablo 3.7: Yöntemin doğruluğu (V; Pb-100 mL, Zn-75 mL, Cu ve Co 50 mL, pH:8).....	53
Tablo 3.8: MIS-FAAS ilaç, atık su, kompozit malzeme örnekleri çalışması ...	55
Tablo 3.9: CRM çözeltilisinin MIS-FAAS ve ICP-MS ile analiz sonuçlarının karşılaştırılması	57
Tablo 3.10: Fe ₃ O ₄ -8HQ MNPs'in kullanıldığı manyetik katı faz ekstraksiyonu yönteminin literatür ile karşılaştırılması	58
Tablo 4.1: Derin ötektik çözücü türleri ve formülasyonları.....	60
Tablo 4.2: Regresyon analizi verileri	70
Tablo 4.3: HPLC yönteminin doğruluğu	71
Tablo 4.4: HPLC yönteminin kesinliği	72
Tablo 4. 5: Sistem uygunluğu için sonuçlar	73
Tablo 4.6: Sağlamlık verileri.....	73
Tablo 4.7: Hidrofobik derin ötektik çözücü türlerinin hazırlanması.....	74
Tablo 4.8: HPLC-UV metot parametreleri	77
Tablo 4.9: HDÖÇ mikroekstraksiyon yönteminin analitik performansı.....	90
Tablo 4.10: 250 mg metildopa içeren tabletlerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiksel değerlendirmesi	91
Tablo 4.11: Yöntemin literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması.....	92

SEMBOL LİSTESİ

UPLC	:	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	:	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (International Council for Harmonisation)
FDA	:	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
LOD	:	Gözlenebilme Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	:	Tayin Sınırı (Limit of Quantification)
ppm	:	Milyonda Bir Kısım
V	:	Volt
eV	:	Elektronvolt
kV	:	Kilovolt
MS	:	Kütle Spektrometresi
L	:	Litre
µg	:	Mikrogram
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
dk.	:	Dakika
R²	:	Korelasyon Katsayısı
R.S.D	:	Bağıl Standart Sapma
S.D	:	Standart Sapma
R	:	Geri Kazanım
MSPE	:	Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu
MIS-FAAS	:	Mikroenjeksiyon Sistemli Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi
Fe₃O₄@8-HQ MNPs	:	8-Hidroksikinolin Kaplı Manyetik Nano Parçacık
CRM	:	Sertifikalı Referans Malzeme
ICP-MS	:	İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi
RNA	:	Ribonükleik Asit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
nm	:	Nanometre
MΩ	:	Megaohm
K	:	Kelvin
°C	:	Santigrat Derece
Oe	:	Oerst
DÖÇ	:	Derin Ötektik Çözücü
HDÖÇ	:	Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü
HPLC	:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
HBA	:	Hidrojen Bağı Akseptörü
HBD	:	Hidrojen Bağı Donörü
pKa	:	Asidik İyonlaşma Sabiti
PF	:	Teorik Önderiştirme Faktörü
EF	:	Deneyisel Zenginleştirme Faktörü

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmamın yönetimini kabul eden, çalışmaların tamamında, konu seçiminde, malzeme temininde, laboratuvar çalışmalarında, teorik ve pratik her konuda, lisans öğrencilik dönemimden itibaren yardımını ve bilgi birikimini benden esirgemeyen, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ayşen HÖL'e öncelikli olarak saygı ve şükranlarımı sunar, teşekkür ederim.

Tez çalışmamdaki yardımlarından dolayı, Anabilimdalı Başkanı hocam Prof. Dr. Ümit DİVRİKLİ'ye, Tez İzleme Komisyonu hocam Prof. Dr. Baki ÇİÇEK'e, Pamukkale Üniversitesi Analitik Kimya çalışma grubuna, altyapı destekleriyle çalışmalarına katkı sunan Pamukkale Üniversitesi Kimya Bölüm Başkanlığı'na, Uşak Üniversitesi Bilimsel Analiz ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne, 2022FEBE020 nolu proje ile tezime katkı sağlayan Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında bana destek olan, çok kıymetli annem Emine GÖKCE'ye, babam Faik GÖKCE'ye ve kardeşim Hakan GÖKCE'ye tüm katkılarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

İlaç preparatlarının güvenilirliğini, kalitesini etkileyen faktörlerin en önemlisi içerdiği safsızlık ve kirliliklerdir. Bu sebeple ilaç geliştirme süreçlerinden başlamak üzere, etken maddenin stabilitesi, tablet formunun içermiş olduğu safsızlıklar ve etken maddenin tablet formundan tayin edilmesi ilaç çalışmalarında önem arz etmektedir. Farmasötik moleküllerin kimyasal davranışı, ilaç ürününün güvenliğini ve etkinliğini etkilediği için önemlidir. Amerika İlaç Dairesi (FDA) ve Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH) kılavuzu, çeşitli çevresel faktörlerin etkisi altında zamanla bir ilaç maddesinin ve ilaç ürününün kalitesinin nasıl değiştiğini anlamak için stabilite testinin yapılmasını istemektedir (Brummer ve diğ. 2014). İlaç ürününün stres testleri asidik, bazik, oksidatif, termal ve UV ışık koşullarında yapılır (Singh ve Bakshi 2000).

Zorlanmış koşullar altında gerçekleştirilen bozunma çalışmaları; İlaç etken maddelerinin bozunma yollarının belirlenmesi ve tanınması, ilaç ile ilgili bozunma ürünlerini ayırt edebilmek ve ilaç dışı ürünlerden gelen safsızlıkları tanımlamak, bozunma ürünlerinin yapısını açıklamak, etken madde formülasyonunun stabilitesini belirlemek, bozunma mekanizmalarını ortaya koymak, geliştirilen bir yöntemden ilaç ürünlerine ilişkin nitelikli veriler almak, ilaç moleküllerinin kimyasal özelliklerini kavrayabilmek, daha kararlı formülasyonlar oluşturmak, uluslararası ICH standardına benzer bozunma profilleri üretmek, stabilite ile ilgili problemleri çözmek için yapılmaktadır (ICH 2003, Brummer 2011, Reynolds ve diğ. 2002).

Stabilite testlerini uygulamak için örnek hazırlama, yöntem oluşturma ve yöntem doğrulama adımlarının izlenmesi gerekmektedir. Örnek hazırlama, etken maddeyi içeren çözeltinin stres testlerine maruz bırakılmasını ifade etmektedir. Yöntem oluşturma ise etken maddenin kimyasal yapısının aydınlatılması, literatür araştırması, çözücü seçimi, sabit faz seçimi, dedektör seçimi, akış hızı ve kolon sıcaklığının belirlenmesi ve potansiyel parçalanma ürünlerinin belirlenmesini tanımlamaktadır. Yöntem doğrulama ise kesinlik, hassasiyet, seçicilik, gözlenebilme sınırı (LOD), kantitatif tayin sınırı (LOQ), doğrusal çalışma aralığı ve yöntem

sağlamlığı metot parametrelerinin validasyonunu ifade etmektedir (Pathade ve diğ. 2019).

İlaçlarda bulunan safsızlıklar etken madde kaynaklı, üretim, paketlenme ve depolama kaynaklı bulaşan safsızlık ve kirliliklerdir. İlaç formlarındaki safsızlık kaynakları, ilaç geliştirme prosesinden gelen safsızlıklar ve etken maddenin doğasından kaynaklı safsızlıklardır (Ahuja 2007). Etken madde kaynaklı safsızlıklar; organik safsızlıklar (parçalanma ürünleri), çözücü kaynaklı safsızlıklar ve anorganik safsızlıklar (elementel kirlilik) olarak sayılabilir.

Tablet formundaki ilaçlar hazırlanırken, hem formülasyonlarının oluşturulması esnasında hem de basım ve paketlenme süreçlerinde metal kirlilikler içerebilmektedirler. Bu kirliliklerin belirlenmesi ve analizi için; Uluslararası Uyum Konseyinin İnsan İçin İlaç Kullanımına Ait Teknik Gereklilikler Klavuzu (ICH Q3D(R2), 2022) yayımlanmıştır. ICH (Uluslararası Uyum Konseyi), ilaçlardaki 24 ağır (tehlikeli) metal içeriğini kontrol etmek için Q3D talimatını 2013 yılında ilk kez, 2022 yılı Nisan ayında da son revizyonunu yayınlamıştır. Bu talimat ilaçlardaki metal içeriğini kontrol etmek için, kirlilikleri sınıflara ayırmış ve hangi tip metallerin bakılmasının zorunlu, hangilerinin ilgili ülkedeki mevzuata göre isteğe bağlı olarak bakılacağını açıklamaktadır. Söz konusu 24 ağır metal, ilgili riske bağlı olarak Sınıf-1, Sınıf-2A, Sınıf-2B ve Sınıf-3 kategorilerinde sınıflandırmakta ve Cd, Pb, As, Hg, V, Co, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt, Li, Sb, Ba, Mo, Cu, Sn ve Cr elementlerinden oluşmaktadır.

Sınıf 1: As, Cd, Hg ve Pb elementleri, farmasötiklerin üretiminde sınırlı kullanımı olan veya hiç kullanılmayan toksik maddelerdir. İlaç ürünlerindeki mevcudiyetleri tipik olarak yaygın olarak kullanılan malzemelerden gelir. Bu dört element risk değerlendirmesi sırasında, tüm potansiyel temel safsızlık kaynakları ve uygulama yolları genelinde değerlendirmeyi gerektirir.

Sınıf 2: Bu sınıftaki elementler genellikle insan için toksik maddeler olarak kabul edilir. Sınıf 2 elementleri, ilaç ürünündeki göreceli oluşma olasılıklarına göre alt sınıf 2A ve 2B'ye ayrılmıştır. Sınıf 2A elementleri, ilaç ürününde nispeten yüksek meydana gelme olasılığına sahiptir ve bu nedenle, tüm potansiyel elementel safsızlık kaynakları ve uygulama yolları için risk değerlendirmesi gerektirir. 2A sınıfı

elementler şunlardır: Co, Ni ve V. Sınıf 2B'deki temel safsızlıklar ise Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se ve Tl içerir. Sınıf 2B elementleri, düşük bollukları ve diğer materyallerle birlikte izole edilme potansiyellerinin düşük olması nedeniyle ilaç ürününde daha az oluşma olasılığına sahiptir. Sonuç olarak, ilaç maddelerinin, yardımcı maddelerin veya ilaç ürününün diğer bileşenlerinin üretimi sırasında kasıtlı olarak eklenmedikleri sürece risk değerlendirmesinden çıkarılabilirler.

Sınıf 3: Bu sınıftaki elementler, oral uygulama yoluyla nispeten düşük toksisitelere sahiptir. Günlük izin verilen maruziyet dozunun (PDE) ($> 500 \mu\text{g} / \text{gün}$) ise, ancak inhalasyon (buğu, gaz veya ufak damlacıklar durumuna getirilmiş sıvıların solukla alınması) ve parenteral (damar yolu ile ilaç alma) yollar için risk değerlendirmesinde dikkate alınması gerekebilir. Bu sınıftaki elementler kasıtlı olarak eklenmedikçe, risk değerlendirmesi sırasında dikkate alınmalarına gerek yoktur. Parenteral ve inhalasyon ürünleri için, kullanıma özgü PDE nin $500 \mu\text{g}/\text{gün}$ 'ün üzerinde olmadığı sürece, bu temel safsızlıkların dahil edilme potansiyeli, risk değerlendirmesi sırasında değerlendirilmelidir. Bu sınıftaki elementler: Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb ve Sn (Wollein ve diğ. 2015, Holm ve diğ. 2016).

Nüfusun hızla artması hastalıkların ve doğal olarak da ilaca olan talebin artmasına yol açmıştır. İlaç araştırma-geliştirme, hastalıkların teşhisi, ilaç analizlerinin hızlı, ekonomik, güvenilir ve doğruluğu kanıtlanmış metotlar ile analiz edilmesi insan sağlığı açısından çok önemli bir konudur. Biyolojik, çevresel, gıda, ilaç ürünlerindeki eser miktardaki etken maddelerin kalitatif ve kantitatif analizlerinin hassas, doğru, hızlı ve ekonomik bir şekilde yapılması önemli bir konudur. İlaç etken maddesinin ise matriks örneklerden analitik cihazlar ile tayinde çoğu zaman ortamdan alınması (ayırma) ve deriştirilmesi (zenginleştirme) gerekmektedir. Bu işlemler için sıvı-sıvı ekstraksiyon, katı-sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler son yıllarda yerlerini organik çözücü tüketimini en aza indiren, örnek hazırlama basamağını basitleştiren, yüksek zenginleştirme oranı sağlayan ve otomasyona uygun mikroekstraksiyon yöntemlerine terk etmeye başlamışlardır. Mikroekstraksiyon yöntemleri geleneksel yöntemlere kıyasla analitler için yüksek zenginleştirme sağlamaktadır (Alver ve diğ. 2012, Yavuz ve diğ. 2006).

Karışık matriks ortamından analitlerin ayrılması ve önderiştirilmesi için katı faz mikroekstraksiyonu, manyetik katı faz mikroekstraksiyonu, sıvı faz

mikroekstraksiyonu, tek damla mikroekstraksiyonu, direkt daldırmalı tek damla mikroekstraksiyonu, tepede asılı tek damla mikroekstraksiyonu, sürekli akış mikroekstraksiyonu, oyuk fiber mikroekstraksiyonu, dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu, katılaştırılmış yüzen organik damla mikroekstraksiyonu, supramoleküler çözücü sıvı faz mikroekstraksiyonu, derin ötektik çözücü sıvı faz mikroekstraksiyonu, switchable çözücü sıvı faz mikroekstraksiyonu literatürde kullanılan mikroekstraksiyon yöntemleridir. Matriks içerisinde ayrılan ve önderiştirilen analitler, türüne uygun olarak seçilmiş olan; Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (AAS), İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS), Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) gibi analitik yöntemlerle tayin edilirler (Yılmaz 2016).

Tez çalışmasının ilk bölümünde, 2019 yılının aralık ayında Çin'in Wuhan eyaletinde başlamış olan koronavirüs (COVID19) hastalığının tedavisinde kullanılmış olan, Favipiravir etken maddesinin, ICH Q1A(R2) yöntemine göre stabilite testi ve ICH Q2(R1) yöntemine göre ise metot validasyonu yapılmıştır (ICH Q1A 2003, ICH Q2 2005). Etken madde asidik, bazik, oksidatif, termal ve UV ışık zorlanmış koşullara maruz bırakılıp, stabilitesi Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (UPLC-MS/MS) tekniği ile değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde, yeni bir önderiştirme ve ayırma tekniği olarak manyetik katı faz mikroekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu kapsamda öncelikle Fe₃O₄ manyetik nano parçacık (MNP) sentezlenmiş ve 8-hidroksikinolin ile kaplanmıştır (Fe₃O₄@8-HQ MNPs). Kaplanan malzeme Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), Termogravimetrik Analiz (TGA), Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskopu (FESEM) ve Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM) teknikleriyle karakterize edilmiştir. Önderiştirilen, Pb(II), Zn(II), Cu(II), Co(II) iyonlarının tayini için; Mikro Enjeksiyon Örneklemeli Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (MIS-FAAS) kullanılmıştır. Yöntemde pH, elüent türü, elüent hacmi, elüent derişimi, adsorpsiyon ve desorpsiyon süreleri, adsorban miktarı, yabancı iyon ve adsorpsiyon kapasitesi analitik parametreleri optimize edilmiştir. Metot validasyonu QCP-QCS-1 sertifikalı referans malzeme (CRM) ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem ilaç örneklerine, atık su numunelerine ve kompozit malzeme

içeriklerinin tayinine uygulanmıştır. CRM çözeltisinin MIS-FAAS ile elde edilen sonuçları ICP-MS tekniği ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve sonuçların uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Tez çalışmasının üçüncü bölümünde, yeni bir mikroekstraksiyon yöntemi olarak, Hidrofobik Derin Öteki Çözücü (HDÖÇ) mikroekstraksiyon yöntemi kullanılarak, yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan, santral etkili antihipertansifler ilaç grubunda bulunan, Metildopa ilaç etken maddesinin HPLC-UV tekniği ile tayini çalışması yürütülmüştür. Bu kapsamda ilk olarak ilaç etken maddesinin tayini için HPLC-UV cihazında metot validasyonu yapılmıştır. Sonrasında ise HDÖÇ mikroekstraksiyon yönteminde; HDÖÇ türü, pH, mol oranı, tuz etkisi, vorteks süresi, santrifüj süresi, HDÖÇ hacmi, numune hacmi parametreleri optimize edilmiştir.

2. FAVİPİRAVİR İLAÇ ETKEN MADDESİNİN UPLC-MS/MS TEKNİĞİ İLE STABİLİTESİNİN BELİRLENMESİ

2.1 Çalışmanın Amacı

İlaç etken maddeleri üretim esnasında, paketlenme koşullarında ve rafta çevresel etkenlere maruz kalmaktadır. Bu çevresel etkenler hem ilacın kendisinde hem de etken madde üzerinde bazı safsızlıklar ve bozunma ürünleri meydana getirebilmektedir. Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH) ve Amerikan İlaç Dairesi (FDA) çevresel etmenlere maruz kalan ilaç preparatlarının kalite kontrolü için bozunurluk testlerinin yapılmasını istemektedir. Etken madde asidik, bazik, oksidatif, termal ve UV ışık zorlanmış koşullarına maruz bırakılarak stabilite değerlendirilmesi yapılır (Brummer ve diğ. 2014, Singh ve Bakshi 2000).

Analitik yöntemler başlangıçta, temel metodolojik anlayış ve önceki deneyimlerin bir kombinasyonuna dayalı olarak geliştirilir. İlk çalışmalardan elde edilen deneysel veriler, yöntemin daha fazla geliştirilmesini yönlendirmek için kullanılabilir. Bir ilaç etken maddesinin safsızlık kontrolü ve stabilitesinin değerlendirilmesinde, uluslararası belirlenmiş olan birtakım kabul kriterlerine karşı test etmek için analitik yöntem geliştirilmektedir. Yeni bir analitik yöntemin geliştirilmesinin ilk aşamalarında, analitik enstrüman ve metodoloji, analitik yöntemin amacına ve kapsamına göre seçilmelidir. Yöntem geliştirme sırasında ilk olarak değerlendirilebilecek parametreler, seçicilik, doğrusalık, gözlenebilme sınırı (LOD) ve kantitatif tayin sınırı (LOQ), doğrusal çalışma aralığı, doğruluk ve kesinliktir.

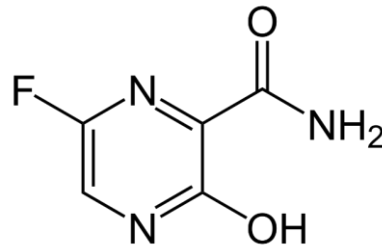
Analitik yöntem validasyonu, bir analitik yöntemin amaçlanan amacına uygun olduğunu gösterme sürecidir. Analitik yöntemlerin metodolojisi ve amacı, validasyon çalışmalarına başlamadan önce açıkça tanımlanmalı ve anlaşılmalıdır. Bu anlayış, bilimsel temelli yöntem geliştirme ve optimizasyon çalışmalarından elde edilmektedir. Validasyon verileri, her bir validasyon özelliğinin metodolojisinin açıklaması ve önceden belirlenmiş ve gerekçeli kabul kriterleri ile mevcut iyi üretim uygulamalarını takiben, destekleyici tarafından onaylanan bir protokol kapsamında, nitelikli

enstrüman kullanılarak üretilmelidir. İlgili matrislerdeki hem ilaç maddesi hem de ürün analitleri veya analit karışımları için protokoller geliştirilmeli ve yürütülmelidir. Validasyon süreci; seçicilik, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve yeniden üretilebilirlik), doğrusal çalışma aralığı, kantitatif tayin sınırı, gözlenebilme sınırı parametrelerinin belirlenip değerlendirilmesinden oluşmaktadır (FDA 2015).

İlaç üretim prosesi, paketlenme ve depolama şartları, ilaç uygulama yöntemlerinin etken maddenin stabilitesine olan etkilerinden dolayı tez çalışmasında favipiravirin stabilite değerlendirmesi yapılmıştır.

2.2 Favipiravir İlaç Etken Maddesinin Stabilitesinin Değerlendirilmesi

Favipiravir; 2019 yılının aralık ayında Çin’de ortaya çıkan SARS-COV-2 virüsünün neden olduğu, COVID-19 hastalığının tedavisinde kullanılan RNA virüslerini inhibe eden antiviral bir ilaçtır. Favipiravirin, kimyasal formülü $C_5H_4FN_3O_2$, IUPAC ismi 6-floro-3-hidroksipirazin-2-karboksamid, molekül ağırlığı 157.1 g mol^{-1} olup molekül yapısı Şekil 2.1’de gösterilmiştir (Seneviratne ve diğ. 2020). Favipiravir katı dozaj formunda, tablet şeklinde kullanılmaktadır. Enteral (tüple) olarak beslenen hastalarda favipiravir kullanımında ise ilaç etkisinde azalma, toksik etkileşimler ve stabilitesinin bozulması gibi sorunlarla karşılaşmaktadır (Demirkan ve diğ. 2016, Sürmelioğlu ve diğ. 2020).



Şekil 2.1: Favipiravir molekül yapısı

Favipiravirin stabilite değerlendirilmesi ile ilgili literatürde yer alan bazı çalışmalar aşağıda verilmiştir.

2.2.1 Favipiravir Etken Maddesinin Stabilit e alışmaları İle İlgili Literatür Bilgileri

Patel ve arkadaşları, favipiravirin bozunma ürünlerinin belirlenmesinde, ultra performanslı sıvı kromatografisi elektro sprey iyonlaştırılmal  kütle spektrometresi (UPLC-MS/MS) cihazı kullanmış ve parçalanma ürünlerini izole ederek NMR tekniğiyle tanımlamıştır. Çalışmada Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4.6 mm, 5  m) kolonu, mobil faz olarak 5 mM fosfat tamponu (pH 3.5) içeren metanol-su (75:25 v/v) kullanmışlardır. UPLC sisteminde 1.0 mL/dk akış hızı ve 322 nm dalga boyunda DAD dedektörü kullanılmıştır. Favipiravir, alkali stres bozunma koşulunda önemli bir oranda bozunmaya uğramıştır. Yöntem validasyonu, ICH Q2 (R1) kılavuz gerekliliklerine göre gerçekleştirilmiştir (Patel ve diğ. 2022).

Vemuri ve arkadaşları, favipiravirin film kaplı tabletlerde bulunan bozunma ürünlerinin belirlenmesi için seçici, doğru, doğrusal, sağlam, basit ve kararlılık gösteren bir HPLC yöntemi geliştirmiş ve doğrulamıştır. Tüm safsızlıkların ayrılması için AQ-C18 (250  4,6 mm, 5  m) kolon ve 98:2 (v/v) oranında KH₂PO₄ tampon (pH 2.5   0.05) ve asetonitril 50:50 (v/v) mobil faz kullanılmıştır. Kromatografik koşullar optimize edilmiş ve akış hızı 0.7 mL/dk, dalga boyu 210 nm; enjeksiyon hacmi 20  L ve kolon sıcaklığı 33  C olarak belirlenmiştir. Parçalanma  r nleri ve mekanizma ise LC-MS tekniği ile belirlenmiştir (Vemuri ve diğ. 2022).

Marzouk ve arkadaşları, favipiravir etken maddesinin tayini için HPLC metodu oluşturarak, ICH yöntemine göre parçalanma ürünlerini ve mekanizmasını kütle spektrometresiyle tayin etmiştir. HPLC yönteminde, Zorbax C18 kolon, 30  C sıcaklık, %0.1 (w/v) heptan sülfonik asit sodyum tuzu-metanol-asetonitril (v/v 62:28:10) mobil faz sistemi kullanmıştır. Akış hızı 1.0 mL/dk. ve 321 nm dalga boyunda DAD dedektör kullanmıştır ve yöntem gerçek örneklere uygulanmıştır (Marzouk ve diğ. 2022).

Abdallah ve arkadaşları, favipiravir etken maddesinin ICH yöntemine göre zorlanmış koşullar altında stabilit  testini gerçekleştirmiştir. Sabit faz olarak Thermo Fischer Hypersil C18 (150 4.6 mm, 5  m) kolon, mobil faz olarak asetonitril- pH 2.5 tamponlanmış su (50:50, v/v) kullanmıştır. 332 nm dalga boyunda HPLC parametrelerini belirlemiştir. Parçalanma ürünlerini flash kromatografi tekniği ile

izolasyonunu sağlayıp, sıvı kromatografisi kütle spektrometresi/nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (LC-MS/NMR) tekniği ile karakterize edip, bozunma mekanizmasını önermiştir (Abdallah ve diğ. 2022).

2.3 Deneysel Bölüm

2.3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Tez çalışmasında tüm kimyasallar analitik saflıkta kullanılmış olup, favipiravir etken maddesi ve tablet formu Tobio Pharmaceuticals (İstanbul, Türkiye) den satın alınmıştır. Hidroklorik asit (37%, Sigma-Aldrich), sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich), hidrojen peroksit (30%, Sigma-Aldrich), formik asit (99%, Sigma-Aldrich) analitik saflıktadır. Metanol kromatografik saflıkta ($\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich) olup, kullanılan ultra saf suyun iletkenliği $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ dir. Direct-Q 3 UV saf su cihazı (Merck-Millipore), UV-Visible spektrofotometre (Lambda-35, Perkin Elmer), UPLC-DAD (1200 Infinity, Agilent), UPLC-MS/MS (6460, Agilent), Etüv (UN55, Memmert), Ultrasonik su banyosu (Bandelin) tez çalışmasında kullanılan cihazlardır.

2.3.2 Standart Stok Favipiravir Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada, konsantrasyonu 1000 mg L^{-1} olan stok favipiravir standart çözeltisi hazırlandı. Bunun için, 100 mg favipiravir ilaç etken maddesi tartıldı ve 100 mL'lik bir balon jojeye aktarılmadan önce 20 mL ultra saf su içerisinde ultrasonik su banyosunda çözüldü. Devamında stok çözeltinin hacmi ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Stok çözelti, $0.45 \mu\text{m}$ 'lik bir filtreden süzüldü. $1-10 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığındaki çözeltiler, bu stok çözeltinin ultra saf su ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

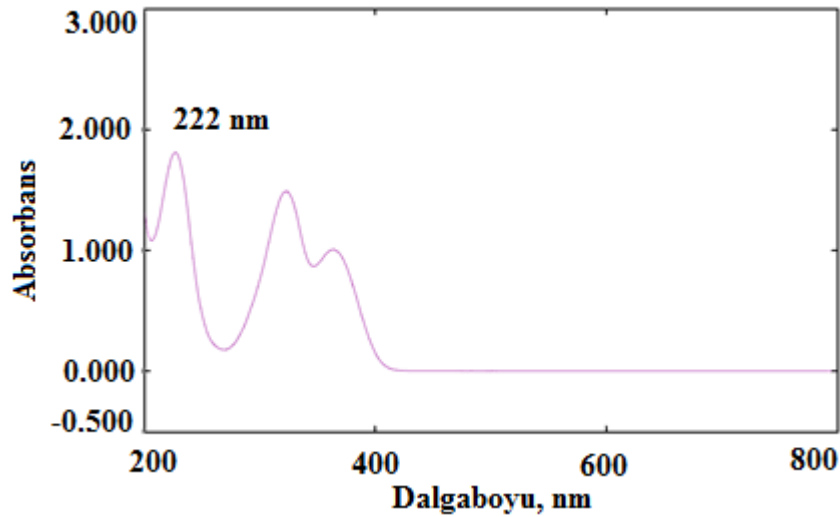
2.3.3 Tablet Çözeltisinin Hazırlanması

Favipiravir etken maddesini içeren, Favira isimli bir ilaçtan, (200 mg) 5 adet tablet 0,280 g olarak tartıldı. Tabletler havan içerisinde ezilerek toz haline getirildi.

Toz haline getirilen tabletlerden 200 mg alındı ve 100 mL balon jojeye konularak ultra saf su ile tamamlandı. Çözelti el ile çalkalama ve ultrasonik su banyosu yardımıyla karıştırılıp 2000 mg L^{-1} konsantrasyonunda çözelti elde edildi. Sonrasında çözelti $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ filtreden süzüldü.

2.3.4 Favipiravirin Maksimum Absorbans Yaptığı Dalga Boyunun (λ_{max}) Belirlenmesi

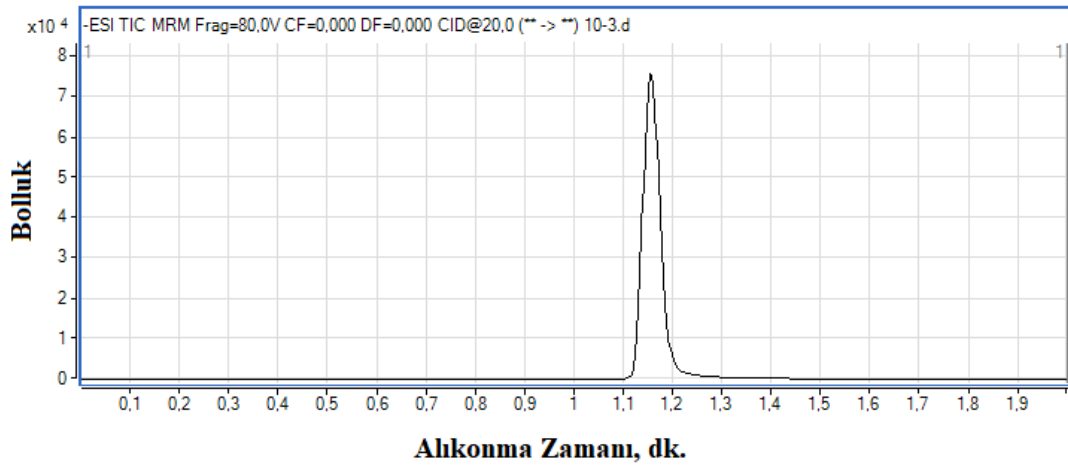
Konsantrasyonu $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ olan standart çözelti kullanılarak, UV spektrofotometresi ile 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapıldı. Şekil 2.2’de görüldüğü gibi favipiravir UV bölgede absorpsiyon yapmakta ve 200-400 nm arası üç bantla karakterize edilmektedir. Favipiravirin 222 ve 323 nm de gözlenen maksimum absorpsiyonun, favipiravir molekülündeki $-\text{C}=\text{N}-$, $-\text{C}=\text{O}-$, $-\text{C}=\text{C}-$ çift bağların varlığından dolayı $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine karşılık geldiği; en sağda gözlenen daha zayıf absorpsiyonun ise $n \rightarrow \pi^*$ geçişlerine karşılık gelen ortaklanmamış elektron çiftine sahip heteroatomların (F, O, N) varlığının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Hassas ve duyarlı bir analiz sonucu (düşük gözlenebilirlik sınırı) elde edebilmek için λ_{max} 222 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 2.2: Favipiravire ait UV spektrumu

2.3.5 Kromatografik Şartlar

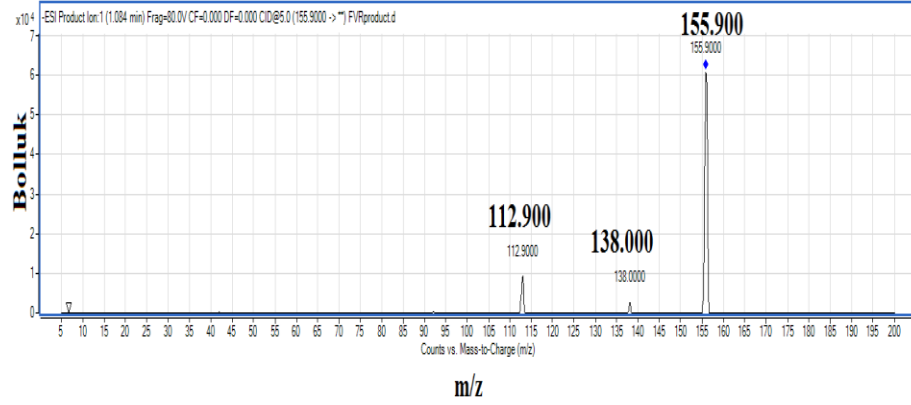
Kromatografik analizler ultra performanslı sıvı kromatografi cihazında 222 nm dalga boyunda DAD dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Poroshell 120 EC-C18 (50×4.6 mm, 2.7 µm) kolon sabit faz olarak kullanılmıştır. %0.1 formik asit içeren H₂O:metanol (80:20, v/v) mobil faz olarak seçilmiştir. Akış hızı 0.8 mL dk⁻¹, kolon sıcaklığı ise 40 °C olarak belirlenmiştir. Bu şartlar altında alıkonma zamanı 1.155 dakika olarak belirlenmiş olup, toplam analiz süresi ise 2 dakikadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Favipiravire ait UPLC kromatogramı (10 mg L⁻¹, 222 nm)

2.3.6 Kütle Spektroskopi Şartları

UPLC şartları belirlenip, ideal pik elde edildikten sonra kütle spektrometresi (MS) analizleri için UPLC-MS/MS sıvı kromatografi-kütle spektrometre cihazı parametreleri optimize edilmiştir. Analit iyonları elektrosprey jet stream (ESI) iyonlaştırma tekniği ile iyonlaştırıldı. Pozitif ve negatif iyonlaştırma teknikleri ile yapılan denemeler sonucunda favipiravir için negatif iyon mod iyonlaştırmanın kullanılmasına karar verildi. Fragmentor voltaj 80 V, parçalanma enerjisi 20 eV, kapiler voltaj 3.5 kV, desolvasyon sıcaklığı 300°C, iyonlaştırma kaynağı 400°C, sürükleyici azot gazı akış hızı 11 L saat⁻¹, olarak MS parametreleri belirlendi. Favipiravir temel spekturum [M-1] 155.9, tanımlayıcı temel parçalanma iyonu (daughter ion) 112.9 olarak tespit edildi (Şekil 2.4).



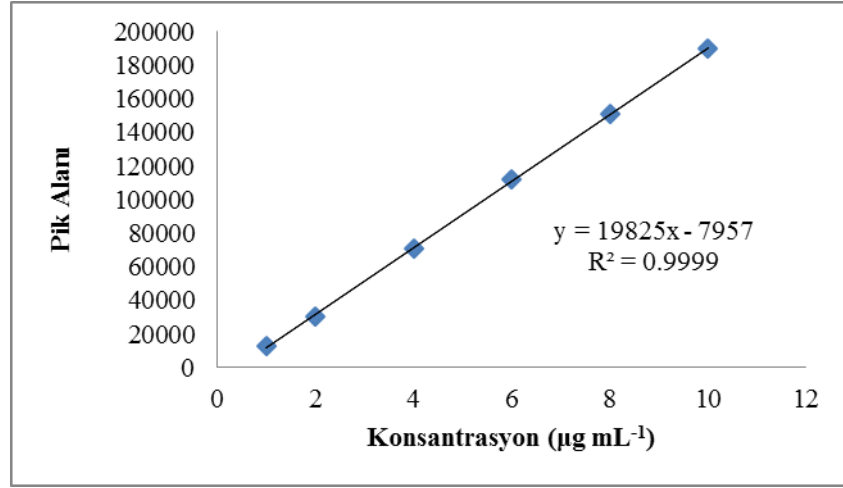
Şekil 2.4: Favipiravire ait kütle spektrumu

2.3.7 Metot Validasyonu

Favipiravir etken maddesinin yöntem validasyonu ICH Q2 (R1) yöntemine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda kantitatif sonuçların elde edilmesinde yöntem doğrulama çalışmaları yapılmıştır. Seçicilik, doğrusalılık, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı, kesinlik, doğruluk, doğrusal çalışma aralığı ve yöntem sağlamlığı, sistem uygunluk kriterleri validasyon parametreleri olarak araştırılmıştır.

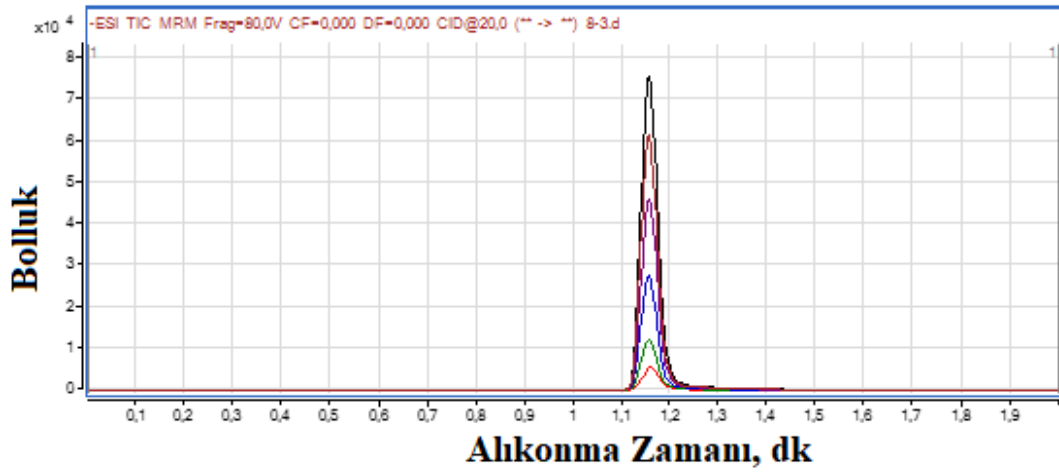
2.3.7.1 Yöntemin Doğrusal Çalışma Aralığı

Favipiravirin kalibrasyon grafiği için, kalibrasyon çözeltileri $1-10 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında olacak şekilde, standart stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanmıştır. Daha az standart referans malzeme kullanmak ve düşük konsantrasyonlarda daha hassas ölçüm yapabilmek amacıyla kalibrasyon grafiği doğrusal aralığı $1-10 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında oluşturulmuştur. Her bir kalibrasyon çözeltisi sisteme 3 kez enjekte edilmiştir. Kalibrasyon grafiği, standart çözelti konsantrasyonlarının pik alanına karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulmuştur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Favipiravire ait kalibrasyon grafiği

Şekil 2.6 daki kromatogramda ise farklı konsantrasyonlardaki (1, 2, 4, 6, 8, 10 µg mL⁻¹) favipiravir kalibrasyon çözeltilerine ait piklerin üst üste çakıştırılmış şekli gösterilmiştir.



Şekil 2.6: Üst üste çakıştırılmış kromatogram (1, 2, 4, 6, 8, 10 µg mL⁻¹)

Yöntemin doğrusallığı lineer regresyon analizi ile test edilmiştir. Regresyonun korelasyon katsayısı, kesişim noktası ve eğimi bulmak için en küçük kareler yaklaşımı kullanılmıştır. Ortalama pik alanı Y (n=3) ve konsantrasyon X arasındaki ilişki, $Y = a + bX$ denklemiyle açıklandığı gibi doğrusal olarak bulundu. Tablo 2.1'de gösterildiği gibi, eğim, kesişim ve korelasyon katsayısı (R^2) sırasıyla 19.825, -7957 ve 0.9999 olarak kalibrasyon eğrisinden hesaplandı. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

LOD veya LOQ = $\kappa SDa/b$ (LOD için $\kappa= 3$ ve LOQ için $\kappa= 10$)
SDa kesmenin standart sapmasını ve b eğimi temsil etmektedir.

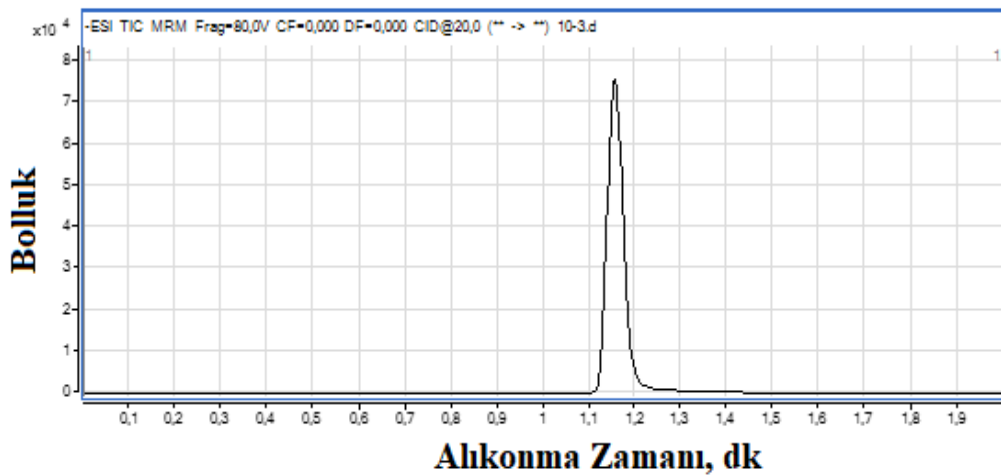
LOD: $0.30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve LOQ: $0.80 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirlendi.

Tablo 2.1: Favipiravire ait kalibrasyon grafiği istatistiksel analiz sonuçları

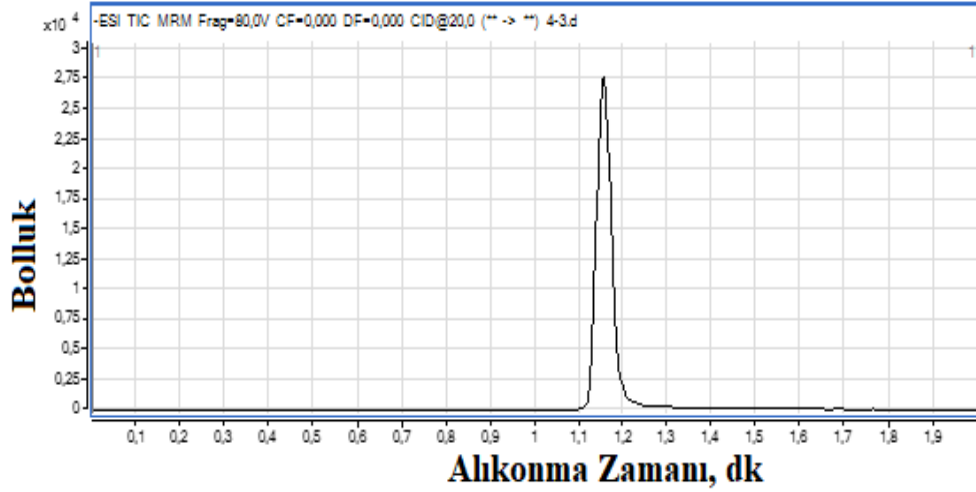
Parametre	Sonuç
Doğrusal çalışma aralığı, $\mu\text{g mL}^{-1}$	1 - 10
Eğim	19.825
Eğimin standart sapması	0.35
Kesişim	-7957
Kesimin standart sapması	1662.99
Korelasyon katsayısı	0.9999
LOD, $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.30
LOQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.80

2.3.7.2 Yöntemin Seçiciliği

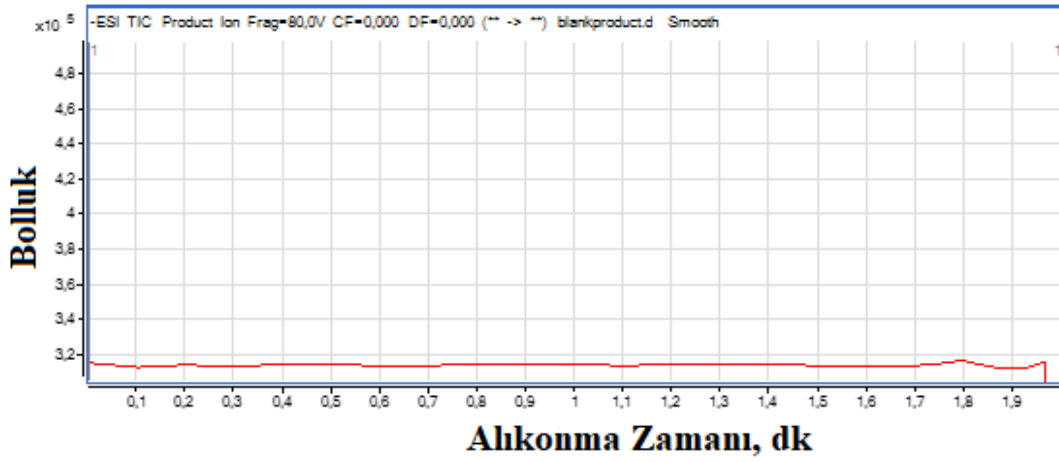
Yöntemin seçiciliği; yöntemdeki piklerin birbirinden ayrılabilmesi, saf piklerin elde edilebilmesi, kör çözelti ve matriks ortamından kirlilik piki gelmemesini ifade eder. Çalışmada yöntemin seçiciliğini belirlemek için favipiravir standart çözelti, örnek çözeltisi ve kör çözelti sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır (Şekil 2.7, 2.8 ve 2.9).



Şekil 2.7: Standart favipiravir çözeltisine ait kromatogram ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)



Şekil 2.8: Favipiravir içeren örnek çözeltiye ait kromatogram ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$)



Şekil 2.9: Kör çözeltiye ait kromatogram

Şekil 2.7-2.9 ve 2.10 da gösterilen kromatogramlar incelendiğinde, mobil faz, çözücü ve matriks kaynaklı bozucu girişim yapabilecek herhangi bir kirliliğe ait pik gözlenmemiştir. Çalışılan şartlarda yöntemin favipiravir için seçici olduğu belirlenmiştir.

2.3.7.3 Yöntemin Kesinliği

Yöntemin kesinliği pik alanlarının tekrarlanabilirliği, standart sapması ve bağıl standart sapması değerlendirilerek kontrol edilmiştir. Bunun için aynı ve farklı günlerde konsantrasyonları $1, 4$ ve $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan standart favipiravir çözeltileri beş

kez UPLC-MS/MS cihazına enjekte edildi. Çalışılan tüm konsantrasyonlarda pik alanı için bağıl standart sapma (RSD) değerleri %1'den düşük olarak bulundu (Tablo 2.2). Elde edilen sonuçlar yöntemin kesinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 2.2: Gün içi ve Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları (Favipiravir konsantrasyonu: 1, 4, 10 µg mL⁻¹)

Enjeksiyon	Gün İçi Kesinlik	Günler Arası Kesinlik
Konsantrasyon: 1 µg mL ⁻¹	Pik Alanı	Pik Alanı
1	12541	12595
2	12553	12602
3	12534	12517
4	12533	12593
5	12529	12475
Ortalama pik alanı	12538	12556
Pik alanlarının standart sapması	9.43	57.20
% Bağıl standart sapma	0.08	0.46
Konsantrasyon: 4 µg mL ⁻¹		
1	71070	71071
2	71028	71083
3	71052	71014
4	71109	71023
5	71066	70089
Ortalama pik alanı	71065	70856
Pik alanlarının standart sapması	29.58	429.80
% Bağıl standart sapma	0.04	0.61
Konsantrasyon: 10 µg mL ⁻¹		
1	189843	189511
2	189873	189983
3	189822	189594
4	189873	189974
5	189644	189587
Ortalama pik alanı	189811	189730
Pik alanlarının standart sapması	95.81	229.37
% Bağıl standart sapma	0.05	0.12

2.3.7.4 Yöntemin Doğruluğu

Yöntem doğruluğu analiz sonuçlarının gerçek değere olan yakınlığını ifade eder. Doğruluk mutlak hata ve bağıl hata ile ifade edilir. Aynı zamanda yöntem doğruluğu numuneye eklenen analitin, ortamdan ne ölçüde geri kazanıldığı ile yüzde

geri kazanımla da ifade edilebilmektedir. Analiz edilen tablet numunesine ($5\mu\text{g mL}^{-1}$) bilinen miktarda (4, 5 ve $6\mu\text{g mL}^{-1}$) standart eklendi. Örneklerin analizinden sonra favipiravir için geri kazanım miktarı hesaplanmış ve elde edilen geri kazanım değerleri. Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3: Yöntemin doğruluğu

Eklenen Konsantrasyon, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Bulunan Konsantrasyon, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Geri Kazanım, %	Bağıl Hata, %	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma, %
4	3.97	99.25			
4	3.95	98.75	-1.50	0.901	0.902
4	3.90	97.5			
5	5.01	100.20			
5	4.98	99.60	-0.40	0.503	0.504
5	4.96	99.20			
6	5.89	98.20			
6	5.93	98.80	-0.01	0.585	0.587
6	5.96	99.30			

Tablo 2.3'te görüldüğü gibi, tüm analizlerde bağıl standart sapma değerleri % 1'nin altında bulundu. Yüzde bağıl hata her üç ekleme düzeyinde % 2'nin altında belirlendi. Sonuç olarak, yöntemin farmasötik formülasyonlardaki girişimlerden etkilenmediği belirlenerek, yöntem doğruluğu kontrol edildi.

2.3.7.5 Yöntemin Sağlamlığı

Yöntemin sağlamlığı; parametrelerdeki planlı değişimlere, yöntemin verdiği cevabın duyarlılığıdır. Çalışmada, analitik yöntem parametreleri olan mobil faz akış hızı, mobil faz bileşimi ve kolon sıcaklığındaki küçük değişimlerin analit alıkonma süreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Parametrelerde değişiklikler yapılarak, analitin alıkonma süresinin RSD değerleri hesaplanmıştır (Tablo 2.4) ve alıkonma süresi üzerindeki etkisi $\text{RSD} < \% 1$ olarak bulunmuştur. Parametrelerdeki küçük değişikliklerin favipiravirin alıkonma süresi üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 2. 4: Sağlamlık çalışması

Şartlar	Değişim	Alıkonma Süresi, dk.	Bağıl Standart Sapma, %
Mobil faz akış hızı (0.8 mL dk. ⁻¹)	0.9 mL dk. ⁻¹ 0.7 mL dk. ⁻¹	1.03 1.22	0.97 0.62
Mobil faz metanol bileşimi (20 %)	19 % 21 %	1.24 1.01	0.48 0.62
Kolon sıcaklığı (40 °C)	38 °C 42 °C	1.22 1.06	0.67 0.75

2.3.7.6 Yöntemin Uygunluğu

Yöntemin performans değerlendirmesinde sistemin uygunluk parametreleri değerlendirilmiştir. Kuyruklanma faktörü 1.1, alıkonma süresi 1.155 dakika ve teorik tabaka sayısı 5293 bulundu. Bulunan bu değerler ICH ve FDA'nın limitleri olan kuyruklanma faktörü<2 ve teorik tabaka sayısı>2000 değerleri ile karşılaştırıldığında kabul edilir düzeydedir.

2.3.8 Standart Çözeltilerin Stabilitesi

24 saatlik bir süre boyunca, referans standart çözeltilerin kararlılığı incelenmiştir. Bu amaçla UPLC sistemine 8 saatlik periyotlarla standart çözeltiler enjekte edilmiş, alıkonma süreleri ve pik alanları kaydedilmiştir. Standart çözeltilerdeki ilaç etken maddenin konsantrasyonunda ve alıkonma zamanında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Tablo 2.5'teki stabilite çalışmasının sonuçları incelendiğinde, yüzde bağıl standart sapma değerleri pik alanı için % 1'den düşük olarak belirlenerek, standart çözeltilerin stabilitesi gösterildi.

Tablo 2.5: Standart çözeltilerin stabilitesi

Süre, saat	Pik Alanı	Standart Sapma	Bağlı Standart Sapma, %	Alıkonma Zamanı, dk.	Standart Sapma	Bağlı Standart Sapma, %
8	190583	1.69	0.0009	1.155	0.0012	0.108
	190584			1.156		
	190587			1.158		
16	190588	2.05	0.0011	1.154	0.0008	0.071
	190583			1.153		
	190586			1.155		
24	190582	1.63	0.0008	1.156	0.0005	0.041
	190586			1.155		
	190584			1.155		

2.3.9 Etken Madde Stabilitesinin Değerlendirilmesi

Favipiravir ilaç etken maddesinin stabilitesi yumuşak ve sert zorlanmış koşullar uygulanarak değerlendirilmiştir. Zorlanmış koşullar altında alınan kromatogram için pik alanı değişimi; molekülün yapısındaki bir değişikliği değil ancak bir miktar veya tamamının bozunduğunu veya kayıp yaşandığını ifade eder. Bozundurma çalışmaları; asidik, bazik, oksidatif, UV ışığı ve termal koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyonu $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan standart favipiravir çözeltisi, konsantrasyonu $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan stok standart çözeltisinin 1-0.1 N HCl, 1-0.1 N NaOH, %3-%30 H_2O_2 çözeltileri ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. UV ışığı ve termal stres çalışmalarında, stok standart çözelti ultra saf su ile seyreltildi. Asidik, bazik ve oksidatif çalışmalarda hazırlanan standart çözelti 80°C 'de 30 dakika etüvde bekletildi. UV ışığı altında bozunurluk çalışması, standart çözeltinin oda sıcaklığında, 254 nm dalga boyunda, UV ışığına 6 ve 24 saat maruz bırakılmasıyla gerçekleştirildi. Termal bozunma testinde standart çözelti 100°C 'de etüvde 6 ve 24 saat bekletildi.

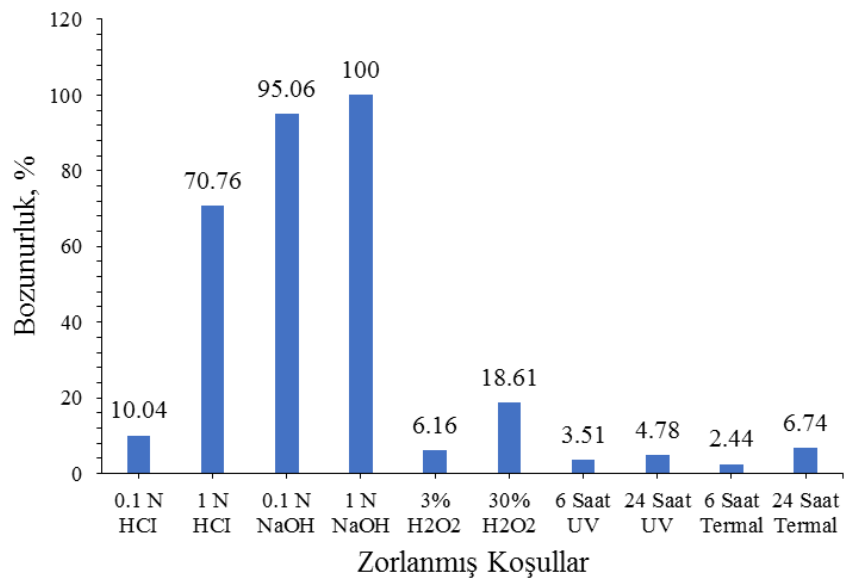
Parçalanma ürünleri kütle spektrometresi ile tespit edilirken, % bozunurluk ise standart madde kromatogramı pik alanı değerlendirilerek yapılmıştır. Parçalanma ürünleri iyonlaşma odasında ara ürün olarak belirlenmiştir ve izole edilememişlerdir. Kütle spektrumundan bozunma ürünleri belirlenmiştir. Bozunma çalışması sonucu

elde edilen parçalanma ürünlerinin kütle/yük değerleri Tablo 2.6'da verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi bazik koşullar altında, favipiravirin yapısında bulunan amid grubu hidroliz olarak karboksilik asite dönüşmüş, bunun yanında molekülde dekarboksilasyon ve flor grubunun yerdeğiştirme reaksiyonu vermesi sonucunda, yapı tamamen bozunmuştur.

Tablo 2.6: Favipiravir parçalanma ürünleri

Zorlanmış Koşullar	Parçalanma Ürünleri m/z
0.1 N HCl	125.0-112.9
1 N HCl	125.0-110.9-96.9-78.9
0.1 N NaOH	146.9-124.8-112.9-93.0-78.9
1 N NaOH	146.9-125.0-112.9-102.9-79.0-45.0
3% H ₂ O ₂	130.9-112.9
30% H ₂ O ₂	131.0-124.9-112.9-96.9-86.9
6 Saat UV	124.9-112.9-96.9
24 Saat UV	125.0-113.0-96.9
6 Saat Termal	113.0
24 Saat Termal	113.0

Zorlanmış koşullar altındaki pik alanlarının değerlendirilmesi ile elde edilen çalışma sonuçları ise Şekil 2.10'da verilmektedir. Favipiravir bazik ortamda tamamen bozunurken, asidik ve oksidatif koşullarda %10 üzerinde bozunma göstermiştir; UV ışık ve termal şartlar altında ise stabilitesini koruduğu görülmüştür.



Şekil 2.10: Zorlanmış koşullar altında etken maddenin stabilitesi

2.3.10 Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

Geliştirilen ve validasyonu yapılan yöntem, piyasada favipiravir etken maddesini içeren tablet formundaki ilaçlara uygulanmıştır. Bu kapsamda 5 adet tablet 100 mL balon jodede su ile çözülerek, yöntemin doğrusal aralığına girecek şekilde seyreltilip 5'er tekrar analizi yapılmış ve sonuçlar Tablo 2.7 de verilmiştir.

Tablo 2.7: Yöntemin tablet formdaki piyasa preparatlarına uygulaması

	Etken madde miktarı, mg	Yöntemle bulunan miktar, mg	Bağlı hata, %	Geri kazanım, %	Bağlı standart sapma, %
Favira tablet	200	200.35	0.18	100.18 ± 2.05	1.02

Tablo 2.7 de belirtilen analiz sonuçları incelendiğinde, etken madde içeriğinin prospektüs içeriği ile uyumlu olduğu görülmüştür (% bağlı hata: 0.18). Bu kapsamda metot piyasa preparatlarına da uygulanabilir bir yöntem olarak görünmektedir.

2.3.11 Yöntemin Literatür ile Karşılaştırılması

İlaç etken maddelerinin risk değerlendirilmesi, HPLC çalışmaları, stabilite değerlendirme ve parçalanma ürünlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar literatürde yoğun olarak ve hızlı bir şekilde çalışılıp üretilmektedir (Tablo 2.8). Yöntem literatürle karşılaştırıldığında, düşük alıkonma zamanı, düşük gözlenebilme sınırı ve tayin sınırına sahip bir yöntem olarak, 2021 yılı içerisinde tamamlanıp literatüre giren ilk çalışmalar arasında yer almaktadır.

Tablo 2.8: Favipiravir etken maddesi stabilite çalışmasının literatür ile karşılaştırılması

Teknik	Alıkonma Zamanı, dk.	Dalga boyu, nm	Kütle, m/z	LOD-LOQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Kaynak
UPLC-MS/MS	3	322	157.3	0.15-0.31	Patel ve diğ. 2022
LC-MS/MS	23.4	210	159	0.027-0.09	Vemuri ve diğ. 2022
LC-MS/MS	3.53	321	155.7	1.02-3.10	Marzouk ve diğ. 2022
LC-MS/MS	3	332	157.1	0.037- 0.122	Abdallah ve diğ. 2022
UPLC-MS/MS	1.155	222	155.9	0.30-0.80	Bu çalışma 2021

3. 8-HİDROKSİKİNOLİN KAPLI MANYETİK NANOPARÇACIK KULLANILARAK, Co(II), Cu(II), Pb(II) VE Zn(II) ESER METAL İYONLARININ ÖNDERİŞTİRİLMESİ VE MİKRO ENJEKSİYON ÖRNEKLEMELİ ALEVİLİ ATOMİK ABSORBSİYON SPEKTROMETRESİYLE TAYİNLERİ

3.1 Çalışmanın Amacı ve Genel Bilgi

Ağır metaller düşük konsantrasyonda bile insan sağlığı açısından zararlı etki gösterebilmektedirler. İlaç preparatlarında ağır metal içeriklerin tayini risk değerlendirmesi açısından önem taşımaktadır. Metal kirlilikleri ise ilaçlara üretim aşamasında çeşitli etmenlerden bulaşabilmektedir. İnsan Kullanımına Yönelik Farmasötikler için Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Uluslararası Konseyi (ICH), yayımladığı Q3D talimatında ağır metalleri çeşitli sınıflara ayırıp, limitleri belirlemiştir (Pinheiro ve diğ. 2019, Mattiazzia ve diğ. 2019). Karışık matriksli sistemlerde yapılan analizlerde genellikle düşük doğruluk, seçicilik ve duyarlılıkta sonuçlar alınır. Bu sebepten dolayı analitin matriks etkisinden kurtarılması (ayrılma) ve deriştirilmesi (zenginleştirme) için bir ön saflaştırma ve ayırma işleminin gerçekleştirilmesi zorunludur (Khan ve diğ. 2013). Çalışmada ilaç örneklerindeki Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) eser metal iyonlarının 8-hidroksikinolin kaplı Fe₃O₄ manyetik nanotaneçiklerin adsorban olarak kullanılacağı yeni bir manyetik katı faz ekstraksiyonu yöntemi ile önderiştirilmesi ve alevli atomik absorpsiyon spektrometresi (FAAS) ile tayinleri amaçlanmıştır.

Ağır metal analizleri grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrometresi (GAAS), alevli atomik absorpsiyon spektrometresi (FAAS), indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS), indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) gibi çeşitli analitik tekniklerle yapılmaktadır (Dolan ve diğ. 2003, Lewen ve diğ. 2004, Wang ve diğ. 2000, Zachariadis ve diğ. 2007, Zachariadis ve diğ. 2002, Orisakwe ve diğ. 2009, Lasztity ve diğ. 2002). ICP-MS tekniği numunelerdeki analitleri çok düşük limitlerde tayin edebilmektedir, ancak yine de karışık matriks

ortamı bozucu fiziksel ve kimyasal girişimler yapmaktadır. FAAS tekniği ise nispeten ucuz olması ve kullanım kolaylığı sağladığı için ağır metal analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Huang ve Hu 2008, Brown ve Milton 2005). Önderiştirme yöntemiyle elde edilen numune miktarı 0.5-5 mL arasında olmaktadır, FAAS tekniği ile analizde 2-4 mL enjeksiyon hacmi gerekmektedir. Mikro enjeksiyon örneklemeli (MIS) sistemi ile FAAS 75-100 µL örnek hacmiyle çalışılabilmektedir (Baig ve diğ. 2012). Çalışmada önderiştirilen analitler MIS-FAAS ile tayin edilmiştir.

Literatürde Fe₃O₄ (MNP) metallere afinite gösteren çeşitli organik maddeler ile kaplanarak kullanılmaktadır. Kaplanmış olan Fe₃O₄ çözelti içerisinde daha seçici olmakta ve kararlılığı artmaktadır (Sodan ve diğ. 2021, Sodan ve diğ. 2020, Çaylak 2019). Tez çalışmasında kaplama maddesi olarak kullanılan 8-hidroksikinolin ile ilgili ağır metal tayini çalışmaları olmakla birlikte, 8-hidroksikinolin kaplı Fe₃O₄ ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır (Karatapanis ve diğ. 2011, Feist ve Mikula 2014, Duran ve diğ. 2007, Mohammad ve Rahimpour 2015, Soylak ve diğ. 2007). Çalışmada ilk olarak Fe₃O₄ (MNP) sentezlenmiştir. Sonrasında MNP, 8-hidroksikinolin ile kaplanmıştır (Fe₃O₄@8-HQ). Sentezlenen ve kaplanan malzemenin karakterizasyon çalışmaları; Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), termo gravimetrik analizi (TGA), titreşimli örnek manyetometresi (VSM) ve alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) yöntemleriyle yapılmıştır. İlaç, atık su ve kompozit malzemede bulunan Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) iyonlarının tayini için mikro enjeksiyon örneklemeli alevli atomik absorpsiyon spektrometresi (MIS-FAAS) tekniği kullanılarak, yöntem parametreleri optimize edilmiştir. Kaplanmış olan malzemenin adsorpsiyon kapasitesi, Langmuir ve Freundlich izoterm uygunluğu çalışması yapılmıştır. Yöntem validasyonu sertifikalı referans malzeme (CRM) kullanılarak yapılmıştır. Son olarak önderiştirme işlemi uygulanan numuneler ICP-MS cihazı ile de analiz edilerek, MIS-FAAS sonuçları ile uyumluluk test edilmiştir.

3.2 Analitler ve Özellikleri

Ağır metaller metabolizmada, biyolojik aktiviteye katılanlar ve katılmayanlar olarak sınıflandırılmaktadırlar. Biyolojik aktivite gösterenlerin ise vücutta belirli bir konsantrasyonda bulunması gerekmektedir. Ağır metaller vücutta yiyeceklerden,

sudan, solunum yoluyla, deri yoluyla girmektedirler. Yüksek konsantrasyonda alınan ağır metaller, lipidlerin ve proteinlerin yapısına katılarak birikmekte ve toksik etki gösterebilmektedirler (Özbolet ve Tuli 2006).

Kurşun, insan aktiviteleri ile doğaya ve canlılığa zarar veren toksik bir metaldir. Motorlu araçlar ve endüstriyel faaliyetler ile toprağa ve suya karışmakta oradan da canlı metabolizmasına girişim yapmaktadır. İnsan vücudunda 125-200 mg kurşun bulunmakta ve vücut bu kurşunun 1-2 mg kadarını dışarı atabilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından kurşun 2. Sınıf kanserojen sınıfta yer almaktadır (Özkan 2009, Karaçağıl 2013).

Bakır, doğada bol miktarda bulunmakta olup, besinlerden, sudan ve havadan alınmaktadır. İndirgeme ve yükseltgeme tepkimelerinde bakır önemli bir role sahiptir. Bakırın aşırı maruziyeti karaciğer, böbrek ve sinir sisteminde kalıcı hasarlara neden olabilmektedir. Ayrıca maruziyetin büyüklüğüne bağlı olarak ölüme neden olabilmektedir (Özkan 2009).

Çinko, metal kaplama ve alaşımlarda bol miktarda kullanılan çinko, mikro besin maddesi olarakta kullanılmaktadır. Çinko RNA, DNA sentezi, enzim aktivasyonu, hücre bölünmesi gibi birçok yaşamsal aktiviteye sahiptir ve canlılık için gerekli bir metaldir. Çinkoya fazla maruziyet bakır eksikliği ve bağışıklık sistemi hastalıklarına neden olabilmektedir (Önder 2012, Okçu 2009).

Kobalt, yaygın kullanılan bir element olmakla birlikte, yer kabuğunda düşük oranda bulunmaktadır. Daha çok elektronik sistemlerde, roket sanayisinde, batarya sektöründe kullanılmaktadır. Kobalta aşırı maruziyet tümör oluşumu, alerji ve kronik hastalıklara neden olmaktadır. Kobalt vücutta 300 µg civarında bulunurken, karaciğer, deniz ürünleri ve kara sebzelerinden vücut kobalt almaktadır (Okudan 2009, Kartal ve diğ. 2004).

3.3 Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu

Analiz öncesi ayırma ve zenginleştirme yöntemlerinin kullanılması ile şu üstünlükler sağlanabilir; büyük miktarda örnek kullanıldığı için örneğin homojen

olmamasından kaynaklanacak hatalar önlenir, zenginleştirme işlemi sonunda analitin konsantrasyonu artırılarak yöntemin tayin kapasitesi artırılır, ayırma işlemi ile eser analitler bilinen ortam (matriks) içinden alındığından, fiziksel, kimyasal ve zemin girişimleri azalır ve standartlar ile örnek ortamları birbirine benzetilir, seçicilik artar (Yılmaz 2016).

Önderiştirme yöntemleri arasında katı faz ekstraksiyonu yöntemi, daha az ve daha zararsız organik çözücü kullanımı, hızlı olması, otomasyona uygunluğu ve basit laboratuvar araçlarıyla gerçekleştirilebilmesi gibi üstünlüklere sahiptir. Son zamanlarda ise katı fazın, numune çözeltisinden veya elüasyon çözeltisinden uzaklaştırılmasında manyetik alanın uygulandığı, manyetik katı faz ekstraksiyon yöntemi oldukça yaygın kullanılmaktadır. İşlem şeması Şekil 3.1.'de gösterilmiş olan, manyetik katı faz ekstraksiyonu (MSPE), örnek çözeltisinden analit iyonlarının adsorplandığı ve desorbe edildiği manyetik nano tanecikli katı fazın bir mıknatıs yardımıyla çözelti ortamından uzaklaştırılması esasına dayanır.



Şekil 3.1: Manyetik katı faz ekstraksiyonu yöntemi (Meszaros 2021)

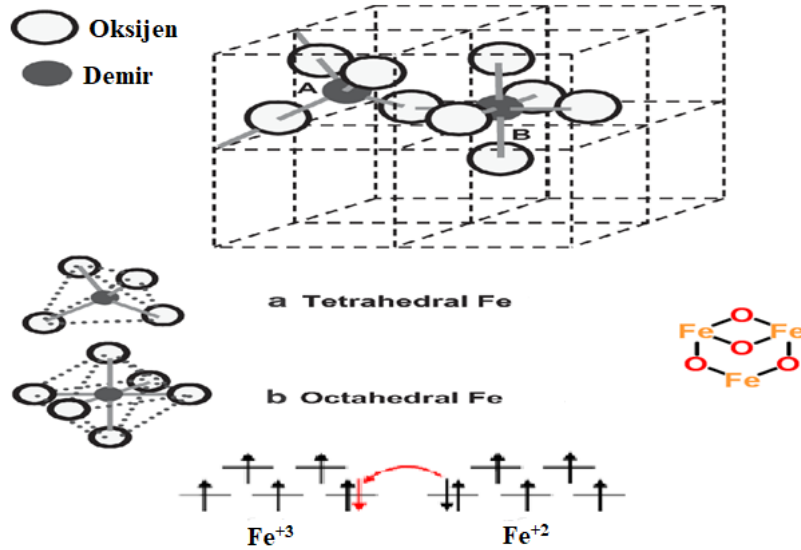
Klasik manyetik katı faz ekstraksiyonu yöntemi, adsorpsiyon, ayırma ve desorpsiyon olmak üzere üç temel işlemden oluşur. Adsorpsiyon adımında, manyetik nanoparçacıklar (MNP) analitleri adsorbe etmek/tutmak için numune çözeltisine eklenir. Numune çözeltisi içindeki nanoparçacıkların dağıtılması için uygun bir karıştırma türü ve süresi kullanılarak adsorpsiyon dengesine ulaşılır ve nanoparçacıklar analitler ile yeterli şekilde etkileşime girer. Desorpsiyon adımında ise analitle yüklü katı faz bir mıknatıs yardımıyla örnek çözeltisinden ayrılır ve analitlerin katı fazdan elüasyonları kısa sürede gerçekleştirilir. Desorpsiyon adımında analitlerin MNP'ler üzerinden ayrılmasında kullanılacak elüent, analitlerin desorpsiyonunu

gerçekleştirmekle birlikte aynı zamanda kullanılan analitik cihaza uygun bir elüent olmalıdır. Genellikle organik analitler için organik bir çözücü, inorganik analitler için ise asidik çözeltiler elüent olarak kullanılmaktadır (Li ve diğ. 2013). MSPE yöntemi, hızlı, kolay, ucuz ve basit olmasının yanında, uygulama alanlarının geniş olması nedeniyle ekstraksiyon yöntemleri arasında çok önemli bir yere sahiptir (Tahmasebi ve diğ. 2013, Šafaříková ve diğ. 1999).

Yeni bir manyetik katı faz ekstraksiyon yöntemi geliştirmek için en önemli strateji, katı faz materyalinin ve yardımcı ekstraksiyon reaktiflerinin seçimidir.

3.4 Manyetit (Fe_3O_4)

Manyetit diye adlandırılan Fe_3O_4 milattan önce 1500 lü yıllarda keşfedilen ilk manyetik yapılardan birisidir. Manyetit kübik bir yapıya sahiptir, magnetit malzemede Fe^{3+} ve Fe^{2+} iyonları bulunur, Fe^{3+} iyonları oktahedral ve tetrahedral düzenlenirken Fe^{2+} iyonları sadece oktahedral düzenlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Fe_3O_4 Ters kübik yapı ve elektron geçişleri (Sakallıoğlu 2013)

Manyetizma, elektrik yüklerinin (elektronların) hareketleriyle meydana gelmektedir. Fe elementi bazı yerlerde 4, bazı yerlerde ise 6 oksijen atomu ile çevrelenmiş durumdadır. Oda sıcaklığında elektronlar Fe^{2+} iyonundan Fe^{3+} iyonu arasında geçişler

göstermektedir, bu sebeple manyetit, manyetik özellik göstermektedir (Ferrimanyetik). Şekil 3.2’de Fe_3O_4 ’ün ters kübik yapısı ile birlikte elektron geçişleri de gösterilmektedir (Bingöl 2012, Sakallıoğlu 2013). Fe_3O_4 ’ün yoğunluğu 5 g/cm^3 , molekül ağırlığı 231.533 g/mol , erime sıcaklığı $1597 \text{ }^\circ\text{C}$, kaynama sıcaklığı ise $2623 \text{ }^\circ\text{C}$ dir.

Metallerin önderiştirilmesi çalışmalarında Fe_3O_4 , metallere afinite gösteren çeşitli organik maddelerle kaplanarak zenginleştirme fazı olarak kullanılmaktadır.

3.5 Manyetik Nanoparçacık ve 8-Hidroksikinolin ile İlgili Literatür Bilgileri

Mohammad ve arkadaşları, insan serumundan ve su örneklerinden, Al(III) iyonlarının ayrılması için sodyum dodesil sülfat (SDS) yardımıyla, 8 hidroksikinolin (8-HQ) ile kaplanmış CoFe_2O_4 nano parçacıklarına (NP'ler) dayalı basit bir dağıtıcı katı faz mikro ekstraksiyon yöntemi geliştirmiştir (Mohammad ve Rahimpour 2015).

Karatapanis ve arkadaşları, çevresel su örneklerinden, mikroekstraksiyon yönteminde adsorban olarak katyonik bir yüzey aktif madde ile kaplanmış silika modifiyeli manyetit nanoparçacık yardımıyla, eser miktarda Cu(II) , Ni(II) , Co(II) , Cd(II) 'nin belirlenmesini araştırmış, Pb(II) ve Mn(II) 'ın setilpiridinyum bromür ile kombinasyonu halinde sentezlenen silika kaplı manyetik nano parçacıklar, 8 hidroksikinolin ile kompleksleştirildikten sonra metal iyonlarını adsorbe etme kabiliyetine sahip olmuşlardır (Karatapanis ve diğ. 2011).

Feist ve arkadaşları, bitki örneklerinden, kadmiyum, bakır, nikel, kurşun ve çinkonun ayrıştırılması ve zenginleştirilmesi için şelatlama maddesi olarak 8-hidroksikinolin ve bir taşıyıcı element olarak lantan(III) kullanılan bir yöntem önermiştir. Ağır metaller önderiştirildikten sonra, indüktif olarak eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometrisi (ICP OES) ile belirlenmiştir. Sonuçlar, alevli atomik absorpsiyon spektrometrisi (FAAS) kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır (Feist ve Mikula 2014).

Soylak ve arkadaşları, su ve gıda örneklerinden, kobalt(II) ve manganez(II) iyonlarının, bakır(II)-8-hidroksikinolin sistemi ile birlikte çöktürülmesine dayalı bir ayırma-zenginleştirme yöntemi geliştirilmiştir. Co(II) ve Mn(II)'nin kantitatif geri kazanımları için pH, taşıyıcı element olarak bakır(II) miktarı, 8-hidroksikinolin miktarı, numune hacmi vb. analitik parametreler araştırmıştır. Gerçek örneklerde bulunan eşlik eden iyonlardan hiçbir interferik etki gözlemlenmemiştir (Soylak ve diğ. 2007).

Duran ve arkadaşları, çevresel numunelerdeki, Mn(II), Fe(II), Co(II), Cu(II), Cd(II), Zn(II), Pb(II) ve Ni(II)'nin FAAS ile tayinleri öncesi bir kolonda Amberlite XAD-2000 reçinesi üzerinde 8-hidroksikinolin (HQ) ile kompleksleştirip, bir önderiştirme yöntemi geliştirmişlerdir. pH, eluent tipi, hacim, konsantrasyon, akış hızı ve numune çözeltisinin hacmi gibi çeşitli parametreler ve metal iyonlarının tutulması üzerindeki matriks girişim etkisi araştırmıştır (Duran ve diğ. 2007).

Sodan ve arkadaşları, çevresel su ve biyolojik örneklerden, Cr(III) ve Cr(VI) iyonlarının önderiştirilmesi ve AAS ile tayini için, manyetik katı faz ekstrasyonu yöntemi geliştirmişlerdir. Fe₃O₄ manyetik nano parçacık, birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlenerek politiyofen ile kaplanmıştır (Fe₃O₄@PTh). Cr(III) kantitatif olarak tayin edilerek, toplam krom konsantrasyonundan Cr(VI) iyon konsantrasyonu bulunmuştur (Sodan ve diğ. 2021).

Sodan ve arkadaşları, çevresel su ve sebze örneklerinden, Cu(II), Co(II), Cd(II), Ni(II), Zn(II) elementlerini tayini ve tespiti için, manyetik katı faz ekstraksiyonu yöntemi geliştirmişlerdir. Bu kapsamda, manyetik katı parçacık Fe₃O₄, politiyofen ile kaplanarak adsorban olarak kullanılmış ve örneklerdeki analit konsantrasyonları AAS cihazı ile belirlenmiştir (Sodan ve diğ. 2020).

Çaylak, çevresel su örneklerinden, Cu(II), Cd(II), Co(II) ve Pb(II) iyonlarının tayini için polianilin kaplı (PANI) Fe₃O₄ manyetik nanoparçacık yöntemi geliştirmiştir. Analitler FAAS ile tayin edilmiştir. Fe₃O₄-PANI ile pH 8'de adsorplanan analitler, %0.2 (w/v) tiyoüre içeren 0.5 mL 2 mol L⁻¹ HCl ile elüe edilmişlerdir. Yöntem doğrulama çalışması SPS-WW2 Batch 114 atıksu referans materyal ile yapılmıştır (Çaylak, 2019).

3.6 Deneysel Bölüm

3.6.1 Kullanılan Aletler

Metal iyonların tayininde mikroenjeksiyon sistemli, Perkin Elmer marka A Analyst 200 model atomik absorpsiyon spektrometre (MIS-FAAS) (Norwalk, USA) kullanılmıştır. Işın dalga boyları kurşun için 283.32 nm, çinko için 213.86 nm, bakır için 324.75 nm ve kobalt için 240.73 nm, slit aralığı ise 0.7 nm dir. Metot karşılaştırma için Thermo Scientific ICAP-Q ICP-MS (Waltham-Massachusetts, USA) kullanılmıştır. Nanoparçacık sentezinde; IKA marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, mekanik karıştırıcı, ultrasonik banyo (Staufen, Almanya), ultra saf su cihazı (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA), pH ayarlamalarında HQ411D Hach pH metre (Ames, Iowa, ABD), kurutma işlemlerinde UN110 Memmert inkübatör (Schwabach, Almanya) kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmaları, ATR uyumlu Perkin Elmer Spektrum Two FT-IR cihazı, termogravimetrik analiz için Hitachi STA 7300 TGA (Tokyo, Japonya), manyetik özellik ölçümünde Lake Shore marka 7407 model Titreşimli Numune Manyetometre (VSM) cihazı (Westerville, USA), nano boyut incelemesinde Zeiss Supra 40VP taramalı elektron mikroskop (SEM) cihazı (Jena, Almanya) kullanılarak yapılmıştır.

3.6.2 Reaktifler ve Standart Çözeltiler

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflık kalitesindedir. Ultra saf su $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ kalitesinde saf su cihazından elde edilmiştir. Tayini yapılan Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) iyonlarının 100 mg L^{-1} konsantrasyondaki stok çözeltileri, Sigma Aldrich Missouri, ABD'den satın alınan $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, metal tuzları kullanılarak hazırlanmıştır. Nitrik asit (65%), hidroklorik asit (37%), amonyak (25%), fosforik asit (85%), glasiyal asetik asit Merck Darmstadt-Almanya'dan satın alınmıştır. Sentez çalışmasında kullanılan demir(III) klorür heksahidrat, demir sülfat heptahidrat, sodyum dodesil sülfat ve kaplamada kullanılan 8-hidroksikinolin Sigma Aldrich-Almanya'dan temin edilmiştir. Tampon çözelti sistemi için; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 2 tamponu, $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{CH}_3\text{COOH}$ pH

4-6 tamponu, $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6.5-7.5 tamponu, $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ pH 8-10 tamponu kullanılmıştır. Tüm çözeltiler günlük olarak hazırlanmış olup, deneylerde kullanılan tüm malzemeler 20% (v/v) HNO_3 ve saf su ile temizlenmiştir.

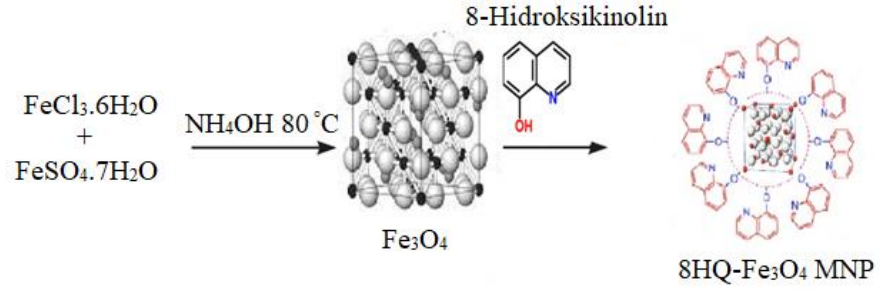
3.6.3 Manyetik Katı Faz Sentezi, Yapısı ve 8-Hidroksikinolin ile Kaplanması

$\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ MNPs sentezi için ilk olarak Fe_3O_4 birlikte çöktürme yöntemiyle sentezlenmiş olup, sonrasında 8-hidroksikinolin ile kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Fe_3O_4 manyetik nano parçacık sentezi için; 0.03 mol $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (8.11 g) ve 0.01 mol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2.78 g) tartılıp 600 mL behere konularak 400 mL ultrasaf su ilave edildi. Manyetik karıştırıcılı ısıtıcıyla 80 °C'ye ısıtıldı. Çözelti sıcaklığı 80°C'ye ulaştığında üzerine 20 mL %25'lik amonyak çözeltisi damla damla ilave edildi. Çözeltinin rengi; sarı, turuncu, kahverengi ve siyah renk değişikliği geçirdi. Bu halde karıştırma hızı 1000 rpm'i geçmeyecek şekilde 5 dakika daha karıştırma işlemi yapıldı. Oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Son olarak siyah çözelti elde edildi ve oluşan bu siyah çözelti mıknatıs yardımıyla ayrılıp, 4 defa 100 mL saf suyla yıkandı. 70 °C' de 10 saat etüvde kurutuldu, havanda ezilip saklandı (Sodan ve diğ. 2020).

Birlikte çöktürme yöntemiyle Fe_3O_4 sentez reaksiyonu,



İlk aşamada sentezlenmiş olan Fe_3O_4 'ten 0.5 g alınarak, 125 mg sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren 50 mL'lik çözeltiliye ilave edildi. SDS malzemenin topaklaşmasını önleyerek yüzey alanını artırıcı etki yapmaktadır. Çözelti pH'ı, 4 M hidroklorik asit ile 2.5 yapıldı ve 15 dakika boyunca mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı. Üstteki sulu faz boşaltıldı ve SDS kaplı Fe_3O_4 , su ile iyice yıkandı. Daha sonra 50 mL deiyonize su ve 50 mL aseton içerisinde çözündürülmüş 8-hidroksikinolin (1 g) çözeltisi eklendi. Çözelti 4 saat mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı ve daha sonra 8-hidroksikinolin ile kaplanmış olan manyetik oksit bir mıknatıs ile ayrıldı (Tan ve diğ. 2015). Oda sıcaklığında kurutulup, havanda toz haline getirilerek saklandı. Şekil 3.3.'te Fe_3O_4 sentezi ve 8-hidroksikinolin ile kaplama şematize edilmiştir.

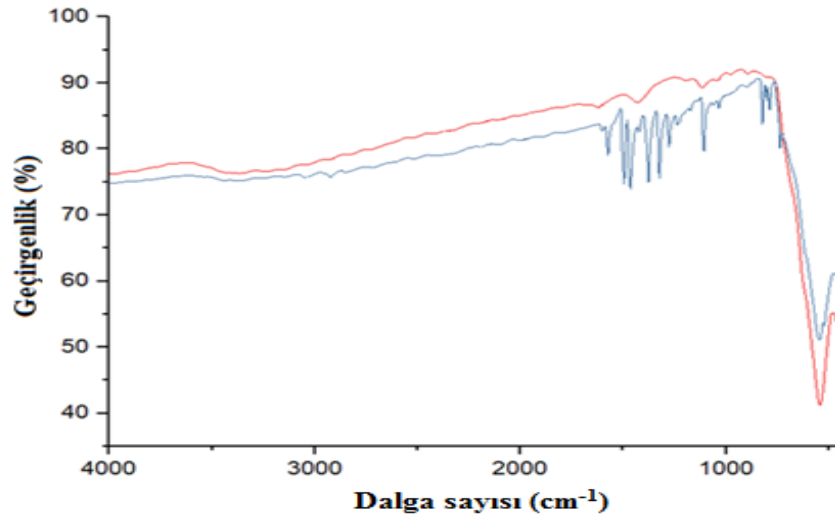


Şekil 3.3: 8-hidroksikinolin kaplı Fe_3O_4 manyetik nano partiküllerinin sentez şeması

3.6.4 Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.4.1 Fourier Dönüümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi

Sentezlenmiş olan Fe_3O_4 ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ MNPs'in ATR-IR spektrumları alınıp Şekil 3.4.'te karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.4: Fe_3O_4 (kırmızı) ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ MNPs'in (mavi) ATR-IR üst üste çakıştırılmış spektrumu

Spektrumda 547.21 cm^{-1} Fe-O gerilme titreşimi; Fe_3O_4 manyetik nano parçacık varlığını desteklemektedir (Maity ve diğ. 2007). 3046.70 cm^{-1} O-H gerilme, 1574.44 cm^{-1} O-H eğilme, 2923.62 cm^{-1} aromatik C-H gerilme, 1464.20 cm^{-1} C-H eğilme,

1580-1650 cm^{-1} C=N ve Aromatik C=C çifte bağlarını, 1323.8 cm^{-1} C-O tekli bağ, 1498-1327 cm^{-1} aromatik C-H tekli bağ düzlem içi eğilmesi, 821-738 cm^{-1} aromatik C-H düzlem dışı eğilme titreşiminden kaynaklı pikler; manyetik nano parçacığın 8-hidroksikinolin ile kaplandığını göstermektedir.

$\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ MNPs'in, konsantrasyonları 10 mol L^{-1} olan Pb(II), Cu(II), Co(II) ve Zn(II) çözeltileri ile muamelesi ve etüvde 70 $^{\circ}\text{C}$ 'de 5 saat kurutulması sonrasında alınan FT-IR spektrumlarının, literatürle ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ FT-IR spektrumuyla karşılaştırması Tablo 3.1'de verilmiştir. Spektrumdaki kaymalardan; kurşun için 550.48 cm^{-1} , çinko için 549.29 cm^{-1} , bakır için 551.09 cm^{-1} , kobalt için 551.07 cm^{-1} dalga sayılarında elde edilen Fe-O gerilme titreşimleri manyetik nanoparçacığın analitleri tuttuğunu göstermektedir.

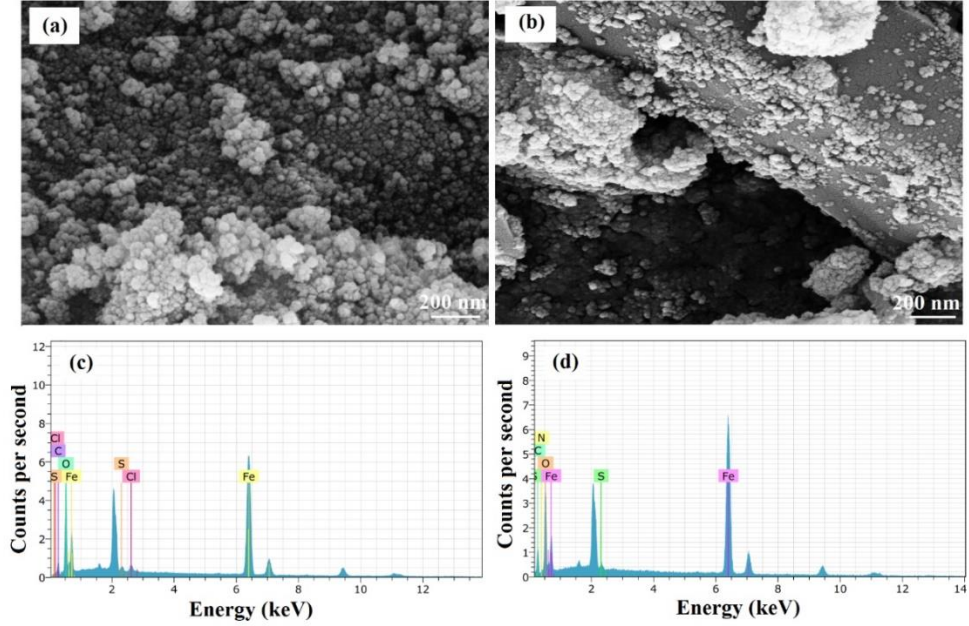
Tablo 3.1: FT-IR spektrum verileri ve literatür ile karşılaştırma

Spektral Band (cm^{-1})	Literatür (Dirgayanti vd. 2021) Cipurković vd. 2021)	Fe_3O_4	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-8HQ}$ (MNP)	MNP-Pb	MNP-Zn	MNP-Cu	MNP-Co
O-H Gerilme	3300-3600	-	3046.70	3025.12	3031.46	3041.22	3041.36
C-H Gerilme	2850-2970	-	2923.62	2807.49	2808.05	2808.95	2807.81
C-H Eğilme	1340-1470	-	1464.20	1465.03	1465.48	1468.60	1466.27
O-H Eğilme	1500-1600	-	1574.44	1575.14	1575.81	1574.85	1576.35
C-O	1050-1330	-	1323.8	1324.16	1324.48	1323.13	1324.16
Fe-O	500-610	547.21	549.83	550.48	549.29	551.09	551.07

3.6.4.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-EDX) Analizi

Fe_3O_4 ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ MNPs'nin SEM görüntüleri, kimyasal bileşimleri EDX analizleri Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Fe_3O_4 parçacık boyutu ortalama 34.86 nm, $\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ MNPs parçacık boyutu ortalama 27.09 nm olarak bulunmuştur (Şekil 3.5.a-b). SEM görüntüleri önceki çalışmalarda karşılaştırıldığında (Munoz ve diğ. 2015, Yan ve diğ. 2016, Yuan ve diğ. 2009), iyi bir kaplanma olduğu görülmüş ve

daha küçük partiküller elde edilmiştir. Kaplanmış olan malzemenin parçacık boyutunun, kaplanmamış malzemenin parçacık boyutundan daha küçük olması da kaplamanın gerçekleştiğini desteklemektedir.

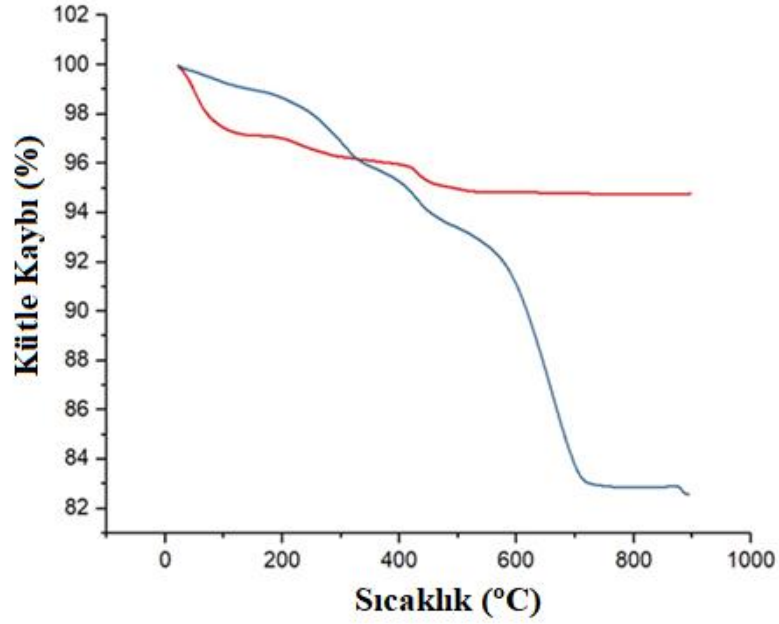


Şekil 3.5: (a) Fe₃O₄ SEM görüntüsü, (b) Fe₃O₄@8-HQ MNPs SEM görüntüsü, (c) Fe₃O₄ EDX, (d) Fe₃O₄@8-HQ MNPs EDX

Fe₃O₄ ün EDX analizinde (Şekil 3.5.c); demir ve oksijen malzemenin bileşiminin kaynaklanırken, kükürt, sentez esnasından kullanılan sodyum dodesil sülfattan, klor pH ayarlama işmeninden ileri gelmektedir. Fe₃O₄@8-HQ MNPs'nin EDX analizinde (Şekil 3.5.d) ise demir ve oksijene ek olarak 8-hidroksikinolin yapısından kaynaklanan azot bulunmaktadır, bu ise malzemenin kaplandığını ifade etmektedir (Ansari ve diğ. 2020).

3.6.4.3 Termogravimetrik Analiz (TGA)

Sentezlenmiş olan Fe₃O₄ ve bu malzemenin 8-hidroksikinolin ile kaplanması sonrası elde edilen malzeme, TGA cihazı ile analiz edilmiştir. 19.2 mg numune azot atmosferinde oda sıcaklığından 900°C'ye kadar ısıtılarak TGA verileri elde edilmiştir (Şekil 3.9).



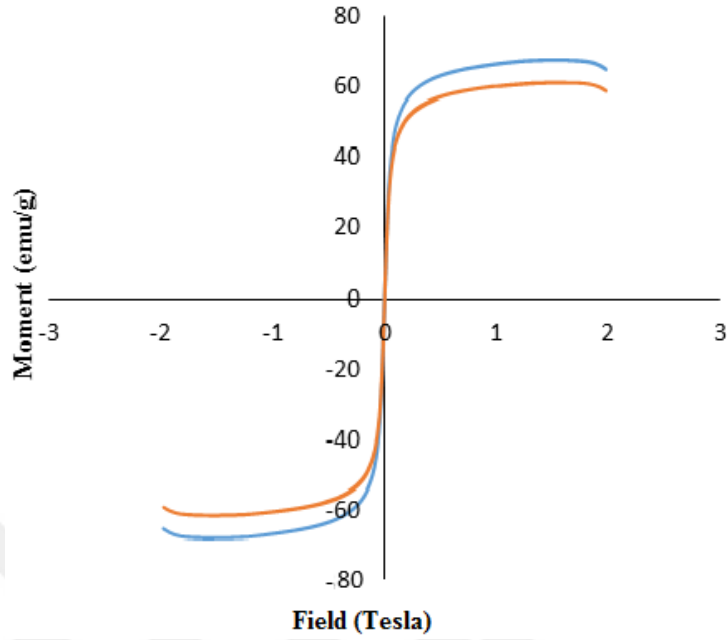
Şekil 3.6: Termogravimetrik analiz grafiği, Fe_3O_4 (kırmızı), $\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ (mavi)

Şekil 3.6'da, kaplanmamış Fe_3O_4 'ün termal bozunmasında % 5'lik bir kütle kaybının olduğu görülmüştür. Bu kaybın kristal yapı içine hapsolmuş H_2O kristallerinden ve ortamda bulunan nemden kaynaklandığı düşünülmektedir. 8-hidroksikinolin ile kaplanmış olan $\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ numunesinde ise toplam kütle kaybı %20 civarında gözlenmiştir. Bozunmanın ilk basamakta $93.5^\circ\text{C}/99.5^\circ\text{C}$ de bağların kırılmasıyla H_2O 'un ortamdan uzaklaşmasından kaynaklandığı; sonraki kütle kayıplarının ise organik yapının ayrışmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kütle kayıplarındaki bu fark malzemenin 8-hidroksikinolin ile kaplandığını göstermektedir.

3.6.4.4 Titreşimli Numune Manyetometresi (VSM) Analizi

Sentezlenen Fe_3O_4 ve 8-hidroksikinolin ile kaplanan Fe_3O_4 malzemelerinin manyetik özellikleri, titreşimli numune manyetometre (VSM) cihazıyla belirlenmiştir. Şekil 3.7'de çalışmada sentezlenen Fe_3O_4 ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-}8\text{HQ}$ MNPs malzemelerinin 293 K sıcaklıkta ve 2 Tesla (20000 Oe) manyetik alanda, histeresis grafikleri verilmiştir. Saf Fe_3O_4 'ün manyetik özelliğinin 8-hidroksikinolin ile kaplandıktan sonra belirgin bir şekilde azaldığı görülmüştür. Histeresis grafiğinde kaplanmış malzemenin ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-}8\text{HQ}$ MNPs) manyetik duyarlılığında gözlenen bu azalma, manyetik özellik

göstermeyen 8-hidroksikinolinin manyetik katı fazı perdelemesinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.7: Histerisis eğrileri Fe_3O_4 (mavi), Fe_3O_4 -8HQ MNPs (kırmızı)

Tablo 3.2.'de doygunluk manyetizasyonu (M_s) Fe_3O_4 'ün 67.69 emu/g bulunurken, Fe_3O_4 -8HQ MNPs'nin 61.09 emu/g olarak bulunmuştur. Kalıcı manyetiklik (M_r) Fe_3O_4 'ün 2.15 emu/g iken Fe_3O_4 -8HQ MNPs'nin 1.32 emu/g dır. Zorlayıcı alan manyetikliği (H_c) Fe_3O_4 'ün 20.56 Oe iken Fe_3O_4 -8HQ MNPs'nin 13.84 Oe dir. Sentezlenen malzeme grafik döngüleri ve değerleri göz önüne alındığında, ferrimanyetik özellik göstermektedir (Farimani ve diğ. 2014).

Tablo 3.2: Titreşimli numune manyetometresi analizi sonuçları

Manyetizasyon parametreleri	Fe_3O_4	Fe_3O_4 -8HQ
M_s (Doygunluk manyetizasyonu)	67.69 emu/g	61.09 emu/g
M_r (Kalıcı manyetiklik)	2.15 emu/g	1.32 emu/g
M_r/M_s	0.45 emu/g	0.21 emu/g
H_c (Zorlayıcı alan)	20.56 Oe	13.84 Oe

Elde edilen bu sonuçlardan sentezlenen bu malzemenin harici bir manyetik alan uygulandığında çözeltiden ayrılmaya uygun olduğu görülmüştür. Bu da

malzemenin manyetik katı faz ekstaksiyonu ile önderiştirme işleminde kullanılabileceğini göstermektedir.

3.6.5 Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu (MSPE) Yöntemi

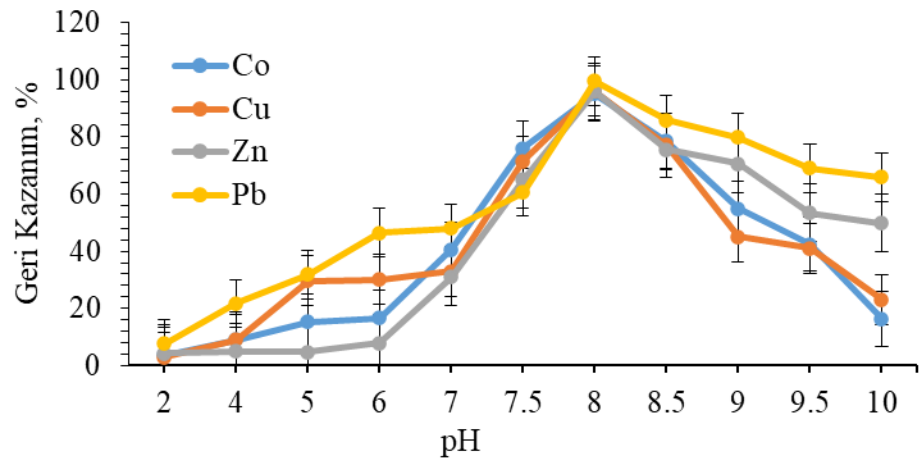
Örnekler içerisindeki analit iyonlarının önderiştirilmesi işleminde MSPE yöntemi kullanılmıştır. Önderiştirme yöntemi ilk olarak model çözelti kullanılarak optimize edilmiş, sonrasında gerçek örneklerle uygulanmıştır. Model çözelti 100 mg L^{-1} konsantrasyondaki stok metal çözeltilerinden, Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) iyonları için $1\text{-}4 \text{ mg L}^{-1}$ konsantrasyon aralığında olacak şekilde hazırlanmıştır. Adsorpsiyon aşamasında çözeltilere $10 \text{ mg Fe}_3\text{O}_4\text{-}8\text{HQ}$ MNPs ve metal çözeltisinden belirlenen konsantrasyonda ilave edilerek, $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ tampon çözeltisiyle son çözelti pH'ı 8'e tamponlanmıştır. Sonrasında çözeltiler el ile 3 dakika boyunca çalkalanarak; Pb(II) için 100 mL , Zn(II) için 75 mL , Cu(II) ve Co(II) için 50 mL çözeltilerden $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-}8\text{HQ}$ MNPs neodyum mıknatıs yardımıyla ayrılmıştır. Çözeltiden ayrılan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-}8\text{HQ}$ MNPs katı faz üzerine $5 \text{ mL } 1 \text{ M HNO}_3$ çözeltisi ilave edilerek, el ile 4 dakika boyunca çalkalanarak desorpsiyon işlemi gerçekleşmiş ve katı faz çözeltiden neodyum mıknatıs yardımıyla ayrılmıştır. Önderiştirme ve ayrılma işleminin sonunda elde edilen son çözeltiden mikropipet yardımıyla $100 \text{ }\mu\text{L}$ alınarak, MIS-FAAS tekniği ile analitler tayin edilmiştir.

3.6.6 Sonuçlar ve Yorum

Önderiştirme işleminde; pH, elüent türü, elünt konsantrasyonu, elüent hacmi, adsorpsiyon süresi, desorpsiyon süresi, manyetik katı faz miktarı, tekrar kullanılabilirlik, numune hacmi ve yabancı iyon etkisi parametreleri optimize edilmiştir. Ayrıca katı fazın adsorpsiyon kapasitesi, Langmuir ve Freundlich izoterm değerleri hesaplanmıştır. Yöntem validasyonu QCP-QCS-1 sertifikalı referans malzeme ile yapılmıştır. Analitik değerlendirme yapılarak MSPE yöntemi gerçek örneklerle uygulanmıştır. Geliştirilen MSPE yöntemi ile önderiştirilen analitler, MIS-FAAS ve ICP-MS teknikleriyle tayin edilmiş ve her iki teknikte elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

3.6.6.1 pH Etkisi

Katı faz ekstraksiyonu ile eser metallerin önderiştirilmesinde çözelti pH'ı önemli bir rol oynamaktadır. Düşük pH ortamında madde protonlanıp katyonların bağlanması güçleşebilir, yüksek pH ortamında metaller hidroksitleri şeklinde çökelme yapabilir. Çözeltinin pH değerinin katı faz ile çözeltide bulunan analitlerin etkileşmesini kolaylaştıracak değerde olması gerekmektedir. Bu sebeple Şekil 3.8.'de görüleceği üzere, pH taraması tampon çözelti yardımıyla, çözelti pH'ının 2-10 aralığında değiştirilmesiyle yapılmıştır. Analitleri içeren model çözeltilere yöntem uygulanmış ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. En yüksek geri kazanım değerleri $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ tampon sistemi ile pH 8'e tamponlanan çözelti ile çalışıldığında elde edilmiş olup, geri kazanımlar Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) için sırasıyla %99.55, %95.84, 95.92, %95.11'dir.



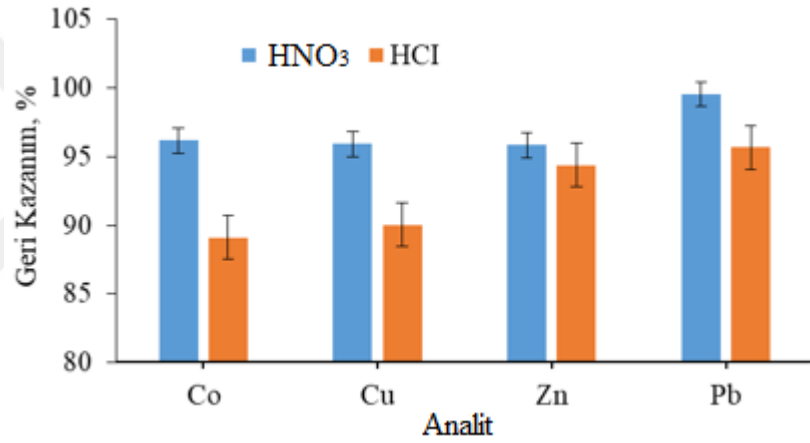
Şekil 3.8: Analit iyonlarının geri kazanımına pH etkisi

Asidik ortamda 8-hidroksikinolinin yapısındaki OH ve N uçları protonlanıp pozitif yükle yüklendiği ve bu elektrostatik itmelerden dolayı analitlerle metal kompleksinin oluşmadığı düşünülmektedir. Artan pH ile birlikte 8-hidroksikinolinin deprotonlanması ve kısmi negatif yükle yüklenmesi sonrasında metal bağlanması gerçekleşmiştir. pH 8'de çözeltide herhangi bir çökme gözlenmemiştir. Analitlerin atom yarıçapları ve sterik etkinin, pH 8 de analitlerin hidroksitleri halinde çökmesini

engellediği düşünülmektedir. Sonraki parametrelerde örnek çözelti pH'ı 8'e ayarlanarak çalışılmıştır.

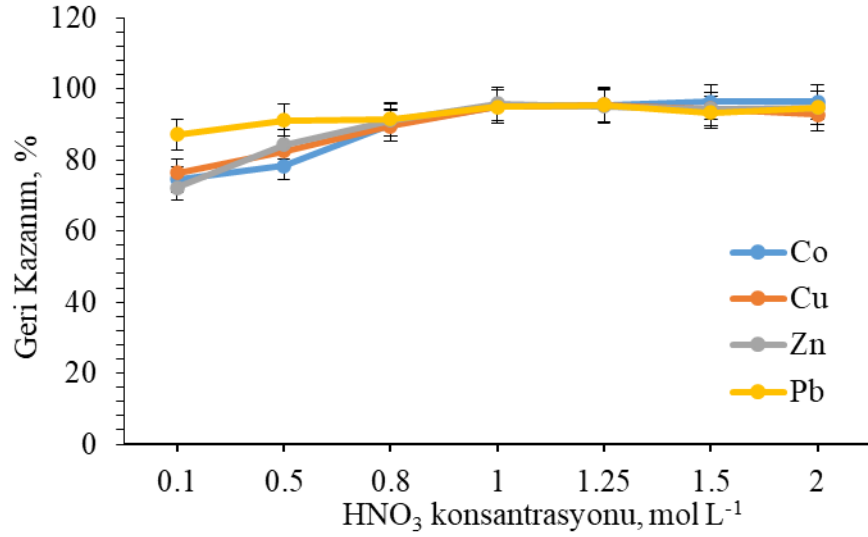
3.6.6.2 Elüent Türü, Hacmi ve Konsantrasyonu Etkisi

Elüsyon çözeltisinin türü, hacmi ve konsantrasyonu, yüksek zenginleştirme faktörü elde etmek için oldukça önemlidir. Bu çalışmada öncelikle, HNO_3 ve HCl elüent türü olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde elüent olarak HNO_3 kullanıldığında geri kazanım değerleri Pb(II) , Zn(II) , Cu(II) ve Co(II) için sırasıyla %98.75, %95.46, %95.83 ve %96.52 olarak bulunmuştur (Şekil 3.9). Bu veriler neticesinde HNO_3 elüsyon çözeltisi olarak seçilmiştir.



Şekil 3.9: Analitlerin geri kazanımına elüent türü etkisi (pH:8)

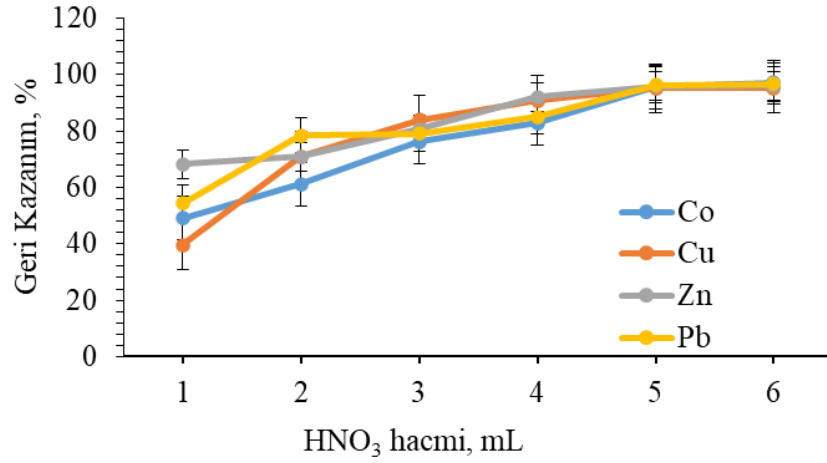
Pb(II) , Zn(II) , Cu(II) ve Co(II) iyonlarının elüsyonu için HNO_3 çözeltisinin konsantrasyonu $0.1\text{-}2 \text{ mol L}^{-1}$ aralığında değiştirilerek analitlerin geri kazanımına etkisi incelenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: Analitlerin geri kazanımına elüent konsantrasyonu etkisi

Şekil 3.10 incelendiğinde, HNO₃ çözeltisi konsantrasyonu 1-2 mol L⁻¹ aralığında olduğunda analitlerin geri kazanım değerleri kantitatif ($\geq 95\%$) olduğu görülmektedir. Elüent konsantrasyonu 1 mol L⁻¹ olduğunda Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) için geri kazanım değerleri sırasıyla %95.02, %95.81, %95.14 ve %95.11 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlardan optimum elüent konsantrasyonu 1 mol L⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Elüent hacmi yüksek zenginleştirme faktörü elde etme açısından önemlidir. Bu kapsamda elüent hacmi 1-6 mL aralığında değiştirilmiş ve analitlerin geri kazanımına etkisi incelenmiştir. Şekil 3.11’de görüldüğü gibi 5 ve 6 mL elüent kullanıldığında kantitatif geri kazanım elde edilmiştir. Yüksek zenginleştirme faktörü elde edebilmek için elüent hacminin düşük olması gerekmektedir. Bu sebeple elüent hacmi 5 mL olarak belirlenmiştir.

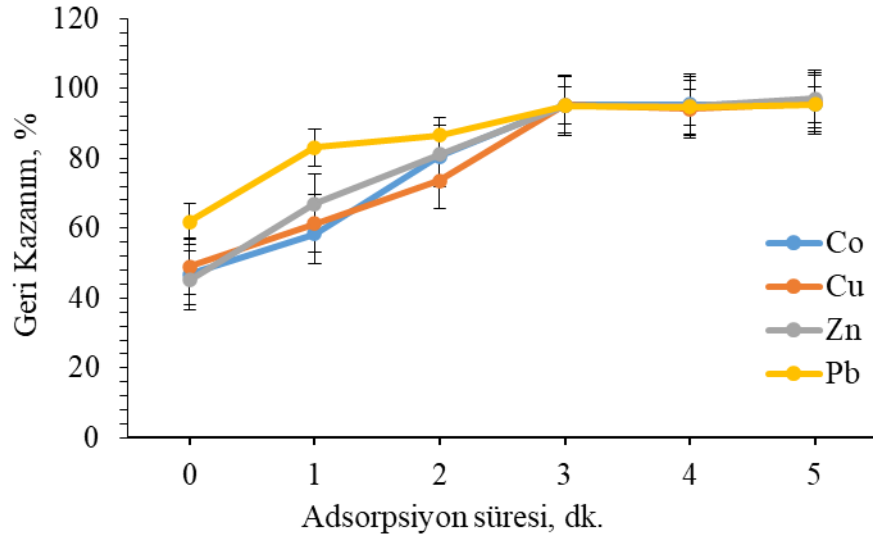


Şekil 3.11: Analitlerin geri kazanımına elüent hacmi etkisi

Elüent olarak 5 mL 1 mol L⁻¹ HNO₃ kullanıldığında Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) için geri kazanım değerleri sırasıyla %96.33, %95.83, %95.03 ve %95.56 olarak bulunmuştur.

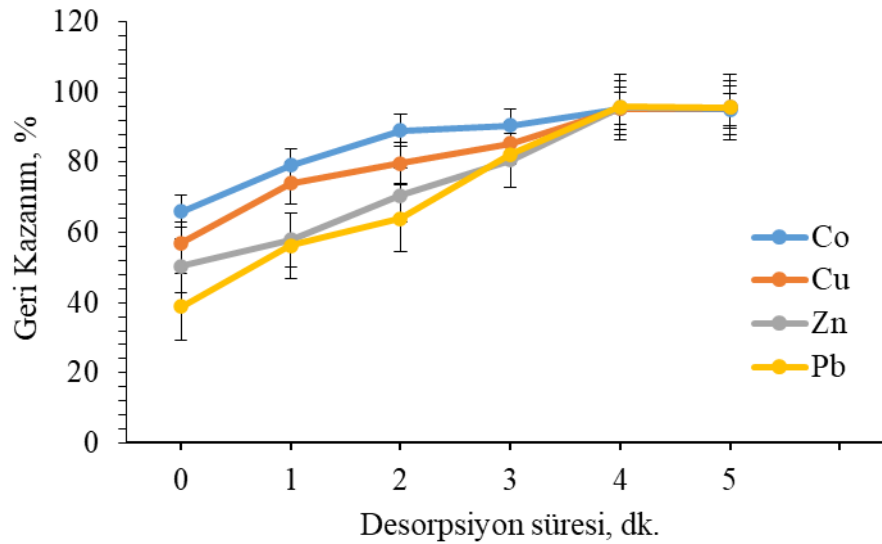
3.6.6.3 Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Çalkalama Süresinin Etkisi

Adsorpsiyon süresinin analitlerin geri kazanımına etkisinin belirlenmesinde metal iyonlarını içeren çözeltiye, MSPE yöntemi uygulanmış ve çözeltiler 0-5 dakika boyunca el ile çalkalanmıştır. 3 dakika sonrasında kantitatif geri kazanım verileri elde edildi. 3. dakikada elde edilen geri kazanım verileri; Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) için sırasıyla %95.23, %95.04, %95.22 ve %95.15'tir (Şekil 3.12). Analit ile adsorban arasındaki etkileşimin gerçekleştiği en kısa süre olarak 3 dk. adsorpsiyon süresi olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.12: Analitlerin geri kazanımına adsorpsiyon süresinin etkisi

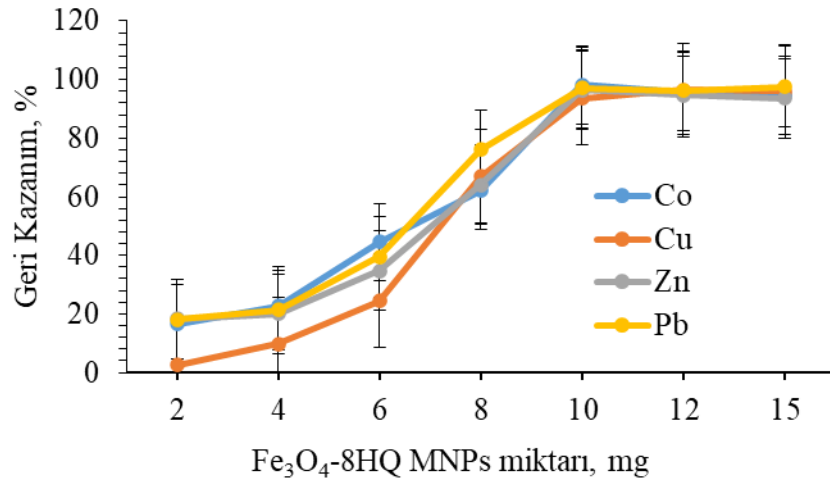
Desorpsiyon süresi belirlenmesinde ise elüsyon çözeltisi ilavesi sonrası 0-5 dakika boyunca el ile çalkalama işlemi sonrasında elde edilen geri kazanım verileri değerlendirilmiştir. Minimum 4 dakika ve sonrasında analitlerin kantitatif geri kazanım olduğu görülmüştür. 4. dakikada elde edilen geri kazanım değerleri, Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) için sırasıyla, %95.75, %95.53, %95.26 ve %95.31'dir (Şekil 3.13). Elüsyonu en kısa sürede gerçekleştirebilmek için, elüsyon süresi 4 dk. olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.13: Analitlerin geri kazanımına desorpsiyon süresinin etkisi

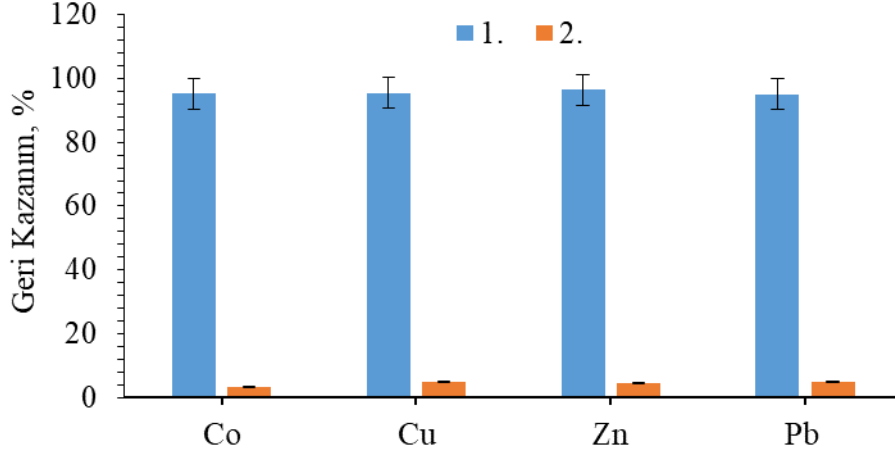
3.6.6.4 Fe₃O₄-8HQ MNPs Miktarı Etkisi ve Tekrar Kullanılabilirlik

Katı fazın miktarı ne kadar az olursa hem daha az kirlilik bulaşır hem de daha az elüsyon çözeltisi sarfiyatı meydana gelir. Nanopartiküllerin yüzey alanı/hacim oranının yüksek olması sebebiyle düşük miktarlarda iyi sonuçlar alınabilmektedir (Bagheri ve diğ. 2012). Çalışmada Fe₃O₄-8HQ MNPs miktarı 2-15 mg arasında değiştirilerek çözeltilere ilave edilmiş ve analitlerin geri kazanımına MNP miktarının etkisi incelenmiştir. Şekil 3.14'te anlaşılabileceği gibi, 10 mg ve üzeri Fe₃O₄-8HQ MNPs kullanıldığında, analit iyonlarının kantitatif geri kazanıldığı görülmüştür. 10 mg katı faz kullanıldığında Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) için sırasıyla, %97.12, %96.50, %95.54 ve %98.20 geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Daha az katı faz kullanımı, katı faz kaynaklı kontaminasyon ve bozucu etki getirme olasılığının düşük olması ve ekonomik oluşu nedeniyle optimum Fe₃O₄-8HQ MNPs miktarı 10 mg olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.14: Analitlerin geri kazanımına Fe₃O₄-8HQ MNPs miktarının etkisi

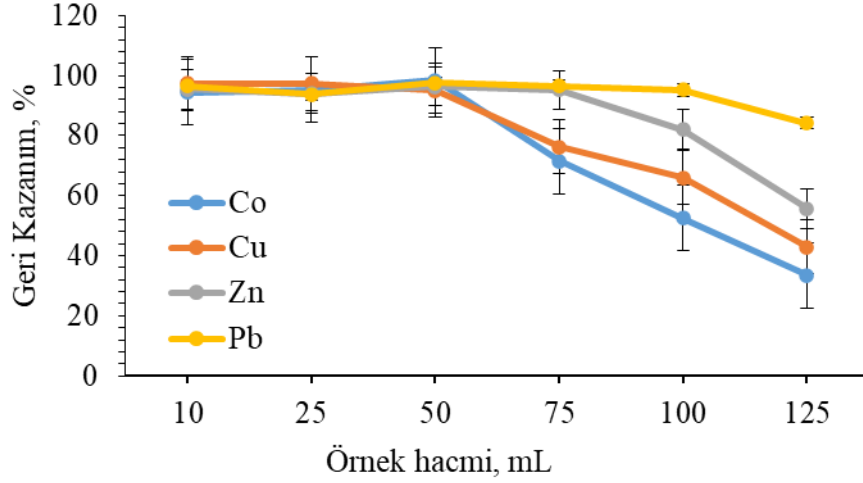
Ayrıca Fe₃O₄-8HQ MNPs'nin tekrar kullanılabilirlik özelliği de test edilmiştir. İkinci kullanımda tüm analitler için geri kazanım değerleri %5'ten düşük bulunmuş ve Fe₃O₄-8HQ MNPs'nin tek kullanımlık olduğu görülmüştür (Şekil 3.15). Bu durum, elüent olarak kullanılan asit çözeltisinin Fe₃O₄-8HQ MNPs'nin yapısını bozmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.15: Analitlerin geri kazanımına $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-8HQ}$ MNPs'nin tekrar kullanılabilirliğinin etkisi

3.6.6.5 Numune Hacminin Etkisi

Yüksek zenginleştirme faktörü elde edebilmek için numune hacminin, kantitatif geri kazanımın elde edilebildiği en yüksek miktarda olması gerekmektedir. Zenginleştirme faktörü maksimum örnek hacminin minimum elüent hacmine bölünmesi ile elde edilmektedir. Zenginleştirme faktörünün (PF) belirlenmesi için analitlerin geri kazanımına örnek hacminin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 20 µg Pb(II), 10 µg Cu(II), 5 µg Co(II) ve 5 µg Zn(II) iyonları içeren 10-125 mL aralığındaki model çözeltilerle denemeler yapılmıştır. %95 ve üzeri geri kazanım değerlerinin elde edildiği maksimum örnek hacimleri Şekil 3.16'da görüldüğü gibi; Co için 50 mL, Cu için 50 mL, Zn için 75 mL, Pb için 100 mL olarak bulunmuştur. Bu şartlar altında zenginleştirme faktörü (PF), Co için 10, Cu için 10, Zn için 15 ve Pb için 20 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.16: Analitlerin geri kazanıma numune hacminin etkisi

3.6.6.6 Yabancı İyon Etkisi

Yöntemin gerçek örneklerde uygulanabilirliğinin olması için karışık matriks ortamlarında test edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple Tablo 3.3'te görüleceği üzere, matriks ortamı oluşturulmuş ve farklı anyon ve katyonların varlığında denemeler yapılmıştır. Analitlerin aşırısının da test edildiği yöntemle Pb(II) ve Cu(II) 50 mg L⁻¹, Co(II) ve Zn(II) 40 mg L⁻¹ konsantrasyonu aştığı zaman olumsuz etki yapmaktadırlar. Bu durum belirtilen analitlerin fazlalığında, katı faz üzerinde kütle aktarımının fazla olması ile açıklanmaktadır. Geliştirilen yöntemin karışık matriks ortamlarında seçiciliğinin yüksek olduğu, geri kazanım değerlerinin %93-%98 arasında elde edildiği görülmektedir.

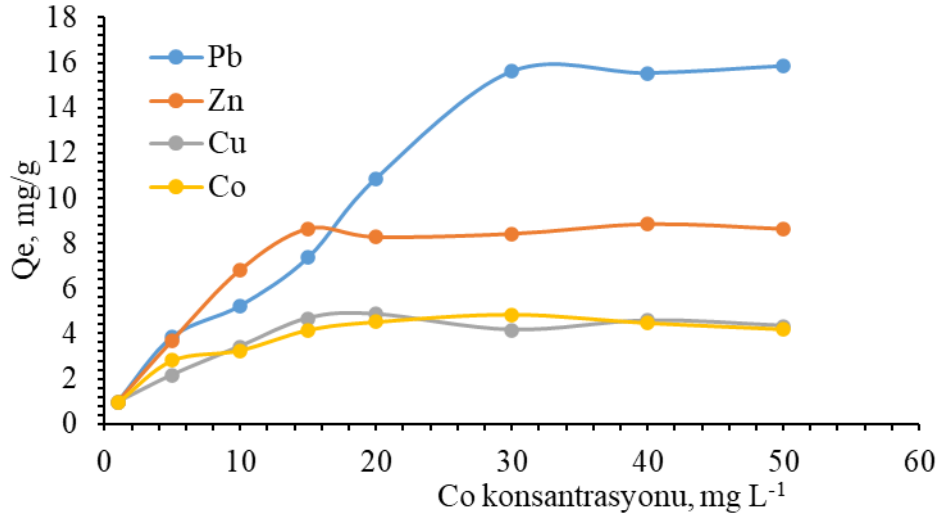
Tablo 3.3: Analitlerin geri kazanımına yabancı iyon etkisi

İyon	Eklenen	Konsantrasyon mg L ⁻¹	% Geri Kazanım			
			Pb(II)	Zn(II)	Cu(II)	Co(II)
Na ⁺	NaCl	8000	95±2	94±3	93±2	95±1
K ⁺	KCl	3000	97±1	96±1	96±2	95±1
Mg ²⁺	MgSO ₄	3000	96±2	97±2	96±2	95±1
Ca ²⁺	Ca(NO ₃) ₂ .H ₂ O	3000	98±1	95±2	96±1	95±2
Ba ²⁺	BaCl ₂ .2H ₂ O	3000	95±2	96±1	96±2	95±1
Cl ⁻	NaCl	10000	96±1	94±2	96±1	97±2
NO ₃ ⁻	Ca(NO ₃) ₂ .H ₂ O	3000	97±2	96±1	96±2	95±1
SO ₄ ²⁻	MgSO ₄	1000	96±1	95±2	96±1	92±4
CH ₃ COO ⁻	CH ₃ COONa.3H ₂ O	1000	91±4	96±1	96±2	95±1
CO ₃ ²⁻	Na ₂ CO ₃	2000	95±2	96±1	95±1	95±2
PO ₄ ²⁻	Na ₃ PO ₄	1000	96±2	95±2	93±2	95±1
Cu ²⁺	CuCl ₂ .2H ₂ O	50	95±2	98±2		95±2
Pb ²⁺	Pb(NO ₃) ₂	50		96±1	94±2	96±1
Ni ²⁺	Ni(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	40	95±2	95±2	93±3	96±1
Cd ²⁺	Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	50	95±2	91±4	95±1	95±1
Co ²⁺	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	40	96±1	93±4	96±1	
Zn ²⁺	Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	40	95±2		95±1	95±1
Mn ²⁺	MnSO ₄ .H ₂ O	40	95±1	95±2	95±1	93±2
Cr ³⁺	Cr(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	40	96±2	92±5	97±2	96±1

3.6.6.7 Adsorpsiyon Kapasitesi ve İzotermi

Katı faz kullanılarak yapılan önderiştirme işlemlerinde, katın fazın adsorpsiyon kapasitesi; metal iyonlarının kantitatif olarak önderiştirilmesinde ne kadar katı fazın gerektiği ve çalışılan çözeltinin maksimum konsantrasyon sınırını belirleyebilmek için hesaplanması gereken önemli bir optimizasyon parametresidir (Sönmez ve diğ. 2010). Fe₃O₄-8HQ MNPs'in adsorpsiyon kapasitesini bulmak için, Pb(II), Zn(II), Cu(II), Co(II) metal iyonlarının ayrı ayrı başlangıç konsantrasyonları (C₀), 1-5-10-15-20-30-40-50 mg L⁻¹ olan ve pH 8'e tamponlanmış 50 mL lik çözeltileri hazırlanarak, çözeltilere 10 mg Fe₃O₄-8HQ MNPs ilave edildi. Hazırlanan bu çözeltiler oda sıcaklığında 25 °C'de 24 saat süresince mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu süre

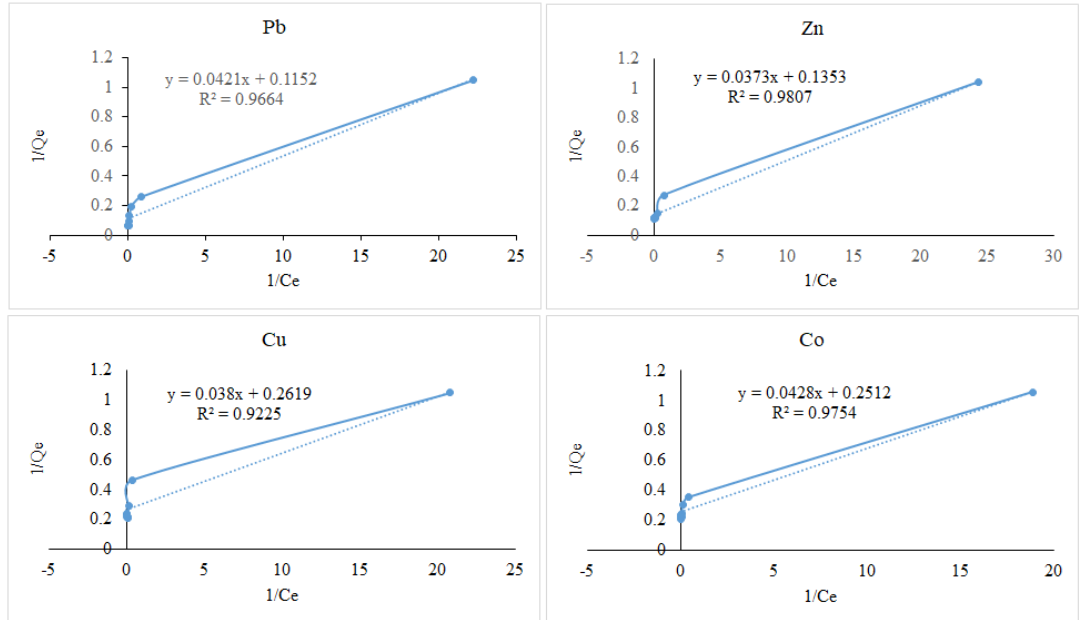
sonrasında $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-8HQ}$ MNPs neodyum mıknatıs yardımıyla çözeltiden ayrılarak, üstte kalan sıvı faz, kalibrasyon eğrisinin sınırları içerisinde kalacak biçimde seyreltilerek, analitlerin çözeltide kalan kısımları (C_e) tayin edildi. Adsorplanan analit konsantrasyonu olan Q_e , C_0 ve C_e konsantrasyonları kullanılarak hesaplandı. Adsorpsiyon kapasitesinin tayininde başlangıç konsantrasyonu C_0 'a karşı Q_e konsantrasyonu kullanılarak izoterm eğrileri çizildi (Şekil 3.17).



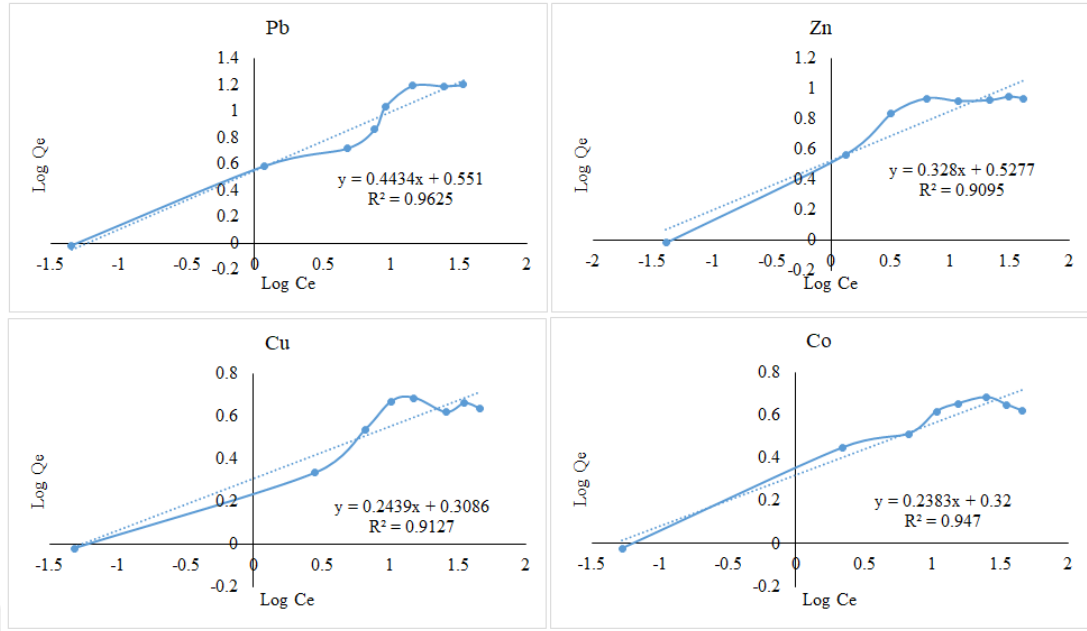
Şekil 3.17: $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-8HQ}$ MNPs'in Pb(II), Zn(II), Cu(II), Co(II) iyonları için adsorpsiyon kapasitesi

İzoterm eğrilerinde başlangıç konsantrasyonu C_0 artarken Q_e artmış sonrasında grafik bir plato oluşturmuştur. Oluşan bu platoya karşılık gelen Q_e değeri analitler için, deneysel adsorpsiyon kapasitesi olan Q_m olarak Tablo 3.4.'te verilmiştir. İzoterm eğrilerinden görüleceği üzere başlangıçta Q_e değeri hızla artmaktadır, bunun nedeni ekstraksiyon başlangıcında manyetik katı faz üzerindeki serbest uçların fazlalığı ile açıklanabilir. Plato oluşuktan sonra ise değerler hemen hemen aynı kalmıştır, bu ise $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-8HQ}$ MNPs nin analit iyonlarınca tek katmanla kaplandığını göstermektedir (Çaylak ve diğ. 2019). Adsorpsiyon kapasitesi hesabında bulunan deneysel veriler; Langmuir ve Freundlich izotermelerini belirlemek için de kullanılmıştır, bulunan değer ve sabitler Tablo 3.4.'te özetlenmiştir. Langmuir izotermi sabit sıcaklık altında çözeltide çözünmüş halde bulunan analitler ile katı faz arasındaki etkileşimi veren izoterm bağıntısıdır. Langmuir eşitliği $1/Q_e = 1/Q_m + 1/bQ_mC_e$ ile formüle edilir. Eşitlik çözülmeden önce $1/Q_e$ 'ye karşı $1/C_e$ izoterm grafiği çizildi (Şekil 3.18). İzoterm grafiğinin kesim noktası b Langmuir sabitini verir. b sabiti değerinden yararlanılarak

Q_m değeri denklemden hesaplanır. Çizilen izotermelerde R^2 değerinin 1'e yakın olması, MNP üzerinde adsorpsiyonun Langmuir izoterminde uyumlu olduğunu ve tek katmanlı adsorpsiyonun gerçekleştiğini ifade eder. Bir başka aşamada Langmuir izoterminin önemli bir faktörü olan R_L değeri ise; $C_e/Q_e = 1/(Q_m \cdot K_b) + C_e$ langmuir denklemden K_b hesaplanarak, $R_L = 1/(1 + K_b \cdot C_0)$ denkleminde yerine konarak hesaplanır. $0 < R_L < 1$ aralığında çıkan R_L değerleri ise analitlerin adsorbana göstermiş olduğu afiniteyi ifade ederek, izoterme uygunluğu göstermektedir. Bir diğer izoterm ifadesi olan Freundlich heterojen yüzeyler arasında gerçekleşen adsorpsiyonun uygunluğunu test etmektedir. Freundlich sabitleri $\text{Log}Q_e = \text{Log}K_f + (1/n)\text{Log}C_e$ izoterm denklemiyle ifade edilmektedir. Bu denklem için önce $\text{Log}Q_e$ 'ye karşılık $\text{Log}C_e$ grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.19). Grafiklerin eğimi $1/n$ değerini, kesim noktası ise $\text{Log}K_f$ sabitini vermektedir. Tablo 3.4'te gösterilen; K_f adsorpsiyon kapasitesini ifade ederken, n değerinin 1-10 arasında olması ve R^2 değerlerinin 1'e yakınlığı Freundlich izoterminde uygunluğu ve analit ile adsorban arasında düşük konsantrasyonlarda etkileşimin olduğuna işaret etmektedir (Çaylak ve diğ. 2019, Sodan ve diğ. 2020).



Şekil 3.18: Langmuir izotermi



Şekil 3.19: Freundlich izotermi

Tablo 3.4: Fe₃O₄-8HQ MNP üzerinde analit iyonlarının adsorpsiyon izoterm sabitleri

İzoterm türleri	Sabitler	Analitler			
		Pb(II)	Zn(II)	Cu(II)	Co(II)
Adsorpsiyon Kapasitesi	$Q_m \text{ mg g}^{-1}$	15.62	8.64	4.68	4.15
	$Q_m \text{ mg g}^{-1}$	24.95	18.69	6.4	5.67
Langmuir	b	0.12	0.14	0.26	0.25
	K_L	0.11	0.13	0.27	0.25
	R_L	0.23	0.33	0.20	0.21
	R^2	0.966	0.980	0.922	0.975
Freundlich	K_f	3.55	3.36	2.03	2.08
	n	2.25	3.04	4.1	4.2
	R^2	0.962	0.909	0.912	0.947

3.6.7 Yöntemin Analitik Değerlendirilmesi

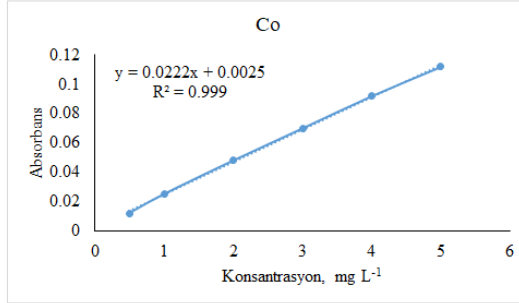
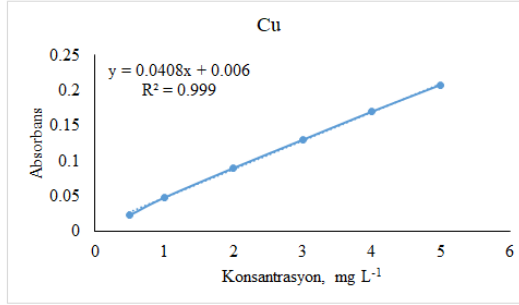
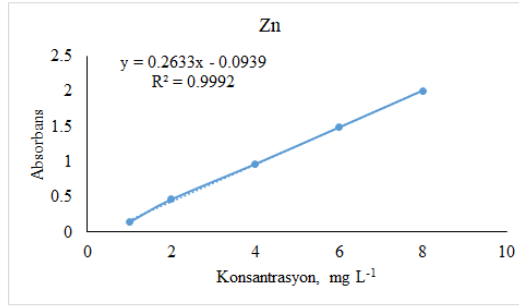
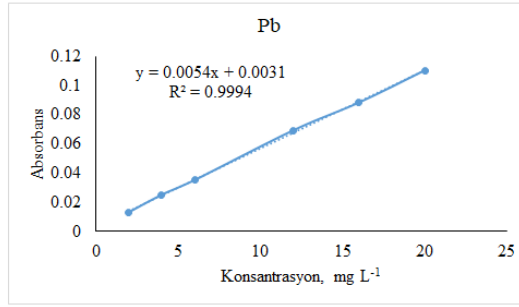
Teorik zenginleştirme faktörü olan PF (Preconcentration factor); başlangıç çözeltisinin maksimum hacminin, minimum elüent hacmine bölünmesiyle elde edilmiştir. Deneysel zenginleştirme faktörü EF (Enhancement factor) ise ön

deriştirmeli kalibrasyon eğrisinin eğiminin, ön deriştirmesiz kalibrasyon eğrisinin eğimine oranlanmasıyla elde edilmiştir (Çaylak 2019). Çalışma kapsamında 4 metal iyonu için (Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}) gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) belirlenmiştir. Bölüm 3.4.3.'te sentezlenen ve kaplanan manyetik nano parçacık; 10 mg tartılarak 2 mL pH 8 tamponu içeren 100-75-50-50 mL'lik çözeltilere eklenmiştir. 100-75-50-50 mL, 20 tekrar ölçüm çözeltilere yöntem uygulanmış ve AAS cihazı ile kör çözeltiler analiz edilmiştir. Sonuçların ortalama değeri ve standart sapmaları hesaplanmıştır. LOD değeri analiz sonuçlarının ortalamasına standart sapmanın 3 katı, LOQ değeri ise standart sapmanın 10 katı eklenerek bulunan değeri, önderiştirmeli kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine konmasıyla hesaplanmıştır. Tüketim indeksi, bir birimlik zenginleştirme faktörü için harcanan numune hacmidir ve numune hacminin, deneysel zenginleştirme faktörüne bölünmesiyle elde edilmiştir (Höl ve diğ. 2014). Önderiştirmeli ve önderiştirmesiz kalibrasyon eğrileri Şekil 3.20'de, LOD ve LOQ değeri, PF, EF, çalışma aralıkları ve eğri denklemleri Tablo 3.5'te verilmiştir.

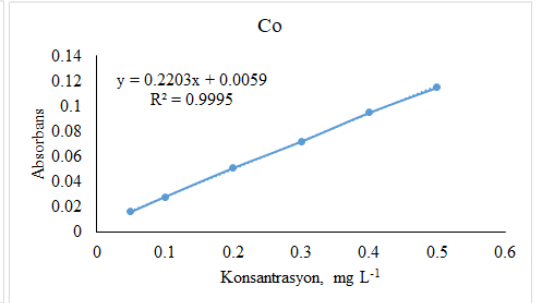
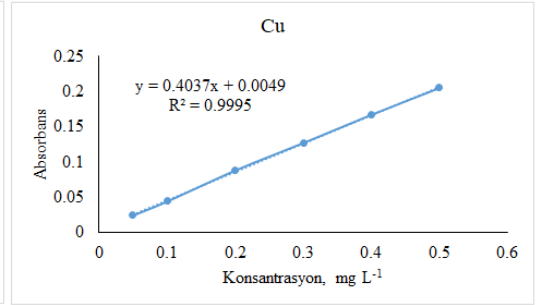
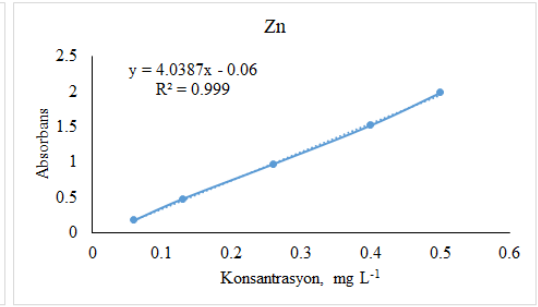
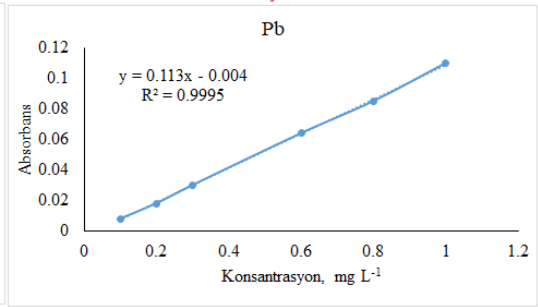
Tablo 3.5: Yöntemin analitik değerlendirmesi

Analitik parametreler	Pb(II)	Zn(II)	Cu(II)	Co(II)
Önderiştirmesiz kalibrasyon eğrisi denklem	$y=0.0054x+0.0031$	$y=0.2633x-0.0939$	$y=0.0408x+0.006$	$y=0.0222x+0.0025$
R^2	0.9994	0.9992	0.999	0.999
Önderiştirmesiz konsantrasyon aralığı (mg L ⁻¹)	2-20	1-8	0.5-5	0.5-5
Önderiştirmeli kalibrasyon eğrisi denklem	$y=0.113x-0.004$	$y=4.0387x-0.06$	$y=0.4037 +0.0049$	$y=0.2203x+0.0059$
Önderiştirmeli R^2	0.9995	0.999	0.9995	0.9995
Önderiştirmeli konsantrasyon aralığı, (mg L ⁻¹)	0.1–1	0.06–0.5	0.05–0.5	0.05–0.5
Teorik zenginleştirme faktörü (PF)	20	15	10	10
Deneysel zenginleştirme faktörü (EF)	20.9	15.3	9.8	9.9
Bağıl hata (%)	4.5	2	2	1
Gözlenebilme sınırı (mg L ⁻¹ , 3 α , n:20)	0.06	0.017	0.026	0.024
Tayin sınırı (mg L ⁻¹ , 10 α , n:20)	0.17	0.021	0.071	0.101
Örnek hacmi (mL)	100	75	50	50
Elüent hacmi (mL)	5	5	5	5
Tüketim indeksi (mL)	4.78	4.90	5.43	5.05

Önderiştirmesiz



Önderiştirmeli



Şekil 3.20: Önderiştirmesiz ve önderiştirmeli kalibrasyon eğrileri

3.6.8 Yöntemin Kesinliği ve Doğruluğu

Yöntemin kesinliğinin belirlenmesi için analitlerin geri kazanma değerlerinin tekrarlanabilirliği araştırıldı. Kesinlik değerlendirilmesi için, analit iyonlarını içeren 10 mL'lik çözeltilerin, belirlenen optimum şartlarda manyetik katı faz önderiştirme işlemi uygulanmıştır. Tablo 3.6.'da veriler, AAS cihazı ile çözeltilerin 10 kez analiz

edilmesiyle elde edilmiştir. Bağlı standart sapma değerleri %1'den düşük elde edilmiş ve yöntemin kesinliği gösterilmiştir.

Tablo 3.6: Geri kazanım değerlerinin tekrarlanabilirliği (Örnek hacmi:10 mL, pH:8)

Analitler	%Geri kazanım $\pm$ t.s/ $\sqrt{N}$	%Bağıl Standart Sapma $= (s/\bar{x}) \cdot 100$
Pb ²⁺	96.04 $\pm$ 1.34	1.39
Zn ²⁺	95.6 $\pm$ 1.08	1.12
Cu ²⁺	95.46 $\pm$ 1.16	1.21
Co ²⁺	95.43 $\pm$ 1.03	1.07

N=10, G.S= %95

Yöntemin doğruluğu, sertifikalı referans malzemeler kullanılarak test edilmiştir. Bu kapsamda NIST (Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü) tarafından deney ve kalibrasyon laboratuvarları doğruluk çalışmaları için kullanılan, QCP-QCS-1 standart referans malzemesi (EPA Method 200.8 Quality Control Standard 1), analiz edilmiştir. Tablo 3.7'de bulunan değerler student t-testi ile %95 güven seviyesinde karşılaştırılmıştır. Doğruluk çalışmasında bulunan t değerlerinin t_{kritik} :4.303 negatif değerinden büyük olması dolayısıyla, bulunan sonuçlardaki farkların yöntemdeki bir sistematik hatadan değil, belirsiz hatalardan kaynaklandığı ve değerler arasında anlamlı bir farkın olmadığı anlaşılmıştır.

Tablo 3.7: Yöntemin doğruluğu (V; Pb-100 mL, Zn-75 mL, Cu ve Co 50 mL, pH:8)

QCP-QCS-1						
Analit	Sertifikalı konsantrasyon, mg L ⁻¹	Bulunan konsantrasyon, mg L ⁻¹	Bağıl hata, %	Bağıl standart sapma, %	Geri kazanım, %	t _{deneyisel}
Pb ²⁺	200 $\pm$ 0.9 ^a	195.87 $\pm$ 16.71	-2.06	8.53	97.94	-0.78 ^b
Zn ²⁺	100 $\pm$ 0.4	93.47 $\pm$ 5.45	-6.53	5.83	93.47	-3.79
Cu ²⁺	100 $\pm$ 0.4	97.91 $\pm$ 3.87	-2.09	3.95	97.91	-1.71
Co ²⁺	100 $\pm$ 0.5	95.06 $\pm$ 4.72	-4.94	4.97	95.06	-3.31

(a) ortalama $\pm$ standart sapma, (b) student t testi %95 GS'de N:3 için t_{kritik} :4.303

3.6.9 Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

Fe_3O_4 -8HQ MNPs yöntemi; ilaç, atık su ve kompozit malzemeden Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) metal iyonlarının tayini için uygulanmıştır. İlaç örnekleri Türkiye-Uşak ilindeki eczanelerden elde edilmiştir. Temin edilen ilaç örnekleri; prostat kanseri ilacı DRG1, bağışıklık baskılayıcı DRG2-DRG3, rahim kanseri ilacı DRG4, karaciğer sirozu ilacı DRG5, koronavirüs ilacı DRG6, epilepsi ilacı DRG7, kalp hastalığı ilacı DRG8, meme kanseri ilacı DRG9 şeklinde kodlanmıştır. İlaç örneklerinden alınan bir tablet 100 mL lik balon jojelerde suda çözölmüştür. Sonrasında 0.45 μm 'lik membran filtreden süzülmüştür. Endüstriyel atık su arıtma tesisi çıkış suyu numunesi de 0.45 μm membran filtreden süzülererek analize hazırlanmıştır. Mutfak aleti üretiminde kullanılan kompozit malzeme 0.5 g tartılarak 100 mL behere alınmıştır, üzerine 8 mL kral suyu eklenerek 90 °C'de yaş yakma işlemi uygulanmıştır (Sodan ve diğ 2020). Yaş yakma sonrası çözelti 0.45 μm membran filtreden süzülererek balon jojeyle alınmış ve 100 mL hacmine tamamlanmıştır. Tüm örnekler +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Gerçek örneklerde bulunan analit konsantrasyonları yöntemin tayin sınırının altında kalmıştır. Bu sebeple örneklere 2 ve 4 mg L⁻¹ standart çözelti eklenerek MIS-FAAS cihazı ile analizler gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım değerleri %92-%98 arasında bulunmuştur (Tablo 3.8). Geliştirilen yöntem standart ekleme sonuçları da göz önüne alındığında doğrulaması yapılmış seçici bir metot olarak görölmektedir.

Tablo 3.8: MIS-FAAS ilaç, atık su, kompozit malzeme örnekleri çalışması

Örnek	Pb(II)			Zn(II)			Cu(II)			Co(II)		
	Eklenen mg L ⁻¹	Bulunan ^a mg L ⁻¹	%R	Eklenen mg L ⁻¹	Bulunan mg L ⁻¹	%R	Eklenen mg L ⁻¹	Bulunan mg L ⁻¹	%R	Eklenen mg L ⁻¹	Bulunan mg L ⁻¹	%R
DRG1	0	<LOQ ^b	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-
	2	1.85±0.35	92.5	2	1.93±0.21	96.5	2	1.96±0.23	98	2	1.88±0.29	94
	4	3.92±0.48	98	4	3.88±0.36	97	4	3.78±0.34	94.5	4	3.86±0.38	96.5
DRG2	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-
	2	1.95±0.23	97.5	2	1.89±0.19	94.5	2	1.86±0.19	93	2	1.92±0.26	96
	4	3.87±0.12	96.75	4	3.92±0.41	98	4	3.84±0.32	96	4	3.91±0.14	97.75
DRG3	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-
	2	1.87±0.43	93.5	2	1.94±0.25	97	2	1.91±0.14	95.5	2	1.89±0.32	94.5
	4	3.78±0.52	94.5	4	3.92±0.16	98	4	3.87±0.49	96.75	4	3.82±0.41	95.5
DRG4	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-
	2	1.92±0.36	96	2	1.87±0.28	93.5	2	1.89±0.35	94.5	2	1.93±0.19	96.5
	4	3.88±0.45	97	4	3.86±0.43	96.5	4	3.79±0.42	94.75	4	3.88±0.36	97
DRG5	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-
	2	1.94±0.16	97	2	1.94±0.35	97	2	1.93±0.25	96.5	2	1.95±0.21	97.5
	4	3.96±0.21	99	4	3.95±0.25	98.75	4	3.91±0.16	97.75	4	3.83±0.36	95.75
DRG6	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-
	2	1.89±0.19	94.5	2	1.96±0.17	98	2	1.94±0.27	97	2	1.94±0.17	97
	4	3.75±0.38	93.75	4	3.84±0.39	96	4	3.93±0.13	98.25	4	3.92±0.15	98
DRG7	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-
	2	1.94±0.25	97	2	1.86±0.38	93	2	1.85±0.30	92.5	2	1.87±0.34	93.5
	4	3.86±0.35	96.5	4	3.88±0.45	97	4	3.82±0.43	95.5	4	3.93±0.22	98.25
DRG8	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-
	2	1.85±0.43	92.5	2	1.93±0.14	96.5	2	1.87±0.36	93.5	2	1.96±0.16	98
	4	3.82±0.25	95.5	4	3.91±0.26	97.75	4	3.94±0.28	98.5	4	3.94±0.24	98.5
DRG9	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-
	2	1.93±0.18	96.5	2	1.95±0.23	97.5	2	1.92±0.34	96	2	1.89±0.17	94.5
	4	3.84±0.23	96	4	3.91±0.31	97.75	4	3.90±0.42	97.5	4	3.87±0.26	96.75
Atık Su	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-
	2	1.87±0.33	93.5	2	1.90±0.18	95	2	1.86±0.35	93	2	1.91±0.23	95.5
	4	3.76±0.41	94	4	3.84±0.28	96	4	3.92±0.4	98	4	3.85±0.34	96.25
Kompozit	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-	0	<LOQ	-
	2	1.85±0.26	92.5	2	1.87±0.21	93.5	2	1.89±0.32	94.5	2	1.93±0.16	96.5
	4	3.87±0.18	96.75	4	3.91±0.25	97.75	4	3.90±0.13	97.5	4	3.92±0.24	98

(a)ortalama±std.sapma N:3, b)tain sınırının altında, R:%geri kazanım)

3.6.10 Fe₃O₄-8HQ MNPs Yöntemi ile MIS-FAAS, ICP-MS Tekniklerinin Karşılaştırılması ve Literatür Değerlendirmesi

Fe₃O₄-8HQ MNPs'in kullanıldığı MSPE yöntemi parametreleri MIS-FAAS tekniği ile optimize edilmiş ve yöntemin analitik değerlendirilmesi yapılmıştır. Yöntem optimize edildikten sonra gerçek örneklerle uygulanmış ve CRM çözeltisi ile yöntemin doğruluğu kontrol edilmiştir. Fe₃O₄-8HQ MNPs'nin adsorban olarak kullanıldığı manyetik katı faz ekstraksiyonu yönteminin başka teknikler ile de çalışılabildiğini göstermek amacıyla, farklı bir teknik olan ICP-MS cihazı sonuçları ile karşılaştırılması yapılmıştır. ICP-MS analizleri EPA 200.8 standardı (EPA 200.8) kapsamında validasyonu yapılmış olan bir atık su analiz laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) için CRM çözeltisine, Fe₃O₄-8HQ MNPs kullanıldığı manyetik katı faz ekstraksiyon yöntemi uygulanarak örnekler MIS-FAAS ve ICP-MS cihazlarında analiz edilmiş ve iki teknik ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır (Tablo 3.9). ICP-MS cihazında Pb(208), Zn(66), Cu(63) ve Co(59) elementleri tayin edilmiştir. $t_{deneyse}$ 4 serbestlik derecesi olan 2.78 t_{kritik} değerinden düşük olarak bulunmuştur. t testinden iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasındaki farkın belirsiz hatalardan kaynaklandığı ve yöntemde sistematik bir hatanın olmadığı görülmüştür. İki yöntem arasında anlamlı bir fark bulunmamakla beraber, ICP-MS sonuçları, MIS-FAAS sonuçlarında daha yüksek geri kazanım, daha düşük standart sapma ve bağıl hata değerleri, daha düşük tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı ile daha tercih edilebilir bir yöntem olarak görülmektedir.

Tablo 3.9: CRM çözeltisinin MIS-FAAS ve ICP-MS ile analiz sonuçlarının karşılaştırılması

	Pb(II)	Zn(II)	Cu(II)	Co(II)
MIS-FAAS				
Sertifikalı konsantrasyon mg L ⁻¹	200±0.9 ^a	100±0.4	100±0.4	100±0.5
Bulunan konsantrasyon mg L ⁻¹	195.87±16.71	93.47±5.45	97.91±3.87	95.06±4.72
%Geri kazanım	97.93	93.47	97.91	95.06
LOD mg L ⁻¹	0.06	0.017	0.026	0.024
LOQ mg L ⁻¹	0.17	0.021	0.071	0.101
Bağıl hata %	-2.06	-6.53	-2.09	-4.94
Bağıl Standart Sapma %	8.53	5.83	3.95	4.97
ICP-MS				
	Pb(208)	Zn(66)	Cu(63)	Co(59)
Sertifikalı konsantrasyon mg L ⁻¹	200±0.9 ^a	100±0.4	100±0.4	100±0.5
Bulunan konsantrasyon mg L ⁻¹ (ICP-MS)	197.53±1.59	96.80±1.70	98.24±1.27	97.73±0.91
%Geri kazanım	98.76	96.80	98.24	97.73
LOD mg L ⁻¹	0.0022	0.0020	0.0004	0.0004
LOQ mg L ⁻¹	0.0072	0.0065	0.0015	0.0015
Bağıl hata %	-1.23	-3.20	-1.76	-2.27
Bağıl Standart Sapma %	0.804	1.75	1.29	0.93
t _{deneyse}	0.382 ^b	2.02	0.313	0.74

ortalama±standart sapma, (b) student t testi %95 GS'de N:4 (6-2) için tkritik:2.78

Tablo 3.10'da Fe₃O₄'ün farklı materyallerle kaplanarak yapılmış olan diğer çalışmalarla bir karşılaştırılması verilmiştir. Fe₃O₄-8HQ MNPs'in katı faz olarak kullanıldığı MSPE yöntemi, dört eser metal iyonunun aynı pH değerinde eş zamanlı tayinlerinin gerçekleştirildiği, farklı örnekler ve analitik teknikler ile uygulaması olan yeni bir önderleştirme tekniği olarak literatüre sunulmuştur.

Tablo 3.10: Fe₃O₄-8HQ MNPs'in kullanıldığı manyetik katı faz ekstraksiyonu yönteminin literatür ile karşılaştırılması

Adsorban	Metot	Cihaz	Örnek	Analit	Gözlenebilme sınırı, mg L ⁻¹	PF	Örnek hacmi, mL	pH	Bağıl standart sapma, %	Referans
Silika kaplı manyetik nano elmas (SiO ₂ @Fe ₃ O ₄ @NDs)	Vorkteks destekli manyetik katı faz ekstraksiyonu	FAAS	Sigara	Pb	0.0408	4	20	6	5.3	(Kanberoğlu ve diğ. 2020)
Manyetikmolibden kükürt nanokompozit (mag-MoS ₂ -Fe ₃ O ₄)	Manyetik katı faz ekstraksiyon	FAAS	Haşhaş tohumu ve papatya	Cu	0.0018	35	35	6	1.5	(Baghban, ve diğ. 2017)
Polianilin/politiyofen kopolimer kaplı manyetik nanoparçacık (Fe ₃ O ₄ @coPANI-PTH)	Manyetik katı faz ekstraksiyon	MIS- FAAS	Baharat ve sebze	Co	0.0016	60	60	10	<6	(Elçi 2021)
Polianilin/politiyofen kopolimer kaplı manyetik nanoparçacık (Fe ₃ O ₄ @polythiophene)	Manyetik katı faz ekstraksiyon	MIS- FAAS	Su, toprak ve sebze	Zn	0.001	150	150	7	1.5	(Sodan ve diğ. 2020)
				Pb	0.06	20	100		8.53	
8-Hidroksikinolin kaplı manyetik nanoparçacık (Fe ₃ O ₄ -8HQ)	Manyetik katı faz ekstraksiyon	MIS- FAAS	İlaç, atıksu ve kompozit malzeme	Cu	0.026	10	50	8	3.95	Bu çalışma
				Co	0.024	10	50		4.97	
				Zn	0.017	15	75		5.83	

4. DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ SIVI FAZ MİKROEKSTRAKSİYON TEKNİĞİ İLE METİLDOPA İLAÇ ETKEN MADDESİNİN ÖNDERİŞTİRİLMESİ VE HPLC-UV İLE TAYİNİ

4.1 Çalışmanın Amacı

Yeşil kimya konsepti kapsamında, çalışmalarda geleneksel çözücülerin kullanımıyla ilişkili çevresel sorunları en aza indirmek, maliyeti düşürmek, güvenlik ve sağlığı geliştirmek için yeşil çözücüler geliştirilmiştir (Gao ve diğ. 2018). Erime sıcaklığı 100 °C altında bulunan organik tuzlara iyonik sıvı denilmektedir. İyonik sıvılar yaygın olarak kullanılan organik çözücülere göre daha çevreci ve daha az toksik özellik göstermektedirler (Zhao ve diğ. 2005). İyonik sıvılar organik çözücülerin yerine kullanılsalar da tamamen çevreci ve yeşil çözücü olarak nitelendirilemezler. İmidazolyum ve piridinyum temelli iyonik sıvılar organik çözücülerle eşdeğer toksiteye sahiptirler. Ayrıca saf olarak kullanılmalarının gerekliliği de maliyet açısından daha az tercih edilir bir başka dezavantajlarıdır. Tüm bu arayışlar sonrasında iyonik sıvılara benzer fizikokimyasal özellikte yeni bir çözücü olarak Derin Ötektik Çözücüler (DÖÇ) kullanılmaya başlanmıştır (Matong ve diğ. 2017, Kanberoğlu ve diğ. 2019). DÖÇ ilk olarak 2003 yılında Abbott tarafından iki veya daha fazla bileşikten oluşan düşük erime noktalı kolin klorür-üre karışımı olarak çalışılmıştır (Abbott ve diğ. 2003). Düşük üretim maliyetleri, düşük toksisite, biyouyumluluk, biyo bozunabilirlik, yanmazlık, azaltılmış uçuculuk ve suyla karışabilirlik gibi özellikler, o zamandan itibaren metal işleme, kataliz, malzeme sentezi, biyodizel dönüşümü, ayırma, su arıtma teknolojileri ve elektrokimya uygulamaları için DÖÇ'lerin kullanımını teşvik etmiştir (Tang ve diğ. 2013, Wagle ve diğ. 2014).

Ötektik anlam olarak “kolayca eriyen” olarak kullanılmaktadır. İki veya daha fazla maddenin karışmasıyla, bu maddeler arasında olan etkileşimlerin kuvvetine bağlı olarak donma noktası düşmektedir. Bu şekilde karışım halinde bulunan maddelerin

belirli oranlardaki bileşimlerinin katıldığı en düşük sıcaklığa ise ötektik denilmektedir (Köksal 2016).

DÖÇ'lerin birkaç türü vardır; yaygın DÖÇ sistemleri, bir hidrojen bağı donörü (HBD), inorganik halojenür veya daha sık olarak, bir hidrojen bağı akseptörü (HBA) olarak işlev gören bir organik halojenür ile birleştirilmesiyle elde edilen büyük asimetrik iyonlarla oluşturulabilir (Emma ve diğ. 2014 ve Abbott ve diğ. 2003). DÖÇ'ler ikili karışımın bileşimine göre dört tipe ayrılmıştır: tip (I) - bir metal klorür ile bir kuaterner tuzun bir kombinasyonu, tip (II) - hidratlı bir metal klorür ile bir kuaterner tuzun bir kombinasyonu, tip (III) –kuaterner amonyum tuzu ve bir hidrojen bağı vericisi, tip (IV) bir hidrojen vericisi ile halojen metal tuzu. Tip V ise hidrofilik DÖÇ lerin yerine geliştirilmiş olan hidrofobik DÖÇ sistemi olarak literatüre girmiştir (Tablo 4.1) (Chabib ve diğ. 2022).

Tablo 4.1: Derin ötektik çözücü türleri ve formülasyonları

Tip	Birleşim Türü	Örnek	Formül
I	Metal tuzu (MCl_x)+ organik halojen tuzu (Cat^+Cl^-)	$ZnCl_2 + ChCl$	$Cat^+X^- zMCl_x$ $M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In$
II	Hidratize metal tuzu ($MCl_x \cdot yH_2O$)+ organik halojen tuzu (Cat^+Cl^-)	$CoCl_2 \cdot 6H_2O + ChCl$	$Cat^+X^- zMCl_x \cdot yH_2O$ $M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe$
III	Hidrojen bağı donörü (RZ)+ organik halojen tuzu (Cat^+Cl^-)	$\ddot{U}re + ChCl$	$Cat^+X^- zRZ$ $Z = amid, karboksilik asit, alkol grubu$
IV	Hidrojen bağı donörü (RZ) + inorganik halojen tuzu (MCl_x)	$\ddot{U}re + ZnCl_2$	$MCl_x + RZ = MCl_{x-1} + \cdot RZ + MCl_{x+1}$ $M = Al, Zn$ $Z = alkol grubu$
V	Moleküler bileşikler (Yeni tip)	Mentol + timol	İyonik olmayan DÖÇ Hidrofobik

Birçok çalışmada, DÖÇ'ler tipik olarak kolin klorürün ($ChCl$), üre, karboksilik asitler veya polioller gibi hidrojen bağı donörleri ile çözücülere veya karmaşık purifikasyon adımlarına gerek kalmadan basitçe karıştırılmasıyla hazırlanır. Bu nedenle, DÖÇ'ler, geleneksel organik çözücülerin yanı sıra iyonik çözücülerin yerini alma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, DÖÇ'ler hidrojen bağlama yetenekleri

nedeniyle genellikle hidrofiliktir ve sulu bir ortamda kolayca çözülebilir. Bu özellik, suda çözünmüş analitlerin ayrılması ve önderiştirilmesi için uygulamalarını kısıtlar. Bu nedenle, hidrofobik DÖÇ'lerin geliştirilmesine yoğun çaba sarf edilmelidir (Wang ve diğ. 2017). Hidrofilik DÖÇ lerin numune fazından ayrılmalarındaki güçlükler, stabilitelerinin düşük olması, dispersif sıvıların kullanılmasından gelen hatalar ve zorluklar neticesinde van Osch ve diğ. (2015), kuarterner amonyum tuzlarının, uzun zincirli karabosilik asitlerle karıştırılmasıyla ilk hidrofobik DÖÇ (HDÖÇ) leri elde etmiştir.

HDÖÇ'lerin sulu örneklerde çalışılmasıyla birlikte, sulu numunelerden bileşiklerin ekstraksiyonunda inanılmaz faydalar gösteren kararlı hidrofobik faz oluşmuştur. O zamandan beri, aktif araştırmalar devam etmekte ve Marrucho'nun grubu tarafından kuarterner amonyum tuzlarının mentol gibi daha doğal bileşiklerle değiştirildiği başka bir HDÖÇ ailesi de tanıtılmıştır (Ribeiro ve diğ. 2015).

Bu tez çalışmasında Metildopa ilaç etken maddesinin önderiştirilmesinde Hidrofobik DÖÇ sistemleri test edilerek, Mentol-bütanol karışımı DÖÇ olarak kullanılmıştır. Bu kapsamda su fazı ile karışmayan, kararlı, düşük yoğunluklu DÖÇ karışımı oluşturulup ilaç çözeltilerine uygulanmıştır.

4.2 Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü (HDÖÇ) Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

İlk olarak geliştirilen DÖÇ sistemleri suda çözünen ve bir dispersif çözücü yardımı ile faz ayrımının gerçekleştiği sistemlerdi. Bu sistemlerin; sulu ortamda hidrofilik yapısının bozulması, faz ayrımının gerçekleşmesinde yaşanan güçlükler, dispersif sıvı kullanımından gelen hatalar gibi bazı dezavantajları vardı. 2015 yılı sonrasında Van Osch tarafından geliştirilen Hidrofobik sistemler ise sulu ortamlarda daha kararlı, düşük yoğunluklu, düşük buhar basınçlı, dispersif sıvı faz kullanımına gerek duyulmayan sistemlerdir. Bununla birlikte, HDÖÇ'lerin hızlı gelişimi ile birlikte, literatürde yer alan bazı tartışmalı bilgiler olmuştur. HDÖÇ'leri tanımlama kriterleri konusunda, esas olarak "derin" ve "hidrofobik" tanımı konusunda iki ana tartışma vardır. Tartışmalardan biri, nötr bileşiklerle hazırlanan ötektik karışımlar için erime noktası düşüşündeki derinlik idi. Ne ötektik noktanın varlığı ne de hidrojen bağının oluşumu DÖÇ tanımlaması için yeterli bir koşul olamaz. “derin ötektik

çözücüler” ile normal ötektik çözücüler arasındaki ayrımın “derin” niteleyicide belirlendiği tartışmasız bir şekilde doğrulanmıştır. Bu nedenle, DÖÇ’ün doğru ve dar tanımı, ötektik nokta sıcaklığı ideal bir sıvı karışımdan daha düşük olan saf bileşiklerin karışımı şeklindedir (Cao ve Su. 2021, Martins ve diğ. 2019).

4.3 İlaç Etken Maddesinin Önderiştirilmesi

Metildopa; L-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-metilalanin (L-Alfa-M-Dopa), yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan, santral etkili antihipertansifler ilaç grubunda bulunan bir ilaç etken maddesidir (Alp ve diğ. 2018). İlaç etken maddelerinin biyolojik preparatlar ve farmakolojik ürünlerden (tablet, serum, şurup) tayini hem ilaç geliştirme çalışmalarında hem de tanı ve tedavi çalışmalarında önem arz etmektedir. HPLC tekniği ise ilaç etken maddelerinin tayini çalışmalarında en çok kullanılan analitik tekniklerden birisidir (Demircan 2010). Kan, idrar, serum ve tablet formları yüksek matriks içeriği nedeniyle analizi olumsuz etkileyen içeriklere sahiptir. Bu sebeple analiz öncesinde etken maddenin karışık matriks etkisinden kurtarılması gerekmektedir. Etken maddenin tayini, izolasyonu, ayrılması çalışmalarında ise mikroekstraksiyon ve HPLC teknikleri kullanılmaktadır (Alver ve diğ. 2012, Yalçın 2004).

Bu kapsamda metildopa ilaç etken maddesinin, hazırlanmış olan HDÖÇ ile sulu ortamdan mikroekstraksiyon yöntemi ile önderiştirilmesi sonrasında, HPLC-UV tekniği ile tayini çalışması yürütülmüştür. Ekstraksiyon parametreleri olan HDÖÇ türü, pH ve mol oranı, HDÖÇ hacmi, tuz etkisi, vorkteks süresi, santrifüj süresi, numune hacmi optimize edilmiş ve geliştirilen yöntem gerçek örneklerle uygulanmıştır.

4.3.1 HDÖÇ Kullanılarak İlaç Etken Maddelerinin Önderiştirilmesi ile İlgili Literatür Çalışmaları

Pasupuleti ve arkadaşları, atık su numunelerinden klorofenolleri ayırmak ve tayin etmek için yeni bir Mentol-Laktik asit bazlı DÖÇ sistemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen DÖÇ, FT-IR spektrometresiyle karakterize edildikten sonra; DÖÇ mol

oranı, DÖÇ hacmi, karıştırma ve santrifüj süresi, numune pH'ı, örnek hacmi parametreleri HPLC ile optimize edilmiştir (Pasupuleti ve diğ. 2022).

Heidari ve arkadaşları, kan plazmasından epilepsi tedavisinde kullanılan lamotrigine etken maddesini, hidrofobik ötektik çözücü karışımı kullanarak önderiştirme işlemi gerçekleştirmişlerdir. Bu kapsamda hidrojen bağı alıcı olarak kolin klorür, hidrojen bağı vericisi olarak 1-feniletanol maddesini kullanmışlardır. Metot parametreleri UV cihazı ile Derringer ve Suich simultane metot optimizasyon tekniği kullanılarak belirlenmiştir (Heidari ve diğ. 2021).

He ve arkadaşları, vorteks destekli yeni bir hidrofobik ötektik çözücü karışımı olan mentol-oktanol DÖÇ sistemi geliştirmişlerdir. Çalışma kapsamında 12 adet DÖÇ hazırlanmıştır. Bu DÖÇ sistemlerinde timol ve mentol hidrojen bağı alıcısı olarak kullanılırken, farklı asit ve alkoller ise hidrojen bağı sağlayıcısı olarak kullanılmışlardır. Çalışmada en iyi şartlar mentol-oktanol hidrofobik ötektik çözücü sistemiyle sağlanmıştır. Karakterizasyonu FT-IR spektrometresiyle yapılan DÖÇ sistemi, tiyofanat-metil ve karbendazim, fungusitlerinin HPLC ile tayini için sulu ortamda vorteks destekli sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği ile uygulanarak, metot parametreleri belirlenmiştir (He ve diğ. 2022).

Sereshti ve arkadaşları, süt örneklerinden bir antibiyotik türü olan tetrasiklin tayini için yeni bir hidrofobik çözücü önderiştirme yöntemi geliştirmişlerdir. Bu kapsamda timol ve mentolün farklı asit ve alkollerle birleşimini test etmişlerdir. HDÖÇ ekstraksiyon yönteminin karakterizasyonunu FT-IR spektrometresiyle yapmışlardır, yöntemi süt örneklerine uygulamışlardır. Süt örneklerindeki proteinleri dispersif bir çözücü ile uzaklaştırmışlardır. Timol/oktanoik asit çözücü türü, dispersif çözücü, örnek hacmi, DÖÇ hacmi, pH, tuz etkisi parametreleri optimize edilmiş ve analit HPLC-UV tekniği ile tayin edilmiştir (Sereshti ve diğ. 2020).

Pirsaheb ve arkadaşları, hastane atıklarından amoksisilin ve seftriakson antibiyotiklerini HPLC-UV tekniği ile belirlemek için yeni bir hidrofobik ötektik çözücü sistemi geliştirmişlerdir. Bu kapsamda 1-desil-3-metilimidazolyum klorür ve n-butanoik asit karışımının farklı bileşimlerinden oluşan bir ötektik karışım hazırlamışlardır. HDÖÇ ile analitler vorteks destekli sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemiyle ötektik faza alınmıştır. Ekstraksiyonda tuz etkisi çalışılmıştır ve tuz etkisiyle artan

numune hacminin, çözeltide çözünürlüğü düşen analit konsantrasyonuyla birlikte değerlendirilmesi sonucunda, tuz etkisinin geri kazanım değerlerini düşürdüğünü gözlemlemişlerdir (Pirsaheb ve diğ. 2019).

Werner, sulu fazdan aromatik aminlerin (2-kloranilin ve 4-kloranilin) HPLC-UV tekniği ile belirlenebilmesi için ultrasonik destekli dispersif sıvı-sıvı hidrofobik çözücü mikro ekstraksiyon sistemi önermiştir. Çalışmada düşük yoğunluklu triheksil(tetradecil)fosfonyum klorür ve dekanol ün ½ mol oranıyla karışımından oluşan bir hidrofobik ötektik karışım elde etmiştir. HDÖÇ'ü numunenin sulu fazında dağıtmak için ultrasonik sistem kullanılmıştır. Daha sonra fazlar, santrifüjleme ile ayrılmış, ardından sıvı faz dondurulup yüzeydeki DÖÇ fazı, kromatografi cihazına enjeksiyonundan önce metanol içerisinde çözülmüştür. Ekstraktan ve hacminin seçimi, numunenin pH'ı, ultrasonik banyo süresi, santrifüjleme süresi ve tuz ilavesi gibi çeşitli faktörler araştırılıp ve optimize edilmiştir. Yöntem musluk suyu, yağmur suyu, nehir suyu ve atık su örneklerine başarıyla uygulanmıştır (Werner 2020).

Ma ve arkadaşları, HPLC-FLD tekniği ile meyve örneklerinde difenilamin tayini için mentol bazlı yeni bir ötektik çözücü sistemi geliştirmişlerdir. Mentol hidrojen bağı alıcısı, oktanoik asit ise hidrojen bağı vericisi olarak yeni ultrasonik destekli hidrofobik ötektik çözücü mikroekstraksiyon sistemi önerip, DÖÇ tipi, pH, DÖÇ hacmi, mol oranı parametreleri HPLC-FLD tekniği ile optimize edilmiştir (Ma ve diğ. 2021).

Yuvalı ve arkadaşları, eritrosinin (E127) kan, idrar, şurup ve tablet örneklerinden ultrasonik destekli UV-VIS sıvı-sıvı ekstraksiyonu için hidrofobik DÖÇ mikroekstraksiyon sistemi önermişlerdir. 1-2 oranında hazırlanmış olan tetrabütil amonyum bromür (TBABr) ve 1-oktanol DÖÇ sistemini ilk olarak H-NMR, FT-IR, C-NMR teknikleriyle karakterize etmişlerdir. Çalışmada numune çözeltisinin pH'ı, DÖÇ bileşenlerinin mol oranı, DÖÇ hacmi, ultrasonik tabanlı ekstraksiyon süresi, numune hacmi ve tuz etkisi gibi önemli analitik değişkenlerin etkisi optimize edilmiştir (Yuvalı ve diğ. 2021).

4.4 Deneysel Bölüm

4.4.1 Kullanılan Aletler

Derin ötektik çözücü hazırlanması aşamasında, IKA marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, ultrasonik banyo, vorteks karıştırıcı (Staufen, Almanya), NF800R Nüve santrifüj cihazı (Ankara, Türkiye), ultrasafsu cihazı (Merc Millipore, Burlington, Massachusetts, USA) kullanılmıştır. pH ayarlamalarında HQ411D Hach pH metre cihazı (Ames, Iowa, ABD) kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmaları; ATR ekimani uyumlu Perkin Elmer Spektrum Two FT-IR cihazında yapılmıştır. Metildopa ilaç etken maddesinin maksimum absorbans yaptığı dalga boyu (λ_{max}) belirlenmesi Shimadzu UV-1800 spektrofotometre, etken maddenin tespiti ve metot parametrelerinin optimizasyonu için Agilent 1260 Infinity HPLC-UV cihazı kullanılmıştır.

4.4.2 Reaktif ve Standart Çözeltiler

L-Alfa-Metildopa (M-Dopa) United States Pharmacopeia (USP) Reference Standardı, trifloroasetik asit ($\geq 99,0\%$), metanol ($\geq 99,9\%$) ve asetonitril ($\geq 99,9\%$) Sigma-Aldrich (İstanbul, Türkiye)'den satın alındı. Bu çalışmada kullanılan metildopa tabletleri (Alfamet, 250 mg) yerel bir eczaneden (Uşak, Türkiye) satın alınmıştır. Hidroklorik asit (37%), sodyum hidroksit Sigma-Aldrich (İstanbul, Türkiye), L(+)-laktik asit, bütanol-1 (Carlo elba reagents, Fransa), hekzanoik asit, mentol Sigma-Aldrich Chemie GmbH'den (İstanbul, Türkiye), glikolik asit (Boston chemical, Kanada), dekanolik asit (BLD pharmatech, Çin), betain Sigma-Aldrich (İstanbul, Türkiye) temin edilmiştir.

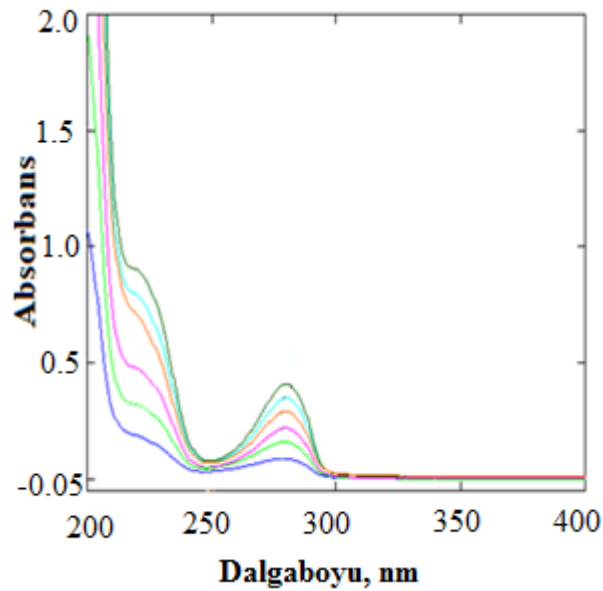
25 mg metildopa United States Pharmacopeia (USP) Reference Standardı hassas bir şekilde tartıldı ve 50 mL'lik bir ölçülü balona aktarıldı ve 30 mL metanol ile çözüldü, berrak bir çözelti elde edilene kadar ultrasonik banyoda bekletildi, oda sıcaklığına (25°C) dengelendi ve metanol ile hacim 50 mL ye tamamlandı. Hazırlanan bu stok standart çözeltiden, metildopa konsantrasyonu 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde ultra saf su ile seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

4.4.3 Tablet Örnek Çözeltilisinin Hazırlanması

Beş tane tablet hassas bir şekilde tartıldı. Kuru ve temiz bir havan içerisinde ince bir toz haline getirildi. Daha sonra 50 mg Metildopa'ya eşdeğer tablet tozu 100 mL'lik bir ölçülü bir balona aktarıldı. Yaklaşık 50 mL ultra saf su ilave edildi ve tamamen çözünmenin sağlanması için 20 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Hacim ultra saf su ile tamamlandı. Karışım 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi, ardından 0.45 µm'lik bir membran filtreden süzüldü. Hazırlanan stok numune çözeltisinden ultra saf su ile seyreltilerek 20 µg mL⁻¹ konsantrasyonda numune çözeltisi hazırlandı.

4.4.4 Metildopa İlaç Etken Maddesinin Maksimum Absorbans Yaptığı Dalga Boyu (λ_{max}) Belirlenmesi

Ultra saf su içinde 5-30 µg mL⁻¹ konsantrasyon aralığında standart metildopa çözeltileri bir UV spektrofotometre cihazında 200-400 nm dalga boyu aralığında tarandı. Metildopanın, maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 280 nm olarak tespit edildi. Standartların çakıştırılmış spektrumu Şekil 4.1 de verilmiştir.



Şekil 4.1: Metildopa standart çözeltilerinin (5-30 µg mL⁻¹) üst üste çakıştırılmış UV spektrumları

4.4.5 Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Yöntemin Optimizasyonu

Kromatografik koşullar, mobil faz bileşimi, mobil faz akış hızı, mobil faz pH'ı ve kolon tipi gibi çeşitli faktörlerle optimize edilmiştir. Kromatografik koşulların optimizasyonu, simetrik bir pik şekli, kısa bir alıkonma süresi ve kuyruklanma faktörü gibi pik parametrelerinin yanı sıra yüksek teorik tabak sayısı elde etmek için gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak farklı oranlarda su:metanol ve su:asetonitril karışımları test edilmiştir. Sabit faz olarak, farklı uzunluklarındaki C18 ve C8 kolonları kullanılmıştır.

Mobil faz olarak, başlangıçta 5-95 (v/v) asetonitril ve su karışımı kullanılmıştır. Bu şartlar altında uzun analiz süreleri elde edilmiştir. Mobil faz daha sonra trifloroasetik asit ile asitlendirildi ve analiz yöntemini belirlemek için farklı akış hızları kullanıldı. Hem numune çözeltilerinde metildopa pikine müdahale edebilecek safsızlıkları görmek hem de belirtilen koşullar altında kolonda çok daha uzun süre matriks bileşeni kalmadığından emin olmak için numune çözeltisi 60 dakika boyunca analiz edildi. 5 dakikalık analiz süresi içerisinde bir yabancı pike rastlanmamıştır. Tüm bunlardan dolayı analiz süresi 5 dk olarak belirlenmiştir.

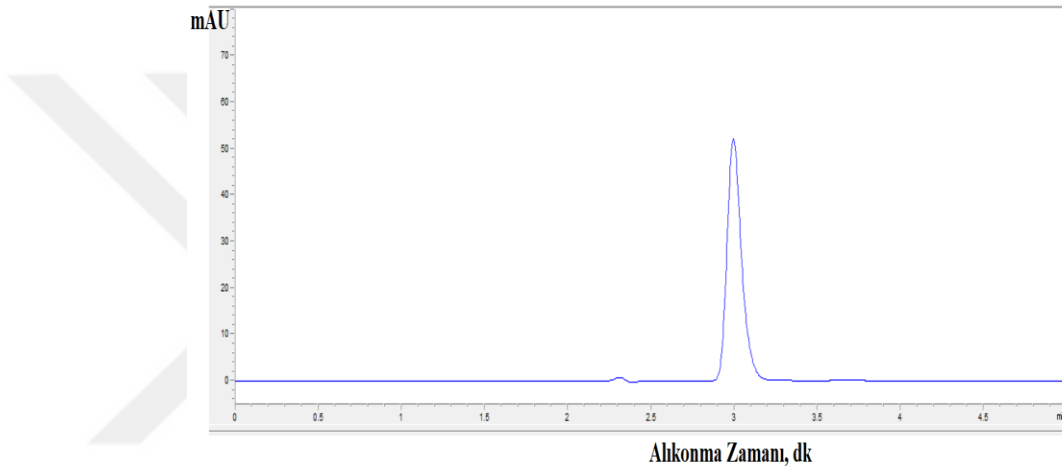
Analizler için boyutları 250 × 4.6 mm, tanecik boyutu 5 µm olan bir C18 analitik kolon kullanıldı ve ayırmalar 30°C'de gerçekleştirildi. Mobil faz A, %0.1 trifloroasetik asit içeren sulu çözelti (%90) ve Mobil faz B, asetonitril (%10) oluşan bir mobil faz ile izokratik elüsyon uygulandı. Mobil faz A'nın pH değeri 2.03 olarak ölçüldü. Akış hızı 1.2 mL dak⁻¹ ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlandı. Belirlenen bu şartlarda metildopanın alıkonma zamanı 3.035 dk. olarak belirlendi.

4.4.6 Kromatografik Yöntemin Validasyonu

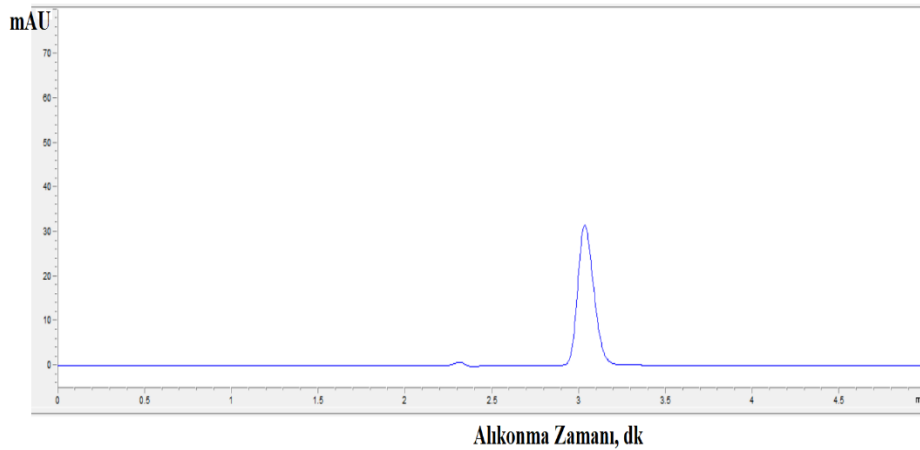
Analitik yöntem, Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı'nın analitik yöntemlerin geçerliliğine ilişkin tavsiyelerine (ICH Q2(R1) 2005) uygun olarak valide edilmiştir. Validasyon parametrelerinden (Seçicilik, doğrusallık, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ), kesinlik, doğruluk ve yöntem sağlamlığı) araştırılmıştır. Bu hususlara dayalı olarak validasyon yöntemi için belirli bir konsantrasyon aralığı 5-30 µg mL⁻¹ seçilmiştir.

4.4.6.1 Yöntemin Seçiciliği

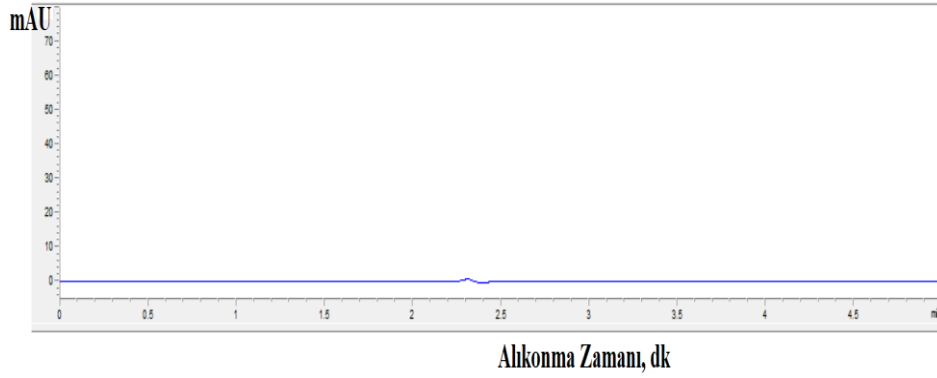
Yöntem seçiciliği ilaç etken maddesi ve kör çözelti kromatogramlarına etki edebilecek herhangi bir safsızlık ve girişim pikinin olmamasını ifade eder. Bu kapsamda seçicilik konsantrasyonu $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan standart referans malzeme çözeltisi, konsantrasyonu $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan numune çözeltisi ve kör çözeltinin sisteme enjeksiyonu ile değerlendirildi. Herhangi bir farklı pik ve girişim 3 enjeksiyonda da gözlenmedi (Şekil 4.2, 4.3, 4.4). Alıkonma süresi metildopa için 3.035 dakika olarak tespit edildi. Yöntemin çalışılan metildopa etken maddesine seçici olduğu görüldü.



Şekil 4.2: Metildopa standart çözeltisine ait kromatogram ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$)



Şekil 4.3: Metildopa içeren numune çözeltisine ait kromatogram ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$)



Şekil 4.4: Kör çözeltiye ait kromatogram

4.4.6.2 Yöntemin Doğrusallığı

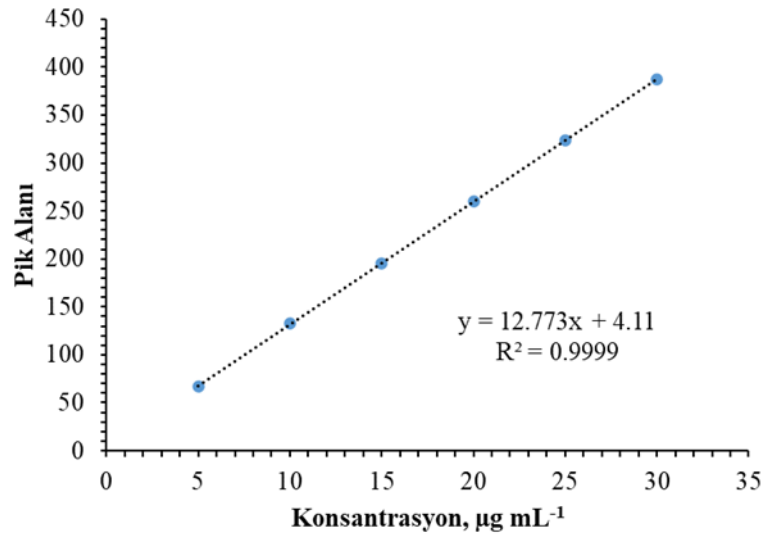
Kalibrasyon doğrusal aralığı daha az standart referans malzeme kullanmak ve kütle dedektöründe yoğun kirliliğin oluşmasını önlemek amacı ile 5-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında oluşturuldu. 5-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarında metildopa standart çözeltilerinden üç tekrarlı, kromatografik sisteme enjekte edilerek, pik alanı ve alıkonma süreleri kaydedildi. Her bir konsantrasyon düzeyi için pik alanlarının ortalama değerleri belirlendi. Kalibrasyon eğrisi; pik alanına karşı konsantrasyon grafiği çizilerek (Şekil 4.5) oluşturulmuştur. Yöntemin doğrusallığı regresyon analizi ve en küçük kareler yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. Regresyon analizi sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir. Regresyon analizi sonucu korelasyon katsayısı 0.9999 olarak bulundu. Standart çözeltilerin üst üste çakıştırılmış kromatogramları (5-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) Şekil 4.6’da verilmiştir. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

$\text{LOD veya LOQ} = \kappa \text{SDa}/b$ (LOD için $\kappa = 3$ ve LOQ için $\kappa = 10$)
SDa kesmenin standart sapmasını ve b eğimi temsil etmektedir.

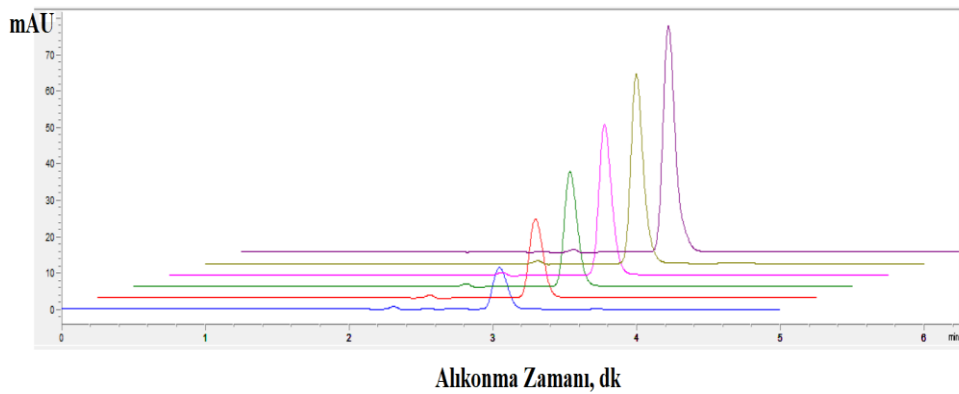
LOD: 0.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve LOQ: 1.20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirlendi.

Tablo 4.2: Regresyon analizi verileri

Parametre	Değer
Doğrusallık aralığı, $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 6$)	5–30
Regresyon denkleminin eğimi	12.773
Regresyon denkleminin kayması	4.110
Kesimin standart sapması	1.537
Korelasyon katsayısı	0.9999
Alıkonma zamanı dak.	3.035
Gözlenebilme sınırı (LOD), $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.40
Tayin sınırı (LOQ), $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.20



Şekil 4.5: Metildopaya ait kalibrasyon grafiği



Şekil 4.6: Metildopa standart çözeltilerinin üst üste çakıştırılmış kromatogramı (çözeltili konsantrasyonları: 5-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

4.4.6.3 Yöntemin Doğruluğu

Yöntem doğruluğu analiz sonuçlarının gerçek değere olan yakınlığını gösterir, yöntem doğruluğu mutlak ve bağıl hata ile ifade edilir. Yöntem doğruluğu ayrıca, numuneye eklenen analitin, matriks ortamından ne ölçüde geri kazanıldığı ile yüzde geri kazanım ve bağıl standart sapma ile de gösterilmektedir. Önerilen yöntemin doğruluğunu kanıtlamak için standart ekleme tekniği uygulandı. Numune çözeltisine üç farklı miktarda metildopa standardı eklenerek belirlendi. Analit konsantrasyonunun ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) sırasıyla %80, %100 ve %120'si olacak şekilde 16, 20, 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarında standart madde eklendi. Her bir konsantrasyonda, bu numune analizleri üç tekrar halinde yapıldı ve % geri kazanım değerleri ve bağıl hata değerleri hesaplandı. Geri kazanım %99.00-100.31 aralığında değiştiği gözlemlenmiştir. RSD ve bağıl hata sonuçları %1'den düşük olarak tespit edilerek, yöntemin doğruluğu kontrol edilmiştir. Doğruluk çalışmasına ait sonuçlar Tablo 4.3'te sunulmuştur.

Tablo 4.3: HPLC yönteminin doğruluğu

Eklenen Konsantrasyon, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Bulunan Konsantrasyon, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Geri Kazanım, %	Bağıl Hata, %	Bağıl Standart Sapma, %
16	15.84	99.00		
16	15.94	99.63	-0.004	0.659
16	16.05	100.31		
20	19.88	99.40		
20	19.91	99.55	-0.003	0.398
20	20.03	100.15		
24	24.04	100.17		
24	23.90	99.58	-0.003	0.412
24	23.85	99.38		

4.4.6.4 Yöntemin Kesinliği

Yöntemin kesinliği, pik alanlarının ve alıkonma zamanlarının tekrarlanabilirliğinin standart sapması ve bağıl standart sapması değerlendirilerek gösterilmiştir. Gün içi tekrarlanabilirlik, standart çözeltinin ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) üç kez

enjeksiyonundan elde edilen pik alanlarının bağıl standart sapması (RSD %) belirlenerek aynı gün değerlendirilmiştir. Günler arası tekrarlanabilirlik için aynı standart ardışık üç gün boyunca günde üç kez enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarının bağıl standart sapması belirlenerek değerlendirilmiştir. Bağıl standart sapması (RSD) sırasıyla %0.5203 ve %0.5911 bulundu (Tablo 4.4). Önerilen HPLC yöntemiyle %1'den küçük RSD değerleri elde edildiği için kabul edilir bulunmuştur. Elde edilen veriler, validasyon gereksinimleri için yöntemin kesinliğini göstermektedir.

Tablo 4.4: HPLC yönteminin kesinliği

Gün içi tekrarlanabilirlik			Günler arası tekrarlanabilirlik		
Örnek No	Alıkonma Zamanı, dk.	Pik Alanı	Örnek No	Alıkonma Zamanı, dk.	Pik Alanı
1	3.041	260.17	1	3.035	260.80
2	3.044	259.86	2	3.026	258.30
3	3.035	262.35	3	3.040	262.21
Ortalama	3.040	260.79	4	3.030	258.32
Standart Sapma	0.0046	1.3570	5	3.026	262.15
Bağıl Standart Sapma, %	0.1507	0.5203	6	3.042	261.33
			7	3.029	258.94
			8	3.033	259.37
			9	3.035	260.35
			Ortalama	3.033	260.20
			Standart Sapma	0.0056	1.5380
			Bağıl Standart Sapma, %	0.1850	0.5911

4.4.6.5 Yöntemin Uygunluğu

Simetri faktörü ve alıkonma zamanı, teorik tabaka sayıları gibi sistem uygunluğunu değerlendirmek için birincil parametreler metildopa için en düşük ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), orta ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) ve en yüksek ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) konsantrasyonları için belirlendi ve sonuçlar Tablo 4.5'te verilmiştir. Bulunan sonuçlar ICH ve FDA'nın limitleri olan kurulanma faktörü <2 , teorik tabaka sayısı >2000 , RSD <2 değerleri ile karşılaştırıldığında, hedef analit metildopa analizi için kabul edilir düzeydedir.

Tablo 4. 5: Sistem uygunluğu için sonuçlar

Sistem uygunluk parametreleri	Standart Çözelti Konsantrasyonları, $\mu\text{g mL}^{-1}$		
	5	15	30
Simetri faktörü	0.7408	0.7410	0.7413
Pik alanlarının bağıl standart sapması, %	0.1860	0.1764	0.1635
Alıkonma sürelerinin bağıl standart sapması, %	0.0746	0.0638	0.0621
Teorik tabaka sayısı (N)	5474	5479	5485

4.4.6.6 Yöntemin Sağlamlığı

Bir yönteme ait parametrelerin, yapılan küçük değişimlerden etkilenmeden kalabildiğinin ölçüsü analitik yöntemin sağlamlığı olarak bilinir (Daş 2023). Sağlamlık çalışması verileri, geliştirilen yöntemin alıkonma zamanının, ve kesinliğinin kritik yöntem parametrelerindeki küçük değişikliklerden etkilenmediğini göstermektedir. Metildopa etken maddesinin tayininde, sağlamlığı incelemek için kromatografik koşullardaki bazı değişkenlerin (sıcaklık değişimleri, akış hızı, asetonitril içeriği ve pH değeri) alıkonma süresi ve RSD üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Tüm değişim parametrelerinde RSD seviyesi %2'den düşük olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.6: Sağlamlık verileri

Sağlamlık Parametreleri	Parametre Değeri	Alıkonma Süresi Ortalama (3.035 dk.)	Bağıl Standart Sapma %
Mobil faz akış hızı	0.90 mL dk ⁻¹	3.24	1.12
	1.10 mL dk ⁻¹	2.96	0.49
Kolon sıcaklığı	28 °C	3.16	0.61
	32 °C	3.11	0.32
Mobil fazdaki asetonitril içeriği	% 8	3.42	0.52
	% 12	2.74	0.87
pH	1.90	3.04	1.2
	2.10	3.03	1.04

4.4.7 Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü Hazırlanması

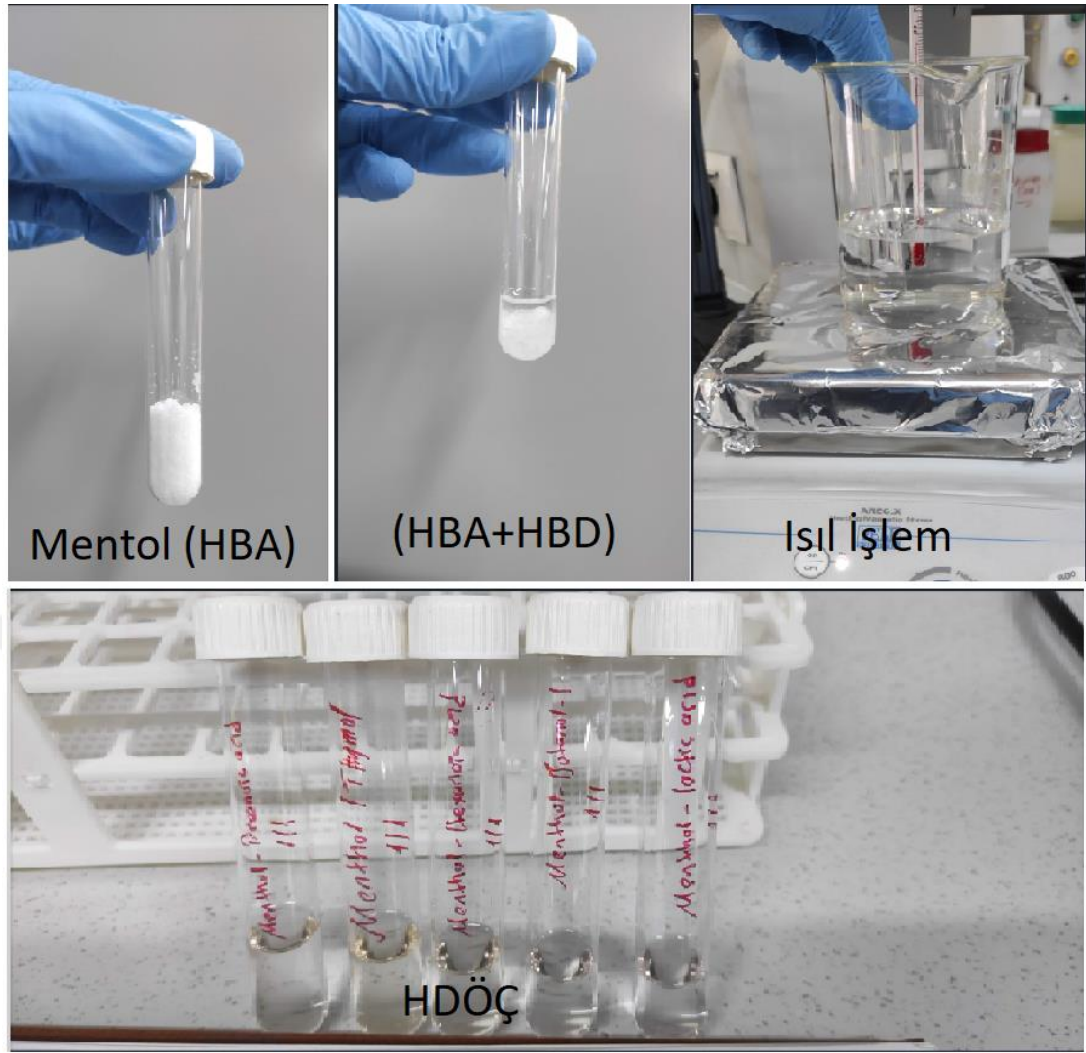
DÖÇ'leri hazırlamanın en kolay yolu, hidrojen bağı akseptörleri (HBA) ve hidrojen bağı donörleri (HBD) karıştırmaktır. "Isıtma ve karıştırma yöntemi" olarak adlandırılan DÖÇ'leri hazırlamanın en yaygın yolu, homojen sıvı oluşana kadar iki veya daha fazla bileşeni daha yüksek bir sıcaklıkta (genellikle 80 °C) karıştırmaktır. Bu yöntem 2003 yılında Abbott tarafından önerildi (Jagirani ve Soylak 2022).

Tez çalışması kapsamında Tablo 4.7’de belirtilen 5 adet Mentol bazlı HDÖÇ hazırlanmıştır.

Tablo 4.7: Hidrofobik derin ötektik çözücü türlerinin hazırlanması

Hidrojen bağı akseptörü	Hidrojen bağı donörü	Mol oranı	Sıcaklık, °C	Süre, dk.	pH
Mentol	Dekanoik asit	1-1	40	7	4
Mentol	Hekzanoik asit	1-1	40	5	3.5
Mentol	Laktik asit	1-1	40	7	4.5
Mentol	Timol	1-1	70	15	3.5
Mentol	1-Bütanol	1-1	40	5	4.5

Kimyasallar analitik saflıkta kullanılmış olup, 1-1 mol oranı ile karıştırılıp homojenize oluncaya kadar ısıtma işlemi tabi tutulmuşlardır. Çözelti ısıtma işlemi sonrasında karışımın tamamlanması için 3 dk. boyunca vorktekte karıştırılmıştır. İşlemler sonucunda Şekil 4.7’de görüleceği üzere berrak ve homojen HDÖÇ karışımları elde edilmiştir.

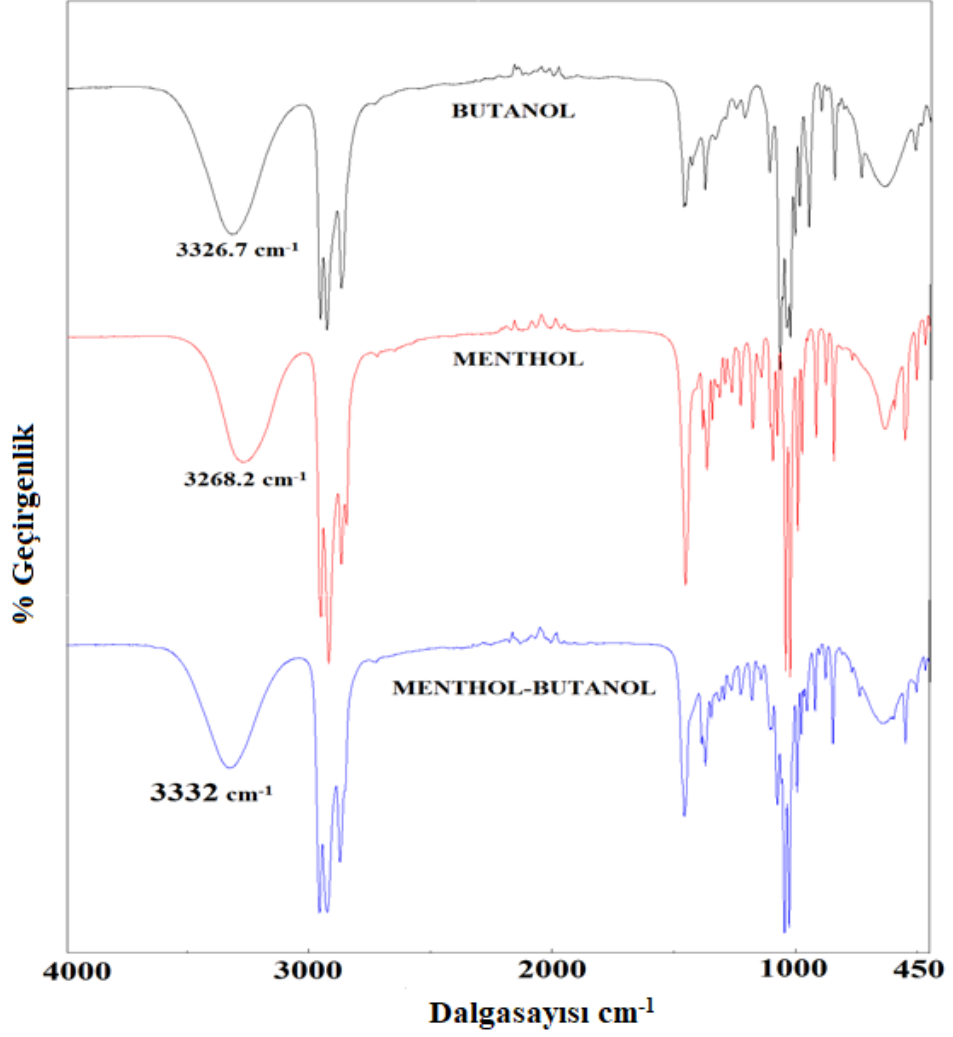


Şekil 4.7: Hidrofobik derin ötektik çözücü hazırlık aşamaları

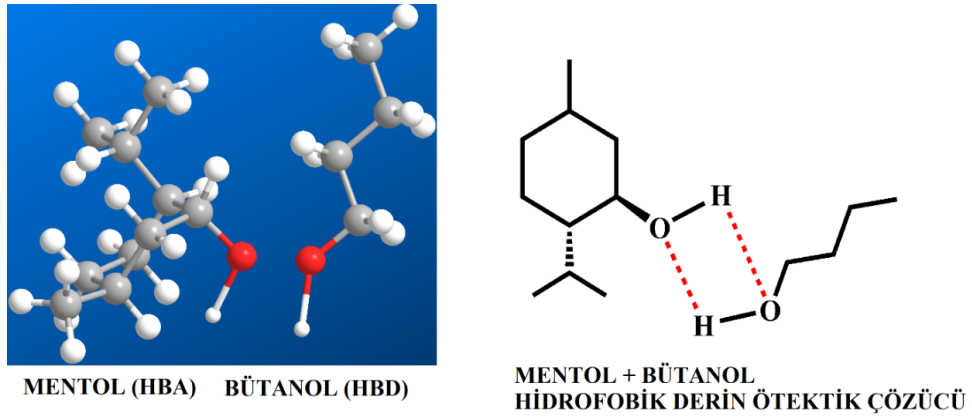
4.4.8 Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü Karakterizasyonu

HDÖÇ karakterizasyon çalışmalarında FT-IR analizi yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Mentol için, Fan ve arkadaşları hidroksil grubu pikini 3232.381 cm^{-1} de karakteristik olarak ölçmüştür, Mentol-Bütanol HDÖÇ karışımı için ise hidrojen bağı için belirlenen 3232.381 cm^{-1} den 3325.204 cm^{-1} 'ye kaydığını belirlemiştir. Tespit edilen bu kayma HDÖÇ karışımının oluştuğunu göstermektedir (Fan ve diğ. 2021). Tez çalışmasında kullanılan HBA (Mentol) ve HBD (Bütanol) arasındaki hidrojen bağı oluşumunu kanıtlamak için FT-IR spekturumları alındı (Şekil 4.8). Hidrojen bağı δ^+ yüklü bir kovalent bağa bağlı bir hidrojen atomu ile elektronegatifliği yüksek; O, F, Cl gibi atomlar ile oluşur. Hidrojen bağı; erime noktası, kaynama noktası gibi

maddelerin fiziksel özelliklerinde değişimlerde önemli etki yapar. Mentol ve bütanol üç boyutlu molekül yapıları ve hidrojen bağı oluşumu Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Bütanol için OH piki 3326.7 cm^{-1} , mentol için OH piki 3268.2 cm^{-1} olarak ölçülürken, mentol-bütanol karışımı için 3332 cm^{-1} olarak ölçülmüştür. Pikteki bu kayma oluşan yeni hidrojen bağı göstermekte ve yeni HDÖÇ karışımının varlığını desteklemektedir.



Şekil 4.8: Bütanol, mentol, mentol-bütanol FT-IR spekturumları



Şekil 4.9: Mentol ve bütanol üç boyutlu molekülleri ve hidrojen bağı oluşumu

4.4.9 HDÖÇ Mikroekstraksiyon Yöntemiyle Metildopa İlaç Etken Maddesinin Önderiştirilmesi ve HPLC ile Tayini

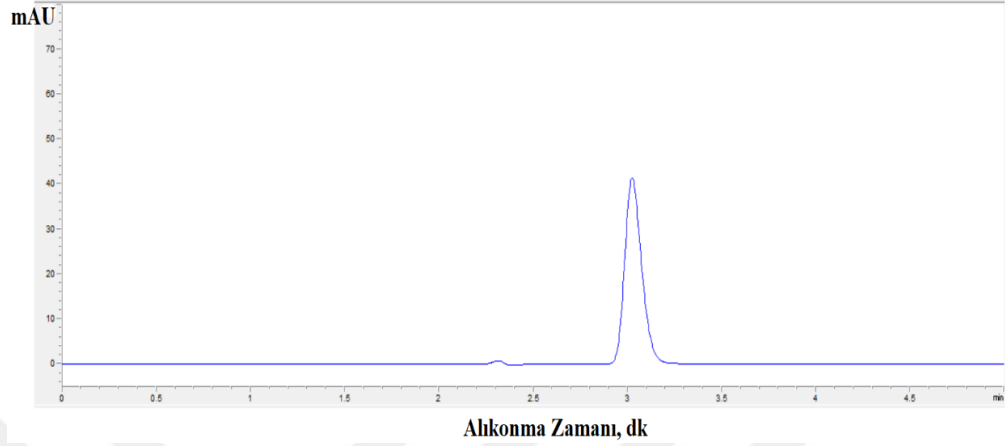
4.4.9.1 HPLC Şartlarının Belirlenmesi

Tez çalışmasında; bölüm 4.4.7’de anlatıldığı gibi hazırlanan HDÖÇ karışımları metildopa ilaç etken maddesinin önderiştirilmesinde kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklandı. Metildopa ilaç etken maddesi stok çözeltisi, standart referans malzemesinden konsantrasyonu 500 mg L⁻¹ olacak şekilde metanol ile çözülerek hazırlandı. Metildopa ilaç etken maddesi tayini için ilk olarak etken maddenin UV spektrofotometre ile UV spektrumunu alındı ve maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu λ_{max} :280 nm olarak tespit edildi. Sonrasında ise HPLC-UV cihazında tayin için kromatografik metot oluşturulmuş ve metot parametreleri Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.8: HPLC-UV metot parametreleri

Parametre	
Kolon	Agilent 250×4.6 mm, 5 μ m, C18
Mobil faz	%0.1 Trifloroasetikasit içeren H ₂ O:Asetonitril (90:10, v/v)
Akış hızı	1.2 mL dk. ⁻¹
Kolon sıcaklığı	30 °C
Dalga boyu	280 nm
Enjeksiyon hacmi	20 μ L

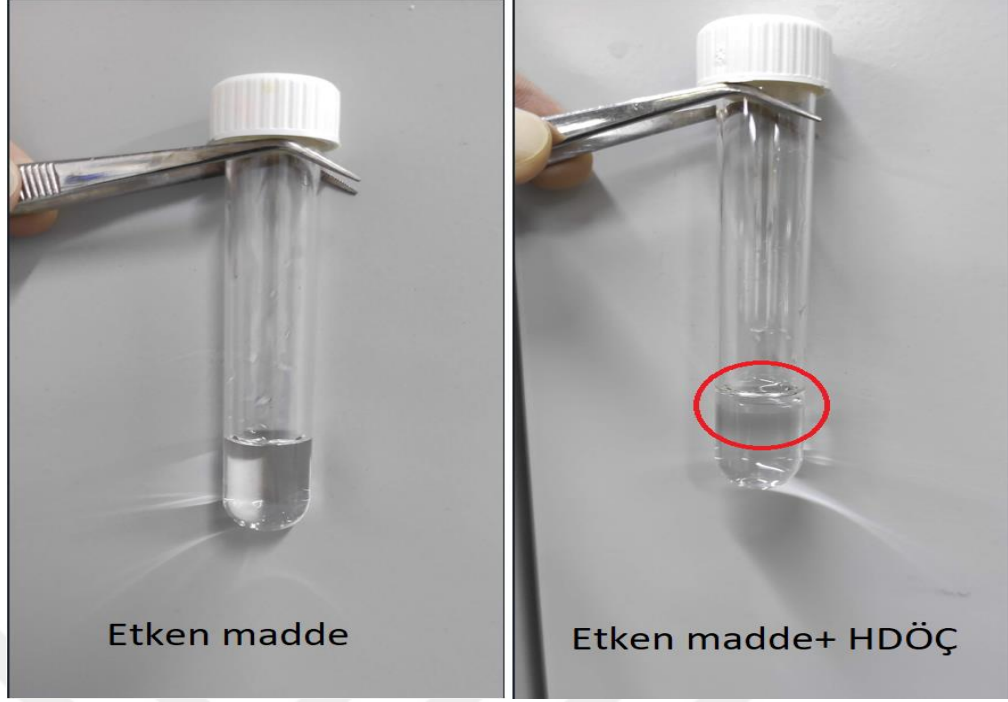
Belirlenen kromatografik şartlarda elde edilen metildopaya ait kromatogram Şekil 4.10'da verilmiştir. Metildopanin alıkonma zamanı 3.035 dakika olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4Hata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı..**10**: Metildopa HPLC kromatogramı

4.4.9.1 HDÖÇ Mikroekstraksiyon Yöntemi

Önderiştirme işlemi, stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanan 20 mg L^{-1} konsantrasyonundaki çözeltilere uygulanarak HPLC-UV ile geri kazanım değerleri hesaplandı. 20 mg L^{-1} ilaç etken maddesi çözeltisinden, 14 mL'lik plastik kapaklı tüplere 3 mL mikropipet yardımıyla konuldu. Çözelti üzerine 300 μL HDÖÇ çözeltisi ilave edildi. Çözelti pH'ı 0.01 M HCl ve 0.01 M NaOH çözeltileri ile ayarlandı. Etken madde ve HDÖÇ karışımı vorteks yardımıyla karıştırıldı. Sonrasında çözelti içerisinde dağılan HDÖÇ karışımı santrifüjlenerek faz ayrımının tamamlanması sağlandı (Şekil 4.11). Santrifüj işlemi sonrasında ayrılan HDÖÇ fazından 300 μL mikropipet yardımıyla alınarak cam vial konuldu ve metanol ile 900 μL 'ye tamamlandı. Analize hazırlanan son çözelti HPLC-UV analizi için $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi.



Şekil 4.11: Etken madde-HDÖÇ faz ayrımı

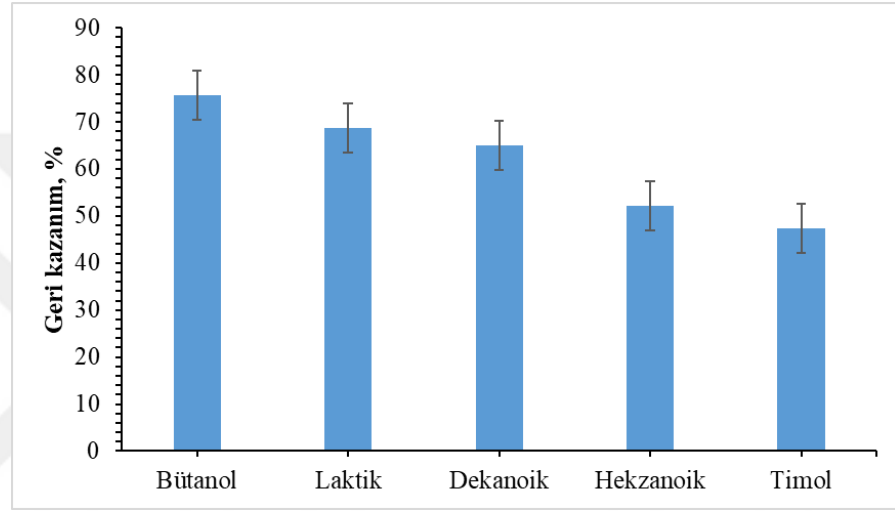
4.4.10 Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü Ekstraksiyonu Yönteminin Optimizasyonu

Metildopa ilaç etken maddesinin tablet formundan, karışık matriks ortamından ekstraksiyonu için mentol bazlı hidrofobik derin ötektik çözücü sıvı faz mikroekstraksiyon tekniği geliştirilmiştir. Bu kapsamda, ekstraksiyon parametreleri olan HDÖÇ türü, çözelti pH'ı, HDÖÇ mol oranı, HDÖÇ hacmi, tuz etkisi, vorkteks süresi, santrifüj süresi, numune hacmi parametreleri incelenmiş ve geliştirilen yöntem gerçek örneklerle uygulanmıştır. Önderiştirilen metildopa etken maddesinin tayini, metot validasyonu yapılan HPLC-UV cihazı ile belirlenmiştir.

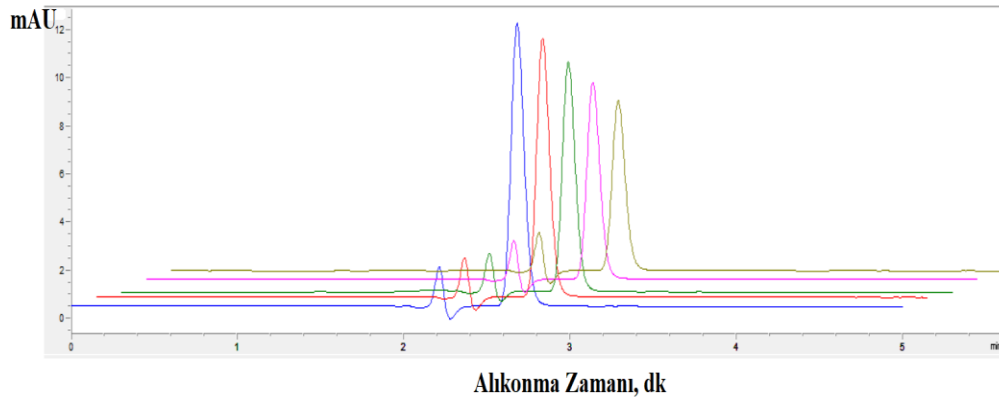
4.4.10.1 Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü Türü Etkisi

Çalışma kapsamında hazırlanan mentol-bütanol, mentol-laktik asit, mentol-dekanoik asit, mentol-hekzanoik asit, mentol-timol HDÖÇ karışımları, 1-1 mol oranında, bölüm 4.4.9'da oluşturulmuş olan yöntemle ilaç etken maddesi çözeltisine uygulanarak geri kazanım değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.12'de verilmiştir.

HPLC-UV kromatogramları ise Şekil 4.13’de verilmiştir. Mentol-bütanol hidrofobik derin ötektik çözücü karışımı kullanıldığında, diğer HDÖÇ türlerine göre daha yüksek bir geri kazanım değeri elde edilmiştir (mentol-bütanol %75.58, mentol-laktik asit %68.63, mentol-dekanoik asit %65.04, mentol-hekzanoik asit %52.23, mentol-timol %47.29). Metildopa ve mentol-bütanol karışımının polarite değerlerinin benzer olması, ekstraksiyon çalışmasında en yüksek geri kazanım değerinin mentol-bütanol hidrofobik derin ötektik karışımı ile elde edilmesini sağlamıştır. Çalışmanın diğer parametreleri mentol-bütanol HDÖÇ sistemi esas alınarak belirlenmiştir.



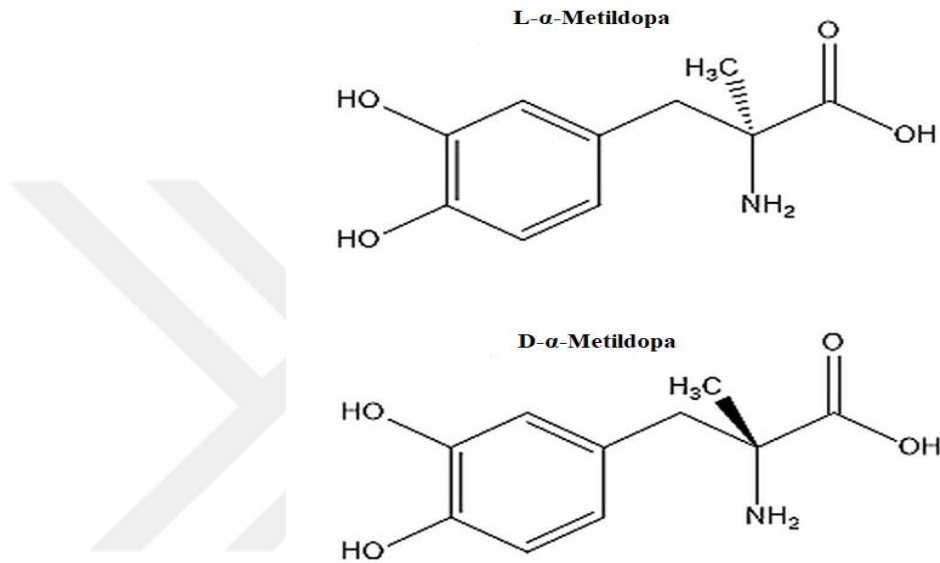
Şekil 4.12: Analitin geri kazanımına hidrofobik derin ötektik çözücü türü etkisi



Şekil 4.13: HDÖÇ türü kromatogramları; Bütanol-1 (Mavi), Laktik asit (kırmızı), Dekanoik asit (yeşil), Hekzanoik asit (pembe), Timol (sarı)

4.4.10.2 pH Etkisi

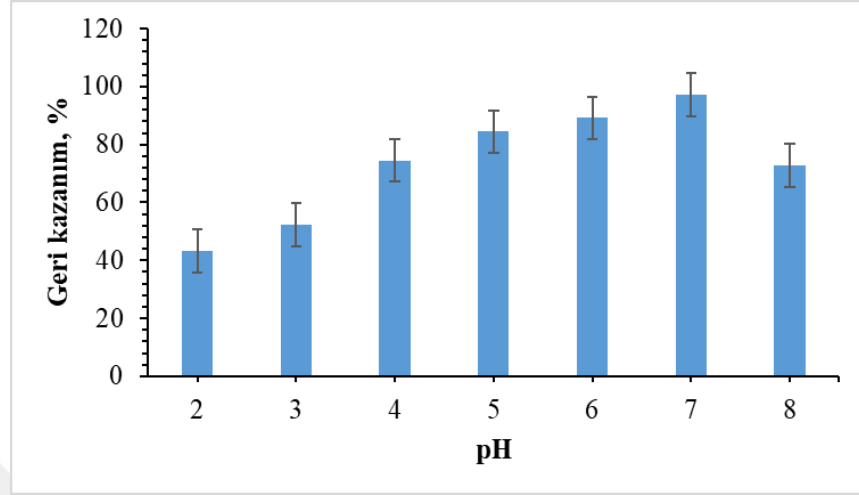
Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda pH önemli bir faktördür. Numunenin pH değeri analitlerin iyonik ve iyonik olmayan durumlarını etkiler. Metildopa aminoasit olarak D ve L kiral karışım halinde bulunmaktadır (Şekil 4.14), antihipertansif etki yalnızca L enantiyomerinde görülmektedir. Farmasötik formlarda L-Alfa-Metildopa etken madde olarak kullanılmaktadır (Gonçalves ve diğ. 2021).



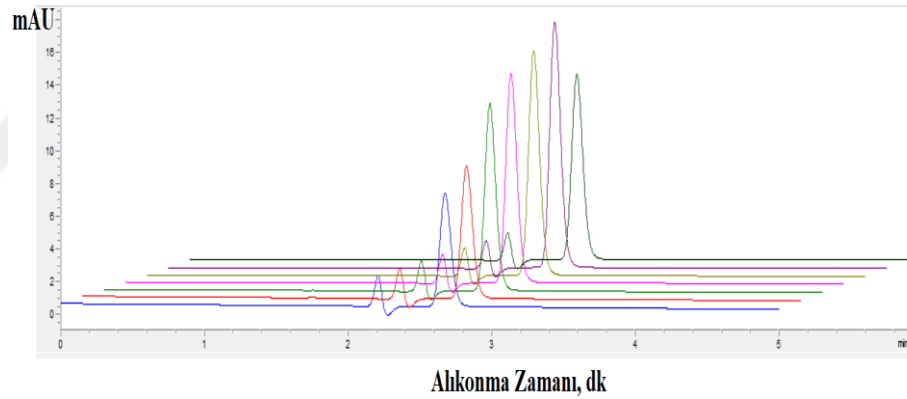
Şekil 4.14: Metildopa enantiyomerleri kimyasal yapıları

Analitlerin zayıf polar çözücülerde çözülerek nötr formlarında ekstrakte edilmesi genellikle daha kolaydır. Bu sebeple numune pH'ı analitlerin pKa değerine yakın veya pKa değerinden daha yüksek olmalıdır (Jagirani ve Soylak 2022, Pasupuleti ve diğ. 2022). Çalışmada tayin edilen metildopa etken maddesinin pKa değeri 2.28 olup bazik çözeltilerde iyonlaşmaktadır. Düşük pH ortamında metildopa molekülünün protonlanması ile yapıda bulunan NH_2 , NH_4^+ formuna dönüşmektedir. Yüksek pH ortamında ise karboksilik asit grubunda bulunan OH^- grubu protonunu; O^{2-} ve NH_2 gruplarının indüktif etkisi nedeniyle kaybetmektedir. Mentol-Bütanol HDÖÇ karışımının pH değeri ise 4.5 dir. Bu kapsamda pH değerinin analit geri kazanımına etkisi incelenmiştir. Numune pH'ı 0.01 M HCl ve 0.01 M NaOH çözeltileri ile 2 ve 8 arasında ayarlanarak mikroekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. En yüksek geri kazanım verisinin pH 7 şartlarında %97.14 olduğu gözlemlenmiştir (

Şekil 4.15 ve Şekil 4.16). Yöntemin diğer parametrelerinin optimizasyonunda çözelti pH'ı 7'ye ayarlanarak kullanılmıştır.



Şekil 4.15: Analitin geri kazanımına pH etkisi (Mentol-Bütanol, mol oranı 1-1)

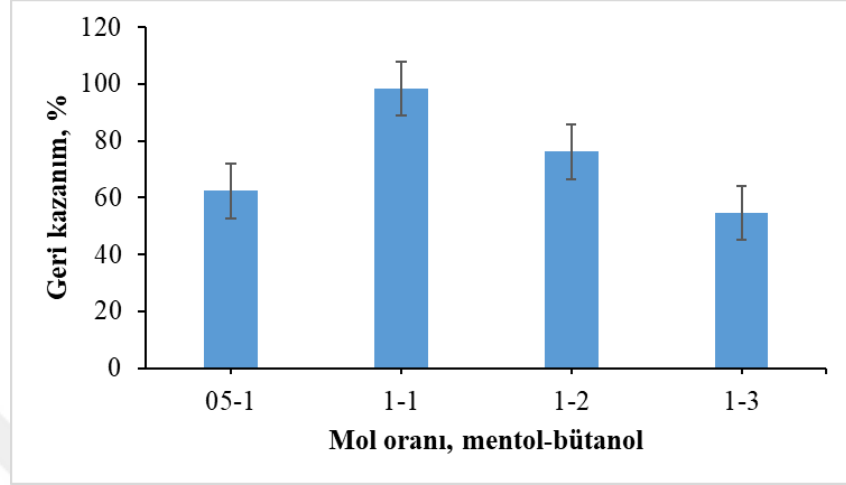


Şekil 4.16: Analit pik alanına pH etkisi (mavi pH:2, kırmızı pH:3, yeşil pH:4, Pembe pH:5, sarı pH:6, mor pH:7, siyah pH:8)

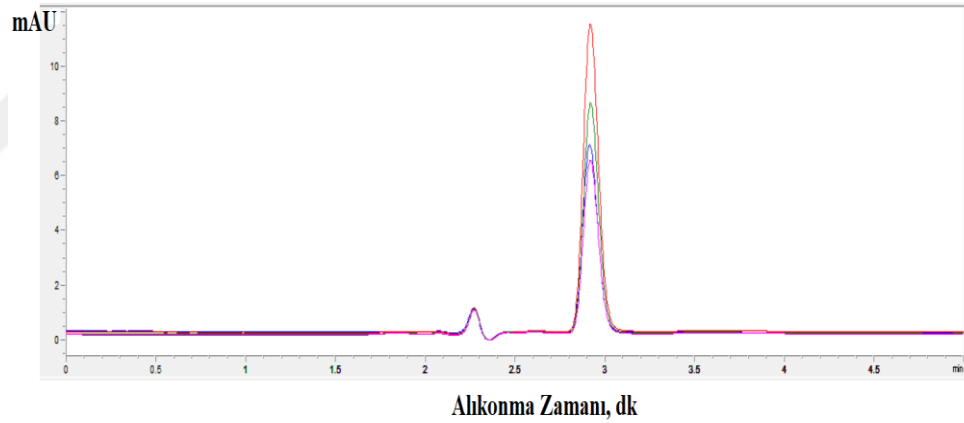
4.4.10.3 Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü Birleşimi Mol Oranları Etkisi

HBA ve HBD mol oranları ekstraksiyon verimini önemli ölçüde etkiler. Düşük HBA kütle transferinin tam olarak gerçekleşmemesine neden olurken, HDÖÇ'ün viskozitesini ve yüzey gerilimini düşürür. HBA ve HBD oranları çok küçük olduğunda ise yeterince güçlü hidrojen bağı oluşamaz ve hedef analitle etkileşim azalır (He ve diğ. 2022). Bu kapsamda mentol-bütanol HDÖÇ karışımı için 0.5-1, 1-1, 1-2, 1-3 mol oranlarında karışımlar hazırlanmış ve yöntem uygulanmıştır. En yüksek geri kazanım

sonucu 1-1 mentol-bütanol karışımı kullanıldığında %98.34 olarak bulunmuştur (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18). Bu nedenle metildopa etken maddesinin önderiştirilmesinde mentol-bütanol karışımı HDÖÇ olarak seçilmiştir.



Şekil 4.17: Analitin geri kazanımına mol oranı etkisi (pH 7)

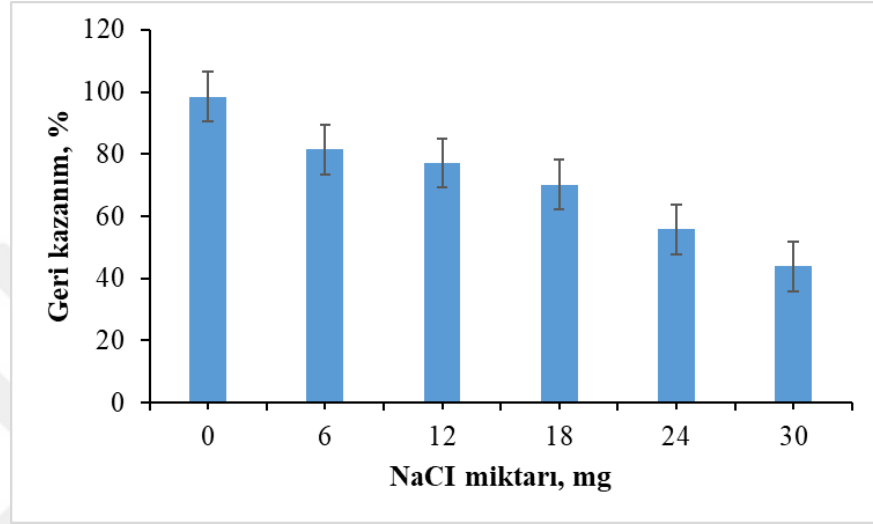


Şekil 4.18: Analit pik alanına derin ötektik çözücü karışımı mol oranının etkisi, 1-1 (kırmızı), 1-2 Yeşil, 0,5-1 (mavi) , 1-3 (pembe)

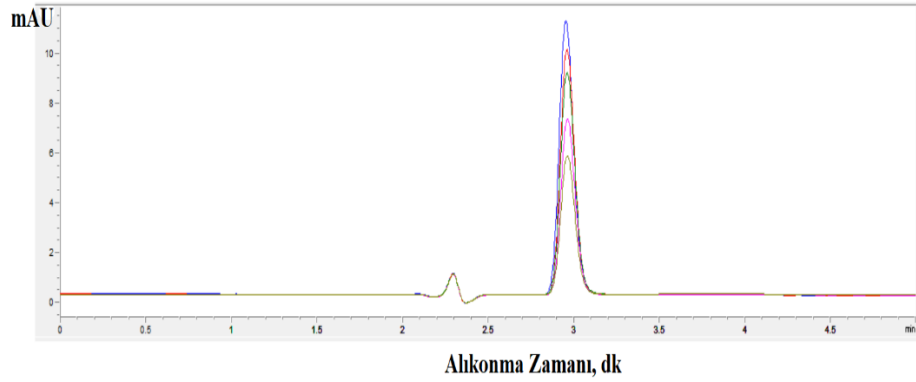
4.4.10.4 Tuz Etkisi

Sıvı-sıvı ekstraksiyonlarda tuz ilavesi ekstraksiyon verimini artırıcı ve azaltıcı etki gösterebilen önemli bir ekstraksiyon parametresidir. Genellikle NaCl tuz ilavesi olarak yaygın olarak kullanılır. Tuz ilavesi analitlerin numune içerisinde bozulmadan kalmasını sağladığı gibi, analitlerin etrafında hidrasyon tabakası oluşturarak daha az çözünür hale getirir ve ekstraksiyon verimini artırır (salting out). Diğer bir etkisi ise

tuz ve organik moleküller elektrostatik etkileşime girip ekstraksiyon verimini azaltabilir (Höl 2011). Tez çalışmasında bölüm 4.4.9’da oluşturulmuş olan yöntem 0-30 mg arasında değişen miktarlarda tuz ilavesi 3 mL lik çözeltilere uygulanıp, HPLC-UV cihazıyla numuneler analiz edilmiştir. Geri kazanım verileri incelendiğinde tuz ilavesinin ekstraksiyon verimini düşürdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Çalışmanın geri kalanına tuz ilavesi olmadan devam edilmiştir.



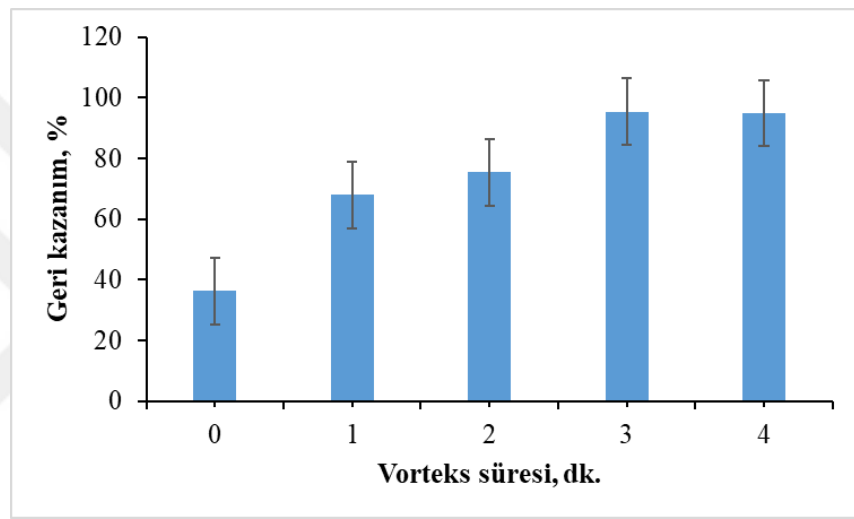
Şekil 4.19: Analitin geri kazanımına tuz etkisi (pH:7, mentol-bütanol mol oranı: 1-1)



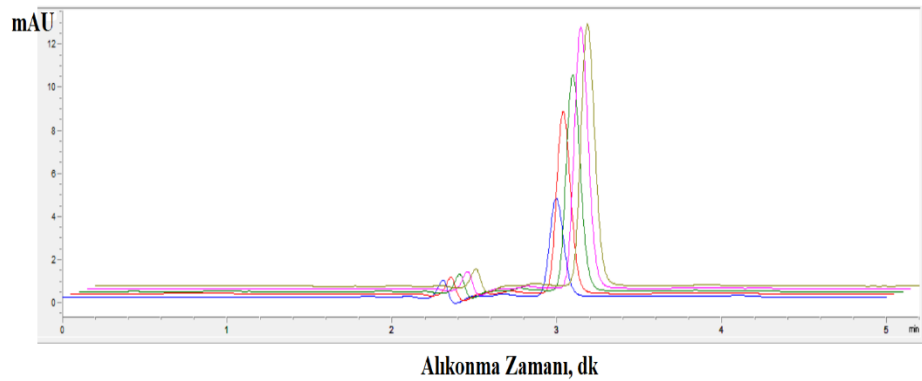
Şekil 4.20: Analit pik alanına tuz etkisi (a/h) %2 mavi, %4 kırmızı, %6 yeşil, %8 pembe, %10 yeşil

4.4.10.5 Vorteks Süresi Etkisi

Vorteks, analit ile HDÖÇ fazının çözeltide tamamen dağılmasını sağlamak, analit ile etkileşimini artırarak etkili bir ekstraksiyonun gerçekleşmesi için kullanılmıştır. Mikroekstraksiyon yönteminin uygulandığı 14 mL'lik plastik tüpler, vorteks ile 0-3 dk. arasında karıştırılmıştır. 3. dk. sonrasında %95.43 ve üzerinde geri kazanım verileri elde edilmiştir (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22). Minimum 3 dakikada alınan bu geri kazanım verisi sonucunda, çalışmanın geri kalanında vorteks süresi 3 dakika olarak belirlenmiştir.



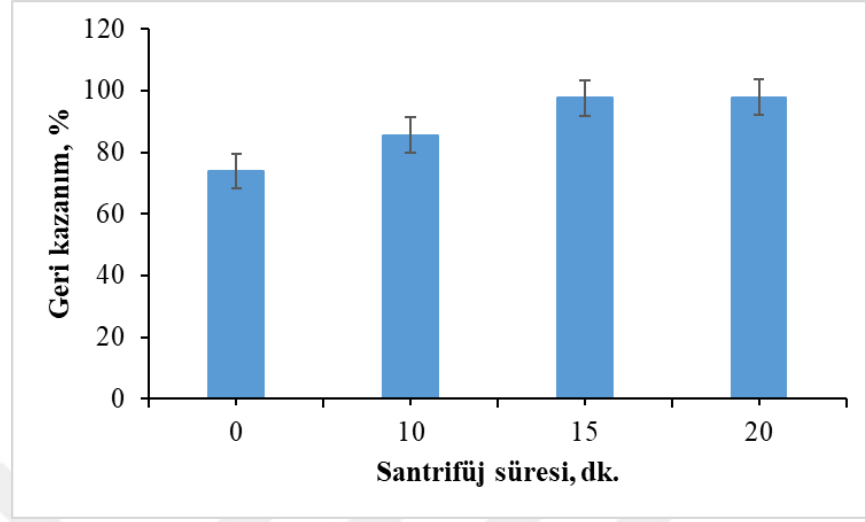
Şekil 4.21: Analit geri kazanımına vorteks süresinin etkisi (pH:7, mentol-bütanol mol oranı:1-1)



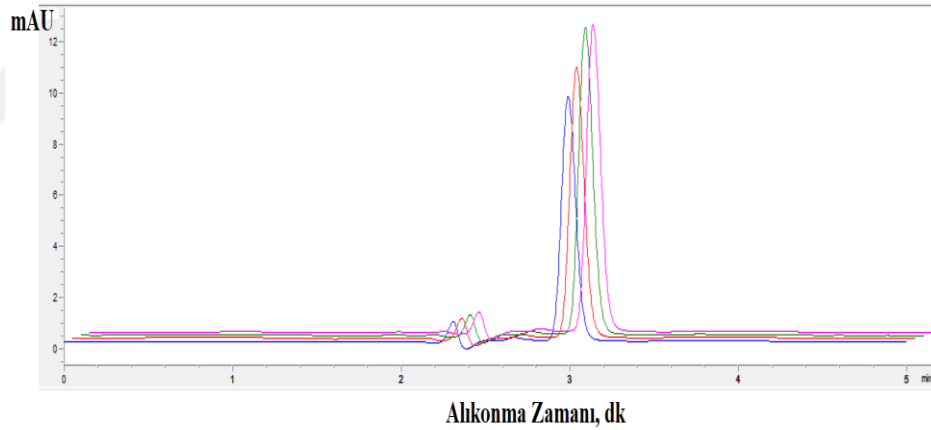
Şekil 4.22: Analit pik alanına vorteks süresinin etkisi 0 dk (Mavi), 1 dk (Kırmızı), 2 dk. (Yeşil), 3 dk. (Pembe), 4dk. (Sarı)

Numune fazı ile HDÖÇ fazının etkili ve hızlı bir şekilde birbirinden ayırmak için santrifüj kullanılmıştır (3000 rpm). 0-20 dk. arasında numuneler santrifüjlenmiş,

15 dk ve sonrasında %97.66 geri kazanım değeri elde edilmiştir (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24). Çalışmada sonraki deneyler için santrifüj süresi 15 dk. olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.23: Analit geri kazanımına santrifüj süresinin etkisi (pH:7, mentol-bütanol mol oranı: 1-1, vorteks 3dk.)

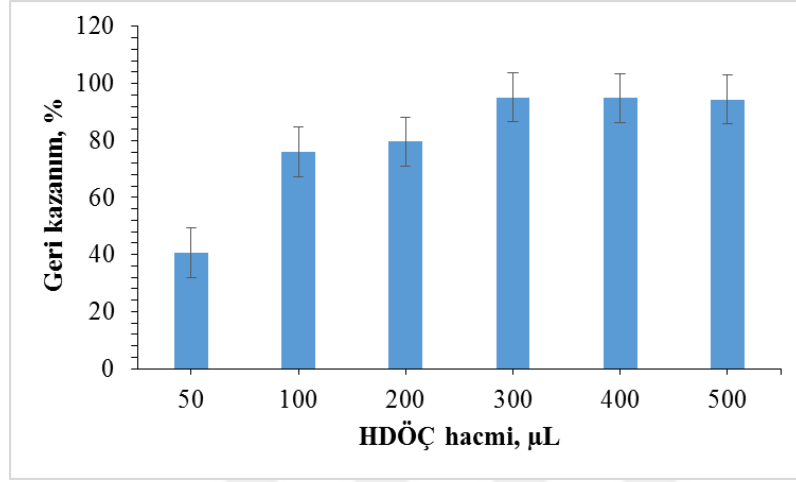


Şekil 4.24: Analit pik alanına santrifüj süresinin etkisi; 0 dk (Mavi), 10 dk (Kırmızı), 15 dk. (Yeşil), 20 dk. (Pembe)

4.4.10.6 Hidrofobik Derin Ötektik Çözücü Hacmi Etkisi

Ekstraksiyon çalışmalarında ekstrant hacmi önemli bir parametredir. HDÖÇ hacmi uygun bir şekilde artırılarak analitle etkileşimi sağlanır bu da ekstraksiyon verimini artırır. Öte yandan HDÖÇ fazının fazlalığı ekstaksiyon verimini düşürür. HDÖÇ hacmi arttıkça suda dağılılabirliği azalarak analitle kütle transferi düşer (He ve diğ. 2022). Tez çalışmasında HDÖÇ hacmi 50-500 μ L arasında test edilmiştir (Şekil

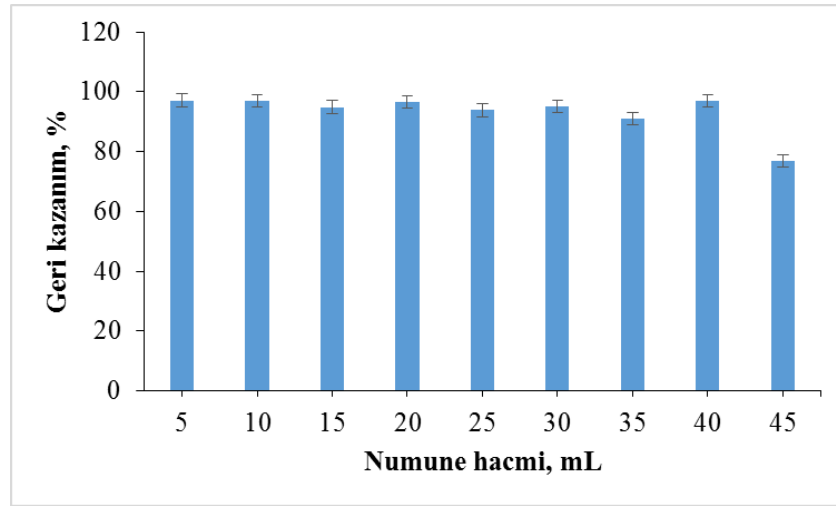
4.25). 300 μ L HDÖÇ kullanıldığında %95.09 geri kazanım elde edilmiştir. Çalışmanın geri kalan kısmında HDÖÇ hacmi 300 μ L olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.25: Analit geri kazanımına HDÖÇ hacmi etkisi (pH:7, mentol-bütanol mol oranı:1-1, vorteks: 3dk., santrifüj: 15 dk.)

4.4.10.7 Numune Hacmi Etkisi

Numune hacmi önderiştirme çalışmalarında önemli bir faktördür. Yüksek zenginleştirme faktörü elde edebilmek için numune ile ekstrantın etkileşime girdiği, kütle transferinin gerçekleştiği maksimum hacmi tespit etmek gerekmektedir (Yuvalı ve diğ. 2021). Çalışmada kantitatif geri kazanım değerlerinin %95'in altına düştüğü maksimum hacmi tespit etmek için 5-45 mL hacim aralığında numuneye, bölüm 4.4.9.'da oluşturulan yöntem uygulanmıştır. Şekil 4.26 da görüldüğü gibi, numune hacmi 40 mL'den fazla olduğunda geri kazanım düşmektedir. Bu kapsamda 300 μ L HDÖÇ ekstrant ile çalışılabilecek maksimum numune hacmi 40 mL olarak belirlenmiş olup, 900 μ L son hacim esas alındığında zenginleştirme faktörü 44.4 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.26: Analit geri kazanımına numune hacmi etkisi (pH:7, mentol-bütanol mol oranı: 1-1, vorteks: 3dk., santrifüj: 15 dk., HDÖÇ hacmi: 300 µL)

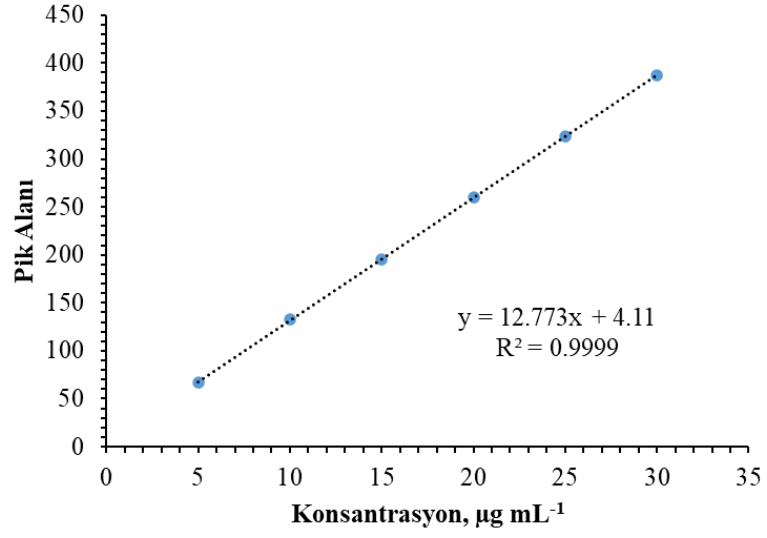
4.4.11 Yöntemin Analitik Değerlendirmesi

Ekstraksiyon çalışmalarında, teorik zenginleştirme faktörü olan PF (Preconcentration factor), deneysel zenginleştirme faktörü EF (Enhancement factor), hesaplamaları ekstraksiyon işleminin analitik koşulları karşılayıp karşılamadığının ölçülmesi adına analiz verilerinden hesaplanmaktadır. Bu kapsamda teorik zenginleştirme faktörü olan PF başlangıç çözeltisinin maksimum hacminin, minimum elüent hacmine bölünmesiyle 44.4 olarak elde edilmiştir. Deneysel zenginleştirme faktörü EF ise önderiştirmeli kalibrasyon eğrisinin eğiminin, önderiştirmesiz kalibrasyon eğrisinin eğimine oranlanmasıyla 45.78 olarak elde edilmiştir (Çaylak 2019). Bölüm 4.4.9’da açıklanan yöntem, etken madde içeren standart çözeltilere uygulanmıştır. Sonuçların ortalama değerleri ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

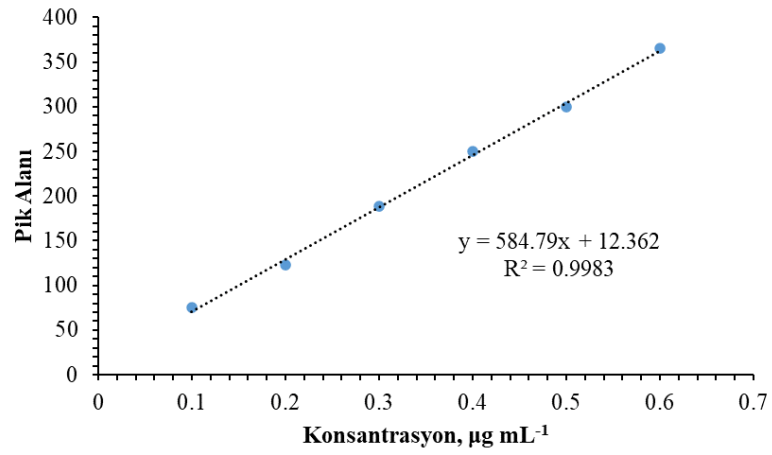
$LOD \text{ veya } LOQ = \kappa SDa/b$ (LOD için $\kappa = 3$ ve LOQ için $\kappa = 10$)
SDa kesmenin standart sapmasını ve b eğimi temsil etmektedir.

Kalibrasyon grafiklerinden R^2 değerleri hesaplanmıştır. Tüketim indeksi, bir birimlik zenginleştirme faktörü için harcanan numune hacmidir ve numune hacminin, deneysel zenginleştirme faktörüne bölünmesiyle elde edilmiştir (Höl ve diğ. 2014). Önderiştirmeli ve önderiştirmesiz kalibrasyon eğrileri Şekil 4.27 ve Şekil 4.28’de,

LOD ve LOQ değerleri, PF, EF, alışma aralıkları ve eğri denklemleri Tablo 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.27: Önderiştirmesiz kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.28: Önderiştirmeli kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.9: HDÖÇ mikroekstraksiyon yönteminin analitik performansı

Analitik parametreler	
Önderiştirmesiz kalibrasyon eğrisi denklem	$y = 12.773x + 4.11$
Önderiştirmesiz R^2	0.9999
Önderiştirmesiz konsantrasyon aralığı (mg L ⁻¹)	5-30
Önderiştirmeli kalibrasyon eğrisi denklem	$y = 584.79x + 12.362$
Önderiştirmeli R^2	0.9983
Önderiştirmeli konsantrasyon aralığı, (mg L ⁻¹)	0.1-0.6
Teorik zenginleştirme faktörü (PF)	44.4
Deneysel zenginleştirme faktörü (EF)	45.78
Bağıl hata (%)	3.01
Gözlenebilme sınırı (mg L ⁻¹ , κ SDa/b, k: 3)	0.0107
Tayin sınırı (mg L ⁻¹ , κ SDa/b, k: 10)	0.0323
Örnek hacmi (mL)	40
Elüent hacmi (μ L)	900
Tüketim indeksi (mL)	0.87

4.4.12 Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

Geliştirilen HDÖÇ mikroekstraksiyon yöntemi; Alfamet marka her biri 250 mg metildopa içeren altı adet tablete uygulanmıştır. Bu kapsamda tabletler ultrasaf su ile 100 ml'lik balon jojede çözülüp, ultrasonik su banyosunda bekletilip homojen bir çözelti haline getirilmiştir. Sonrasında bu çözeltilerden yöntemin kalibrasyon aralığına girecek şekilde gerekli seyreltmeler yapılarak yöntem uygulanmış ve HPLC-UV ile analiz edilmişlerdir. Analiz sonucunda tabletlerdeki etken madde içeriği geri kazanım değerleri ile birlikte Tablo 4.9'da verilmiştir. Analiz sonuçlarından; hesaplanan ortalama ($\bar{A}$), standart sapma (s), bağıl standart sapma (RSD %), % bağıl hata değerleri Tablo 4.10'da verilmiştir. RSD<1 (0.90) ve % bağıl hata<1 (0.064) sonuçlarından, yöntemin piyasada tablet formundaki metildopa içeren ilaç preparatlarına uygulanabilir olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4.10: 250 mg metildopa içeren tabletlerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiksel değerlendirmesi

Örnek	HDÖÇ-HPLC-UV	
	mg/tablet	% Geri kazanım
1	253.85	101.54
2	251.25	100.50
3	248.12	99.25
4	250.36	100.14
5	249.75	99.90
6	247.65	99.06
Ortalama	250.16	100.06
Standart sapma	2.26	
Bağıl standart sapma, %	0.90	
Bağıl hata, %	0.064	

4.4.13 Yöntemin Literatürdeki Diğer Çalışmalarla Karşılaştırılması

Hidrofobik derin ötektik çözücü ekstraksiyonu, sulu faz çalışmalarındaki kararlılığı, düşük buhar basıncı, viskozite ve yoğunluğunun faz ayırımında getirdiği avantajlar, ekstraksiyonda dispersif bir sıvı kullanımına ihtiyaç duymaması gibi avantajlarından dolayı literatürde sıklıkla çalışılmaktadır (Tablo 4.11). Bu kapsamda mentol bazlı iyonik olmayan hidrofobik derin ötektik çözücüler, ilaç etken maddesi, pestisitler, hormonlar, fenolik maddeler gibi, farmasötik ürünlerin tayini çalışmalarında, tarımsal ürünlerdeki kalıntı analizlerinde, kimyasal kirliliklerin içme suyu ve çevresel su kaynaklarındaki tayini çalışmalarında kullanılmaktadırlar. Tez çalışmasında kullanılan mentol-bütanol-1 hidrofobik derin ötektik çözücü, literatür ile karşılaştırıldığında, nötr pH ortamında çalışabilmesi, yüksek zenginleştirme faktörü eldesi ve düşük gözlenebilme sınırına sahip olması bakımından, ilaç etken madde analizlerinde, metildopa etken maddesinin tayini çalışmalarında kullanılabilir bir teknik olarak literatüre sunulmuştur.

Tablo 4.11: Yöntemin literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması

Analit	HDÖÇ	Teknik	Örnek	EF	pH	LOD, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Literatür
Paraben	Mentol- Dekanoik asit	HPLC- UV	Kozmetik- Gargara	12.5	4	0.006- 0.0046	Dalmaz ve Özak 2022
Difenilamin	Mentol- Oktanoik asit	HPLC- FLD	Meyve	4	7	0.05	Ma ve diğ. 2021
Tiyofanat- metil, karbendazim	Mentol- Oktanol	HPLC- UV	Göl suyu- Musluk suyu	87.2- 97.4	-	0.053- 0.007	He ve diğ. 2022
Klorofenol	Mentol- Laktik asit	HPLC- UV	Su-atık su	20	7	0.00002- 0.00005	Pasupuleti ve diğ. 2022
Metildopa	Mentol- Bütanol-1	HPLC- UV	İlaç	45.78	7	0.0107	Bu Çalışma

5. SONUÇ VE YORUM

İlaç preparatlarının içerik analizi, hem araştırma-geliştirme hemde tanı ve tedavi aşamalarında oldukça önemli bir süreçtir. İlaç etken maddesi üretimden tüketiciye, tüketicideki etkileşimlerine kadar olan farklı işlem basamaklarında (araştırma-geliştirme, üretim, paketlenme, rafta saklama, tanı, tedavi), farklı koşullara maruz kalmaktadır. İlaç içeriğinin stabil kalabilmesi, üretim sürecinde ilaç formülasyonuna bulaşan eser elementlerin tayini ve ilaç etken maddesinin tespiti önem arz etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında tablet formundaki ilaç preparatlarında LC-MS/MS tekniği ile etken maddenin stabilitesinin belirlenmesi, tablet formülasyonundan eser elementlerin manyetik katı faz ekstraksiyonu tekniği kullanılarak MIS-FAAS yöntemiyle tayini ve etken maddenin hidrofobik derin ötektik çözücü sıvı-sıvı mikroekstraksiyon tekniği ile önderiştirilip HPLC-UV yöntemi ile tayini çalışmaları olmak üzere üç yöntem geliştirilmiştir.

Tezin birinci bölümünde; 2019 yılının sonlarında Çin’de ortaya çıkan SARS-COV-2 virüsü kaynaklı COVID19 hastalığının tedavisinde kullanılmış olan Favipiravir etken maddesinin, zorlanmış koşullar altındaki stabilitesinin değerlendirmesi LC-MS/MS tekniği ile yapılmış ve etken madde tablet formundan tayin edilmiştir. Çalışmada ilk olarak favipiravir tayini için UPLC metodu oluşturularak sonuçlar UPLC-MS/MS ile değerlendirilmiştir.

Favipiravir etken maddesinin ilk olarak maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu tespit edildi. Konsantrasyonu $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan standart favipiravir çözeltisinin, UV spektrofotometresi ile 200-800 nm arası dalga boyu taraması yapılarak λ_{max} 222 nm olarak belirlendi. Sonrasında UPLC cihazında 222 nm dalga boyunda DAD dedektör kullanılarak kromatografik metot oluşturuldu. Çalışmada Poroshell 120 EC-C18 ($50 \times 4.6 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$) kolon kullanıldı. %0.1 formik asit içeren H_2O :metanol (80:20, v/v) mobil faz olarak seçildi. Akış hızı 0.8 mL dk^{-1} , kolon sıcaklığı ise 40°C olarak belirlendi. Bu şartlar altında UPLC-DAD cihazında favipiravir alıkonma zamanı 1.155 dk, toplam analiz süresi ise 2 dk. olarak belirlendi. UPLC’de kromatografik şartlar optimize edilip, ideal pik elde edildikten sonra kütle spektrometresi (MS) analizleri için UPLC-MS/MS cihazı parametreleri optimize edildi. Analit iyonları elektrosprey jet stream (ESI) iyonlaştırma tekniği ile

iyonlaştırıldı. Pozitif ve negatif iyonlaştırma teknikleri ile denemeler sonucunda negatif iyon mod iyonlaştırma favipiravir için optimum sonuçlar verdi. Fragmentor voltaj 80 V, parçalanma enerjisi 20 eV, kapiler voltaj 3.5 kV, desolvasyon sıcaklığı 300 °C, iyonlaştırma kaynağı 400 °C, sürükleyici azot gazı akış hızı 11 L saat⁻¹, olarak MS parametreleri belirlendi. Favipiravir temel pik [M-1] 155.9, tanımlayıcı temel parçalanma iyonu (daughter ion) 112.9 olarak tespit edildi.

UPLC-MS/MS analitik yönteminin, çalışmanın amacına uygunluğunun anlaşılması için yöntem validasyonu yapıldı. Favipiravir etken maddesinin yöntem validasyonu ICH Q2 (R1) yöntemine uygun olarak gerçekleştirildi. Validasyon süreci; seçicilik, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, doğrusal çalışma aralığı, tayin sınırı, gözlenebilme sınırı, yöntemin sağlamlığı parametrelerinin belirlenip değerlendirilmesi yapılarak tamamlandı.

Yöntemin doğrusalılığı lineer regresyon analizi ile test edildi. Konsantrasyonları 1-10 µg mL⁻¹ aralığında (1, 2, 4, 6, 8, 10 µg mL⁻¹) değişen favipiravir çözeltileri ile 3'er tekrar analiz yapıldı. Eğim, kesişim ve korelasyon katsayısı (R²) sırasıyla 19.825, -7957 ve 0.9999 olarak kalibrasyon eğrisinden hesaplandı. Gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı ise κ SDa/b denkleminde elde edildi. LOQ için κ : 10 ve LOD için κ = 3 olarak alındı, SDa kesmenin standart sapmasını temsil eder ve b eğimi temsil etmektedir. Buradan LOD: 0.30 ve LOQ: 0.80 µg mL⁻¹ olarak hesaplandı.

Yöntemin seçiciliği, Favipiravir standart çözeltisi, örnek çözeltisi ve kör çözelti için üretilen kromatogramların karşılaştırılmasıyla belirlendi. Kromatogramlar incelendiğinde girişim yapabilecek kirliliklerden kaynaklanan piklerin meydana gelmediği görüldü. Yöntemin kesinliğinin belirlenmesi için aynı ve farklı günlerde, konsantrasyonları 1, 4 ve 10 µg mL⁻¹ olan favipiravir çözeltileri cihaza beş kez enjekte edildi ve pik alanlarının tekrarlanabilirliği test edildi. Çalışılan tüm konsantrasyonlarda pik alanı için RSD değerleri %1.0'den düşük olarak bulundu. Bu koşullarda analiz yönteminin kesinliği amaçlanan analiz için uygun olarak bulundu.

Yöntemin doğruluğunun test edilmesi için analiz edilen tablet numunesine (5 µg mL⁻¹) bilinen miktarda standart eklendi (standart konsantrasyonu, favipiravir konsantrasyonunun %80, %100 ve %120'si olacak şekilde ekleme yapıldı). Bu üç

farklı miktarda favipiravir içeren çözeltiler analiz edilerek, geri kazanım miktarı ve bağıl hata değerleri hesaplandı. Tüm analizlerde RSD değerlerinin %1'nin altında olduğu, yüzde bağıl hatanın ise her üç ekleme düzeyinde %2'nin altında olduğu belirlendi ve böylelikle yöntemin doğruluğu gösterildi.

Yöntemin sağlamlığı çalışmasında; analiz sonuçlarına göre mobil faz akış hızı, kolon sıcaklığı ve mobil faz bileşimindeki küçük değişikliklerin analitin alıkonma süresi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yöntemdeki bu değişikliklerin alıkonma süresi üzerindeki etkisi RSD<1 olarak bulunmuş olup, yöntemin sağlamlığı gösterilmiştir.

Yöntemin performans değerlendirmesinde sistemin uygunluk parametreleri değerlendirilmiştir. Kuyruklanma faktörü 1.1, alıkonma süresi 1.155 dakika ve teorik tabaka sayısı 5293 olarak bulundu ve yöntem uygunluğu gösterildi. Standart çözeltilerin kararlılığının belirlenmesi için ise 24 saatlik bir süre boyunca, UPLC-MS/MS sistemine 8 saatlik periyotlarla standart favipiravir çözeltileri enjekte edilmiş ve alıkonma süresi ve pik alanı değerleri kaydedilmiştir. Bağıl standart sapma, pik alanı ve alıkonma zamanı için %2'den düşük olarak belirlendi. Standart çözeltilerdeki ilaç etken maddenin konsantrasyonunda önemli bir değişiklik meydana gelmedi. Tüm bu parametrelerin değerlendirilmesi sonucunda, yöntemin favipiravir etken maddesinin analizine uygun olduğu gösterilerek, yöntem validasyonu tamamlandı.

Favipiravir ilaç etken maddesinin stabilitesi ICH Q1A (R2) yöntemine göre yapıldı, yumuşak ve sert zorlanmış koşullar uygulanarak değerlendirildi. Bozundurma çalışmaları; asidik, bazik, oksidatif, UV ışığı ve termal koşullar altında gerçekleştirildi. Stok standart çözelti 1-0.1 N HCl, 1-0.1 N NaOH, %3-30 H₂O₂ çözeltileri ile 10 µg mL⁻¹ konsantrasyona seyreltilti. UV ışığı ve termal stres çalışmalarında, stok standart çözelti ultra saf su ile 10 µg mL⁻¹ kadar seyreltilti. Asidik, bazik ve oksidatif çalışmalarda hazırlanan standart çözelti 80°C'de 30 dakika etüvde bekletildi. UV ışığı çalışması, standart çözelti oda sıcaklığında 6 ve 24 saat 254 nm dalga boyunda UV ışığına maruz bırakılarak gerçekleştirildi. Termal bozunma testinde standart çözelti 100 °C'de etüvde 6 ve 24 saat bekletildi. Favipiravir kuvvetli bazik koşullarda tamamen bozunurken, asidik ve oksidatif koşullarda kısmen bozunmuştur. Favipiravir UV ışığı ve termal koşullar altında ise kararlılığını korumuştur.

Geliştirilen ve validasyonu yapılan yöntem, piyasada favipiravir etken maddesini içeren tablet formundaki ilaca (200 mg) uygulandı. Bu kapsamda 5 adet tablet 100 mL balon jojede su ile çözülerek, yöntemin doğrusal aralığına girecek şekilde seyreltilip 5'er tekrar analizi yapıldı. Analiz sonuçları etken maddenin prospektüs içeriği ile uyumlu ve tekrar edilebilir sonuçlar verdi. 200 mg etken madde içeren ilaç içeriği 200.35 olarak tayin edildi. Geri kazanım %100.18, standart sapma 2.05, bağıl standart sapma % 1.02, bağıl hata % 0.18 olarak belirlendi. Bu kapsamda metot piyasa preparatlarına da uygulanabilir ve geliştirilen bu yöntem, literatürdeki diğer yöntemlere göre daha kısa sürede sonuçlanan, bir yöntemdir.

Tezin ikinci bölümünde; İlaç preparatlarındaki eser miktardaki Pb(II), Zn(II), Cu(II), Co(II) metal iyonlarının hassas, doğru, hızlı ve ekonomik bir şekilde kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılması için bu analitlerin, ortamdan alınması (ayırma) ve deriştirilmesi (zenginleştirme) gerçekleştirildi. Çalışmada, ayırma ve deriştirme manyetik katı faz ekstraksiyon yöntemi ile yapılarak, metallere afinite gösteren 8-hidroksikinolin ile manyetit (Fe_3O_4) kaplandı. Kaplanmış olan Fe_3O_4 çözelti içerisinde daha seçici olmakta ve kararlılığı artmaktadır. Önderiştirme işleminde; pH, elüent türü, elünt konsantrasyonu, elüent hacmi, adsorpsiyon süresi, desorpsiyon süresi, manyetik katı faz miktarı, tekrar kullanılabilirlik, numune hacmi ve yabancı iyon etkisi parametreleri optimize edildi. Ayrıca katı fazın adsorpsiyon kapasitesi, Langmuir ve Freundlich izoterm değerleri hesaplandı. Yöntem validasyonu QCP-QCS-1 sertifikalı referans malzeme ile yapıldı. Analitik değerlendirme yapılarak MSPE yöntemi gerçek örneklere uygulandı. MSPE yöntemi ile önderiştirilen analitler hem MIS-FAAS hem de ICP-MS cihazlarıyla tayin edildi ve elde edilen sonuçlar incelenerek her iki teknik karşılaştırıldı.

$\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ MNPs sentezi için ilk olarak Fe_3O_4 birlikte çöktürme yöntemiyle sentezlendi, sonrasında 8-hidroksikinolin ile kaplama işlemi gerçekleştirildi. Sentez ve 8-hidroksikinolin ile kaplama işlemi yapılmış olan manyetik nanoparçacık için karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Sentezlenmiş olan Fe_3O_4 ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ MNPs'in ATR-IR spektrumları alınıp karşılaştırıldı. 547.21 cm^{-1} Fe-O gerilme titreşimi; Fe_3O_4 manyetik nano parçacık varlığını desteklemektedir. 3046.70 cm^{-1} O-H gerilme, 1574.44 cm^{-1} , O-H eğilme, 2923.62 cm^{-1} , aromatik C-H gerilme, 1464.20 cm^{-1} C-H eğilme, $1580\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ C=N ve aromatik C=C çifte bağlarını, 1323.8 cm^{-1}

C-O tekli bağı, 1498-1327 cm^{-1} aromatik C-H tekli bağ düzlem içi eğilmesi, 821-738 cm^{-1} aromatik C-H düzlem dışı eğilme titreşiminden kaynaklı pikler; manyetik nano parçacığın 8-hidroksikinolin ile kaplandığını göstermektedir. Fe_3O_4 ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ MNPs'nin SEM görüntüleri alınmış ve kimyasal bileşimleri EDX analizleri ile gösterilmiştir. Fe_3O_4 parçacık boyutu ortalama 34.86 nm iken $\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ MNPs parçacık boyutu ortalama 27.09 nm olarak bulunmuştur. EDX analizi ile elde edilen azot pikleri maddenin kaplandığını gösterdi. Sentezlenmiş olan Fe_3O_4 ve bu malzemenin 8-hidroksikinolin ile kaplanması sonrası elde edilen malzeme TGA cihazı ile analiz edildi. Kaplanmamış Fe_3O_4 numunesinde % 5 lik bir kütle kaybı meydana gelirken, 8-hidroksikinolin ile kaplanmış olan $\text{Fe}_3\text{O}_4@8\text{-HQ}$ numunesinde kütle kaybı %20 civarında gözlemlendi. Kütle kaybındaki bu fark malzemenin kaplandığını göstermektedir. Sentezlenen Fe_3O_4 ve 8-hidroksikinolin ile kaplanan Fe_3O_4 malzemelerinin manyetik özellikleri titreşimli numune manyetometre (VSM) cihazıyla belirlendi. Kaplanmamış Fe_3O_4 'ün manyetik özelliği 8-hidroksikinolin ile kaplandıktan sonra belirgin bir şekilde azaldı. Doygunluk manyetizasyonu (M_s) Fe_3O_4 'ün 67.69 emu/g bulunurken, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-8HQ}$ MNPs'nin 61.09 emu/g olarak bulundu. Kalıcı manyetiklik (M_r) Fe_3O_4 'ün 2.15 emu/g iken $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-8HQ}$ MNPs'nin 1.32 emu/g dır. Zorlayıcı alan manyetikliği (H_c) Fe_3O_4 'ün 20.56 Oe iken $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-8HQ}$ MNPs'nin 13.84 Oe dir. Elde edilen bu sonuçlardan, sentezlenen bu malzemenin harici bir manyetik alan uygulandığında çözeltiden ayrılmaya uygun olduğu ve ön deriştirme işleminde kullanılabileceği görülmüştür. Malzeme grafik döngüleri ve değerleri göz önüne alındığında, ferrimanyetik özellik göstermektedir.

Sentez ve karakterizasyon işlemlerinden sonra, optimizasyon parametrelerinden öncelikli olarak, pH taraması pH 2-10 aralığında yapıldı. Analitleri içeren model çözeltilere yöntem uygulandı ve geri kazanım değerleri hesaplandı. pH taraması sonrasında Pb(II), Zn(II), Cu(II), Co(II) metal iyonları için çözelti pH'ı 8 olduğunda en yüksek geri kazanım değeri elde edildi. Elüent türü etkisi çalışmasında, HNO_3 ve HCl elüent olarak kullanıldı. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde elüent olarak HNO_3 kullanıldığında Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) iyonları için geri kazanım değerlerinin daha yüksek olduğu görüldü, bu nedenle HNO_3 elüent olarak seçildi. Elüsyon çözeltisinin konsantrasyonu çalışmasında Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) iyonları için HNO_3 çözeltisinin konsantrasyonu 0.1-2 mol L^{-1} aralığında değiştirilerek analitlerin geri kazanımına etkisi incelendi. Elde edilen geri kazanım verilerinden

HNO₃ çözeltisi konsantrasyonu 1 mol L⁻¹ olarak belirlendi. Elüent hacmi yüksek zenginleştirme faktörü elde etme açısından önemlidir, bu kapsamda elüent hacmi 1-6 mL aralığında değiştirildi. Elde edilen sonuçlardan Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) iyonları için 95% ve üstünde geri kazanım verileri minimum 5 mL elüent kullanıldığında gözlemlendi. Adsorpsiyon ve desorpsiyon sürelerinin optimizasyonunda metal iyonlarını içeren çözeltiye MSPE yöntemi uygulanmış ve çözelti 0-5 dakika boyunca el ile çalkalandı, 3 dk. adsorpsiyon, 4 dk. desorpsiyon sürelerinde, geri kazanım verileri Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) iyonları için $\geq 95\%$ bulundu. Adsorban miktarı ve tekrar kullanılabilirlik çalışmasında; Fe₃O₄-8HQ MNPs miktarı 2-15 mg arasında değiştirilerek çözeltilere ilave edildi ve analitlerin geri kazanımına MNP miktarının etkisi incelendi. 10 mg Fe₃O₄-8HQ MNPs miktarı optimum değer olarak bulundu. Fe₃O₄-8HQ MNPs'nin tekrar kullanılabilirlik özelliği de test edilerek ve tek kullanımlık olduğu görüldü. Numune hacminin optimizasyonunda, zenginleştirme faktörünün (PF) belirlenmesi amacıyla 10-125 mL aralığında örnek hacimleri ile denemeler yapılmıştır. Örnek hacimleri Co(II) ve Cu(II) için 50 mL, Zn(II) için 75 mL ve Pb(II) için 100 mL olarak belirlendi. Bu örnek hacimleri ile çalışıldığında önderiştirme faktörleri Co(II) ve Cu(II) için 10, Zn(II) için 15, Pb(II) için 20 olarak bulundu.. Yabancı iyonların ve karışık matriks ortamının etkisi parametresinde, farklı anyon ve kationların varlığında denemeler yapıldı. Analitlerin aşırısında test edildiği yöntemle Pb(II) ve Cu(II) 50 mgL⁻¹, Co(II) ve Zn(II) 40 mg L⁻¹ konsantrasyonu aştığı zaman olumsuz etki yapmaktadırlar. Geliştirilen yöntemin karışık matriks ortamlarında seçiciliğinin yüksek olduğu görülmüştür.

Önderiştirme işleminde kullanılan Fe₃O₄@8HQ manyetik katı fazın adsorpsiyon davranışı; adsorpsiyon kapasitesi, Langmuir ve Freundlich izoterm eğrileri çizilerek hesaplandı ve değerlendirildi. Adsorpsiyon kapasitesinin tayininde başlangıç konsantrasyonu C₀'a karşı Q_e konsantrasyonu kullanılarak izoterm eğrileri çizildi. İzoterm eğrilerinde başlangıç konsantrasyonu C₀ artarken Q_e artmış sonrasında grafik bir plato oluşturdu. Oluşan bu platoya karşılık gelen Q_e değeri analitler için, deneysel adsorpsiyon kapasitesi olan Q_m (mg g⁻¹); Pb(II) için 15.619, Zn(II) için 8.643, Cu(II) için 4.676, Co(II) için ise 4.148 olarak hesaplandı. Adsorpsiyon kapasitesi hesabında bulunan deneysel veriler; Langmuir ve Freundlich izotermelerini belirlemek içinde kullanıldı. Çizilen izotermelerde R² değerlerinin 1'e yakın olması, MNP üzerinde adsorpsiyonun Langmuir izotermine uyumlu olduğunu ve tek katmanlı adsorpsiyonun

gerçekleştirdiğini ifade etmektedir. $0 < R_L < 1$ aralığında çıkan R_L değerleri ise analitlerin adsorbana göstermiş olduğu afiniteyi ifade ederek, izoterme uygunluğu göstermektedir. Bir diğer izoterm ifadesi olan Freundlich heterojen yüzeyler arasında gerçekleşen adsorpsiyonun uygunluğunu test etmektedir. K_f adsorpsiyon kapasitesini ifade ederken, n değerinin 1-10 arasında olması ve R^2 değerlerinin 1'e yakınlığı Freundlich izotermine uygunluğu ve analit ile adsorban arasında düşük konsantrasyonlarda etkileşimin olduğuna işaret etmektedir.

Yöntemin istatistiksel değerlendirilmesinde, Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) iyonları için 100-75-50-50 mL'lik numune hacimlerinde çözeltilere yöntem uygulandı. Kalibrasyon eğrileri, yöntem uygulanarak önderiştirmeli ve doğrudan standart çözeltiler ile önderiştirmesiz olarak oluşturuldu. Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) için kör çözelti ile LOD değerleri sırasıyla 0.06, 0.017, 0.026, 0.024 mg L⁻¹; LOQ değerleri ise 0.17, 0.021, 0.071, 0.101 mg L⁻¹ olarak hesaplandı. Teorik zenginleştirme faktörü (PF), Pb(II) için 20, Zn(II) için 15, Cu(II) ve Co(II) için ise 10 olarak bulunurken, deneysel zenginleştirme faktörü, Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) için sırasıyla 20.9, 15.3, 9.8, 9.9 olarak kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinden hesaplandı. Yöntemin kesinlik hesabı için analitlerin geri kazanma değerlerinin tekrarlanabilirliği araştırıldı, analit iyonlarını içeren 10 mL'lik çözeltilerin, belirlenen optimum şartlarda manyetik katı faz önderiştirme işlemi uygulanıp, AAS cihazı ile 10 kez analiz edilmesiyle, bağlı standart sapma değerleri 1.07 ile 1.39 aralığında elde edildi. Yöntemin doğruluk çalışması, sertifikalı referans malzemeler kullanılarak yapıldı. Bu kapsamda NIST (Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü) tarafından deney ve kalibrasyon laboratuvarları doğruluk çalışmaları için kullanılan, QCP-QCS-1 standart referans malzemesi, doğruluk çalışmalarında analiz edildi. Bulunan değerler student t-testi ile %95 güven seviyesinde karşılaştırıldı. Doğruluk çalışmasında bulunan t değerlerinin t_{kritik} :4.303 negatif değerinden büyük olması dolayısıyla, değerlerde anlamlı bir fark ve sistematik hata olmadığı, aradaki farkın belirsiz hatalardan kaynaklandığı anlaşıldı.

Fe₃O₄-8HQ MNPs yöntemi; ilaç, atık su ve kompozit malzemeden Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) metallerinin tayini için uygulandı. Gerçek örneklerde bulunan değerler yöntemin tayin limitinin altında kaldı, bu sebeple örneklere 2 ve 4 mg L⁻¹ standart çözelti eklenerek MIS-FAAS cihazı ile analizler gerçekleştirildi. Geri kazanım değerleri %92-98 arasında bulundu. Geliştirilen yöntem standart ekleme

sonuçları da göz önüne alındığında doğrulaması yapılmış seçici bir metot olarak görülmektedir.

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-8HQ}$ MNPs yönteminin başka teknikler ile de çalışılabildiğini göstermek amacıyla, farklı bir teknik olan ICP-MS cihazı sonuçları ile karşılaştırılması yapıldı. ICP-MS analizleri EPA 200.8 standardı (EPA 200.8) kapsamında validasyonu yapılmış olan, bir atık su analiz laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu kapsamda, Pb(II), Zn(II), Cu(II) ve Co(II) için CRM çözeltisine $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-8HQ}$ MNPs'nin adsorban olarak kullanıldığı MSPE yöntemi uygulanarak iki teknik karşılaştırıldı. ICP-MS cihazında Pb(208), Zn(66), Cu(63) ve Co(59) elementleri tayin edilmiştir. $t_{\text{deney}} 4$ serbestlik derecesi olan 2.78 t_{kritik} değerinden düşük olarak bulundu. İki yöntem sonuçları arasında bir fark ve sistematik bir bulunmamakla beraber, ICP-MS ile elde edilen sonuçlar, MIS-FAAS ile elde edilen sonuçlardan daha yüksek geri kazanım, daha düşük standart sapma ve bağıl hata değerleri, daha düşük tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı ile daha tercih edilebilir bir teknik olarak görülmektedir. Yöntem literatür ile karşılaştırıldığında, aynı anda 4 elementin aynı pH değerinde eş zamanlı tayininin yapılabilirdiği, düşük miktarda manyetik katı fazın kullanıldığı, düşük limitlerde analitlerin tayin edilebildiği bir yöntem olarak görünmektedir.

Tezin üçüncü bölümünde; Yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan, santral etkili antihipertansifler ilaç grubunda bulunan Metildopa ilaç etken maddesinin, hidrofobik derin ötektik çözücü (HDÖÇ) sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu ile önderiştirilmesi ve HPLC-UV tekniği ile metot parametrelerinin optimizasyonu çalışması yürütüldü. Bu kapsamda öncelikle metildopa ilaç etken maddesinin HPLC-UV analitik yönteminin, Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı'nın analitik yöntemlerin geçerliliğine ilişkin tavsiyelerine (ICH Q2(R1) 2005) uygun olarak validasyonu yapıldı. Validasyon parametreleri (seçicilik, doğrusalılık, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ), kesinlik, doğruluk ve sağlamlık) araştırıldı. Metod validasyonu sonrasında, Metildopa ilaç etken maddesinin tablet formundan, karışık matriks ortamından ekstraksiyonu için mentol bazlı hidrofobik derin ötektik çözücü sıvı faz mikroekstraksiyon tekniği geliştirildi. Bu kapsamda, ekstraksiyon parametreleri olan DÖÇ türü, pH ve mol oranı DÖÇ hacmi, tuz etkisi, vorteks süresi, santrifüj süresi, numune hacmi ve gerçek örnek çalışmaları yapıldı. Metildopa etken maddesinin tayini HPLC-UV cihazı ile yapıldı.

Metildopa tayini için HPLC metodu oluşturulması öncesinde, UV spektrofotometre cihazında 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması yapıldı. Metildopanin, maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 280 nm olarak tespit edildi. HPLC-UV analizleri için, (250 × 4.6 mm, 5 µm) bir C18 analitik kolon kullanıldı ve ayırmalar 30°C'de gerçekleştirildi. Sistem uygunluk parametreleri dikkate alınarak sulu %0.1 trifloroasetik asit içeren su:asetonitril (90:10, v/v) den oluşan bir mobil faz ile izokratik elüsyon uygulandı. Mobil fazın pH değeri 2.03 olarak ölçüldü. Akış hızı 1.2 mL dk⁻¹ ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlandı. Metot validasyonu için konsantrasyon aralığı 5-30 µg mL⁻¹ olarak seçildi. Yöntemin seçiciliği, mobil faz, numune ve standart çözelti enjeksiyonu ile gösterildi. Herhangi bir girişim gözlenmedi. Alıkonma süresi metildopa için 3.035 dakika olarak tespit edildi. Yöntemin doğrusal çalışma aralığı için, her bir konsantrasyon düzeyi için pik alanlarının ortalama değerleri belirlendi. Kalibrasyon eğrisi, pik alanına karşı konsantrasyon grafiği oluşturuldu. Yöntemlerin doğrusallığı regresyon analizi ve en küçük kareler yöntemi kullanılarak belirlendi. Regresyon analizi, güçlü bir korelasyon katsayısı (0.9999) ortaya çıkardı. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) belirtilen denkleme göre hesaplandı: LOD veya LOQ = $\kappa S_{Da}/b$, burada LOQ için $\kappa=10$ ve LOD için $\kappa=3$, S_{Da} kesmenin standart sapmasını temsil eder ve b eğimi temsil eder. LOD: 0.40 µg mL⁻¹ ve LOQ: 1.20 µg mL⁻¹ olarak belirlendi. Yöntem doğruluğu için, standart ekleme tekniği uygulandı. Numune çözeltisine üç farklı miktarda metildopa standardı eklenerek belirlendi. Eklenen miktarlar, hedef konsantrasyonun (20 mg mL⁻¹) sırasıyla %80, %100 ve %120 oranlarında değiştirilmesiyle uygulandı. Farklı konsantrasyonlardaki bu çözeltiler üç kez analiz edilerek ve % geri kazanım değerleri ve bağıl hata değerleri hesaplandı. Geri kazanım verileri %99.00-100.31 arasında değişirken, RSD ve bağıl hata %1'den düşük olarak bulundu. Yöntemin kesinliği, gün içi tekrarlanabilirlik, standart çözeltinin (20 µg mL⁻¹) üç kez enjeksiyonundan elde edilen alanların bağıl standart sapması (RSD %) belirlenerek aynı gün değerlendirildi. Günler arası tekrarlanabilirlik için aynı standart ardışık üç gün boyunca günde üç kez sisteme enjekte edildi. Elde edilen alanların bağıl standart sapması (RSD %) belirlenerek değerlendirildi. Bağıl standart sapması (RSD) sırasıyla %0.5203 ve %0.5911 olarak elde edildi. Sistem uygunluk parametreleri, en düşük (5 µg mL⁻¹), orta (15 µg mL⁻¹) ve en yüksek (30 µg mL⁻¹) konsantrasyonlarında enjeksiyonların değerlendirilmesiyle hesaplandı. Simetri faktörü 0.7408-0.7413 aralığında, pik alanları %RSD: 0.1635-0.1860 aralığında, alıkonma süresi %RSD:

0.0621-0.0746 aralığında, teorik tabaka sayısı (N): 5474-5485 aralıklarında tespit edilerek sistem uygunluğu belirlendi. Yöntemin sağlamlığı, kolon sıcaklığının, mobil faz akış hızının, mobil fazdaki asetonitril içeriği ve pH değerinin, belirli oranlarda değiştirilmesi bu analitin alıkonma süresi üzerindeki etkisi test edildi. Tüm şartlarda RSD seviyesi %2'den düşük olarak tespit edildi.

Metildopanin, HPLC-UV ile tayini için metod oluşturulup validasyonu yapıldıktan sonra, tez çalışması kapsamında 5 adet mentol bazlı HDÖÇ (mentol-laktik asit, mentol-dekanoik asit, mentol-bütanol, mentol-hekzanoik asit, mentol-timol) hazırlanmıştır. HDÖÇ ü oluşturan maddeler 1-1 mol oranı ile karıştırılıp homojenize oluncaya kadar ısıtılma işlemine tabi tutuldu. Çözelti ısıtılma işlemi sonrasında karışımın tamamlanması için 3 dk. boyunca vortekste karıştırıldı. Tez çalışmasında kullanılan HBA (Mentol) ve HBD (Bütanol-1) arasındaki hidrojen bağı oluşumunu tespit için FT-IR spekturumları alındı. Bütanol için OH piki 3326.7 cm^{-1} , mentol için OH piki 3268.2 cm^{-1} olarak ölçülürken, mentol-bütanol karışımı için 3332 cm^{-1} olarak ölçüldü. Spektrumdaki bu kayma oluşan yeni hidrojen bağına göstermekte ve yeni HDÖÇ karışımının varlığını desteklemektedir.

Önderiştirme işlemi, stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanan, metildopa konsantrasyonu 20 mg L^{-1} olan model çözeltilere uygulandı ve önderiştirilen analit HPLC-UV tekniği ile tayin edilerek geri kazanım değerleri hesaplandı. HDÖÇ ekleme, çözelti pH'ı ayarlama, vorteks ve santrifüj işlemleri sonrasında ayrılan HDÖÇ fazından $300\text{ }\mu\text{L}$ mikropipet yardımıyla alınarak cam vial konuldu ve metanol ile $900\text{ }\mu\text{L}$ 'ye tamamlanarak analiz edildi. Ekstraksiyon parametreleri olan DÖÇ türü, pH ve mol oranı DÖÇ hacmi, tuz etkisi, vorteks süresi, santrifüj süresi, numune hacmi parametreleri optimize edildi ve geliştirilen yöntem piyasada satılan Alfamet marka her biri 250 mg metildopa içeren altı adet tablete başarı ile uygulandı.

HDÖÇ türünün belirlenmesi çalışmasında, metildopanin tayini için mentol-bütanol hidroforik derin ötektik çözücü karışımı kullanıldığında, diğer HDÖÇ türlerine göre daha yüksek bir geri kazanım değerinin elde edildiği görüldü. Çalışmanın diğer parametreleri mentol-bütanol HDÖÇ sistemi esas alınarak belirlendi. pH çalışması; çalışmada tayin edilen metildopa etken maddesinin pKa değeri 2.28 olup bazik çözeltilerde iyonlaşmaktadır. Mentol-Bütanol HDÖÇ karışımının pH değeri ise 4.5 dir. Bu kapsamda pH'ın analitlerin geri kazanımına etkisi incelendi. Numune pH'ı

0.01 M HCl ve 0.01 M NaOH çözeltileri ile 2 ve 8 arasında ayarlanarak mikroekstraksiyon yöntemi uygulandı. Geri kazanım verilerinin pH 7 şartlarında kantitatif olduğu gözlemlendi. HDÖÇ bileşim oranları çalışması; Mentol-Bütanol HDÖÇ karışımı için 0.5-1, 1-1, 1-2, 1-3 mol oranlarında karışımlar hazırlandı ve yöntem uygulandı, 1-1 Mentol-Bütanol karışımı kullanıldığında kantitatif geri kazanım sonuçları elde edildi. Analitlerin geri kazanımına tuz etkisi, tez çalışmasında oluşturulmuş olan yöntemde model çözeltilere ağırlıkça 0-30 mg aralığında değişen miktarlarda tuz ilavesi yapılarak test edildi. 3 mL lik çözeltilere mikroekstraksiyon yöntemi uygulanıp, HPLC-UV cihazıyla numuneler analiz edildi. Geri kazanım verilerinden tuz ilavesinin ekstraksiyon verimini düşürdüğü gözlemlendi. Çalışmanın geri kalanına tuz ilavesi olmadan devam edildi. Vorteks süresi çalışması için mikroekstraksiyon yönteminin uygulandığı 14 mL'lik plastik tüpler, vorteks ile 0-3 dk. arasında karıştırıldı. 3. dk. sonrasında kantitatif geri kazanım verileri elde edildi. Santrifüj süresi çalışmasında, numune fazı ile HDÖÇ fazını etkili ve hızlı bir şekilde birbirinden ayırmak için santrifüj kullanıldı (3000 rpm). 0-20 dk. arasında numuneler santrifüj edilerek geri kazanım verileri değerlendirildi ve 15 dk santrifüj sonrası metildopanin kantitatif geri kazanıldığı görüldü. HDÖÇ hacmi çalışmasında, HDÖÇ hacmi 50-500 µL arasında test edildi. %95 üzeri geri kazanım verileri 300 µL HDÖÇ kullanıldığında elde edildi. Çalışmanın geri kalan kısmında HDÖÇ hacmi 300 µL olarak belirlendi. Numune hacmi çalışmasında, kantitatif geri kazanım değerlerinin düştüğü maksimum hacmi tespit etmek için 5-45 mL hacim aralığında numuneye, yöntem uygulandı. Numune hacmi 40 mL'den fazla olduğunda geri kazanım verilerinin düştüğü görüldü. Bu kapsamda 300 µL HDÖÇ ekstrant ile çalışılabilecek maksimum numune hacmi 40 mL olarak belirlendi ve 900 µL son hacim esas alındığında zenginleştirme faktörü 44.4 olarak bulundu.

Yöntemin istatistiksel değerlendirilmesinde; yöntem uygulanmadan doğrudan standart çözeltilerle ve HDÖÇ yöntemi uygulanarak önderiştirilmiş kalibrasyon grafikleri çizilerek hesaplamalar yapıldı. Teorik zenginleştirme faktörü olan PF (Preconcentration factor) başlangıç çözeltisinin maksimum hacminin, minimum elüent hacmine bölünmesiyle, 44.4 olarak elde edildi. Deneysel zenginleştirme faktörü EF (Enhancement factor) ise ön deriştirmeli kalibrasyon eğrisinin eğiminin, ön deriştirmesiz kalibrasyon eğrisinin eğimine oranlanmasıyla 45.78 olarak elde edildi. Önderiştirmesiz kalibrasyon eğrisi korelasyon katsayısı R^2 : 0.9999, önderiştirmeli

kalibrasyon eğrisi korelasyon katsayısı R^2 : 0.9983 olarak bulundu. LOD, LOQ önderiştirmeli kalibrasyon eğrisinden şu formülasyonla hesaplandı; LOD veya LOQ = $\kappa S_{Da}/b$, burada LOQ için $\kappa=10$ ve LOD için $\kappa=3$, S_{Da} kesmenin standart sapmasını temsil eder ve b eğimi temsil etmektedir. Bu formülasyondan, LOD: 0.0107 mg L⁻¹, LOQ: 0.0323 mg L⁻¹ olarak bulundu. Tüketim indeksi, bir birimlik zenginleştirme faktörü için harcanan numune hacmidir ve numune hacminin, deneysel zenginleştirme faktörüne bölünmesiyle 0.87 olarak elde edildi

Geliştirilen HDÖÇ mikroekstraksiyon yöntemi; Alfamet marka her biri 250 mg M-Dopa içeren altı adet tablete uygulandı. HPLC-UV analiz sonuçlarından; hesaplanan ortalama ($\bar{A}$), standart sapma (s), bağıl standart sapma (RSD %) değerleri elde edildi. Sonuçlardan, yöntemin piyasada tablet formundaki ilaç preparatlarına uygulanabilir olduğu gözlemlendi. Mentol-Bütanol-1 hidrofobik derin ötektik çözücü, literatür ile karşılaştırıldığında, nötr pH ortamında çalışabilmesi, yüksek zenginleştirme faktörü eldesi ve düşük gözlenebilme sınırına sahip olması bakımından, ilaç etken madde analizlerinde, seçmiş olduğumuz etken madde olan Metildopa tayini çalışmalarında kullanılabilir bir teknik olarak literatüre sunuldu.

6. KAYNAKLAR

Abbott, A.P., Glen C., Davies, D.L., Rasheed R.K., Tambyrajah, V., “Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures.”, *Chem. Commun*, 70–71. (2003).

Abdallah I. A., El- Behairy M. F., Ahmed R. M., Fayed M. A. A., “The anti- COVID- 19 drug Favipiravir: Degradation, Method development, Validation, NMR/LC–MS characterization, and In- vitro safety evaluation”, *Chemical Papers*, 76:6415–6426, (2022).

Ahuja, S., “Assuring quality of drugs by monitoring impurities.”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (1), 3-11, (2007).

Alp Ç., Karahan İ., Kalçık M., “Adverse reactions associated with the use of antihypertensive drugs: Review in the light of current literature”, *Turk Clin Lab*, 4:342-347, (2018).

Alver E, Demirci A, Özcimder M, “Microextraction Methods, Journal of Engineering and Natural Sciences”, *Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, Sigma 30, 75-90, (2012).

Ansari S., Moghadassi A., Hosseini S.M., “A new approach to tailoring the separation characteristics of polyethersulfone nanofiltration membranes by 8-hydroxyquinoline functionalized Fe₃O₄ nanoparticles”, *Korean J. Chem. Eng.*, 37(11), 2011-2019, (2020).

Baghban, N., Yilmaz, E., Soylak, M., “A Magnetic MoS₂-Fe₃O₄ Nanocomposite as an Effective Adsorbent for Dispersive Solid Phase Microextraction of Lead (II) and Copper (II) Prior to Their Determination by FAAS.”, *Microchim. Acta*, 184, 3969–3976, (2017).

Bagheri, H., Afkhami, A., Saber-Tehrani, M., & Khoshsafar, H., “Preparation and characterization of magnetic nanocomposite of Schiff base/silica/magnetite as a preconcentration phase for the trace determination of heavy metal ions in water, food and biological samples using atomic absorption spectrometry”, *Talanta*, 97, 87-95, (2012).

Baig J. A., Hol A., Akdogan A., Kartal A. A., Divrikli U., Kazi T. G., Elci L., “A novel strategy for chromium speciation at ultra-trace level by microsample injection flame atomic absorption spectrophotometry”. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27(9), 1509-1517, (2012).

Bingöl E., “Yağ Temelli Polimer/Silika-Magnetit Kompozit Üretimi ve Özelliklerinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2012).

Brown R.J.C., Milton, M.J.T. “Analytical techniques for trace element analysis: an overview”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(3),266-274, (2005).

Brummer H., “How to approach a forced degradation study”, *Life Sci. Technol. Bull*, 31, 1–4, (2011).

Brummer S., Quadri H. S., Sonwane L. V., Poul B. N., Kamshette S. N., “Review on Stability Indicating Assay Methods (SIAMs)”, *PharmaTutor*, 2014; 2(8); 16-31, (2014).

Cao J., Su E., “Hydrophobic deep eutectic solvents: the new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry”, *Journal of Cleaner Production*, 314 (2021) 127965, (2021).

Chabib C. M., Ali J. K., Jaoude M. A., Adeyemi E. A., Nashef I. M., “Application of deep eutectic solvents in water treatment processes: A review”, *Journal of Water Process Engineering*, 47, (2022).

Cipurković A., Horović E., Marić S., Mekić L., Junuzović H., “Metal Complexes with 8-Hydroxyquinoline: Synthesis and In Vitro Antimicrobial Activity”, *Open Journal of Applied Sciences*, 11, 1-10, (2021).

Çaylak O., “Polimerik Reçine İle Cıva Türlemesi ve Manyetik Nanoparçacık Kullanımıyla Eser Elementlerin Katı Faz Ekstraksiyonu”, Doktora Tezi, *Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2019).

Çaylak O., Elçi Ş., Höl A., Akdoğan A., Divrikli Ü., Elçi L., “Use of an aminated Amberlite XAD-4 column coupled to flow injection coldvapour generation atomic

absorption spectrometry for mercury speciation in water and fish tissue samples”, *Food Chemistry*, 274, 487-493, (2019).

Dalmaz A., Özak S.S., “DES-based vortex-assisted liquid-liquid microextraction procedure developed for the determination of paraben preservatives in mouthwashes”, *Microchemical Journal*, 179, 107445, (2022).

Daş, P.C., “Nilotinib’in proses ve bozunma safsızlıklarının belirlenmesi için stabilite göstergeli bir HPLC yönteminin geliştirilmesi ve metod validasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı*, (2023).

Demircan Ş., “Makrolit grubu bazı antibakteriyel ilaçların kromatografik davranışlarının incelenmesi ve geliştirilen analiz yöntemlerinin valide edilmesi ve uygulamaları”, Doktora tezi, *Hacettepe Üniversitesi*, (2010).

Demirkan K, Ekincioğlu AB., “Enteral beslenme tüpünden ilaç uygulanmasında ilaç dozaj şekillerinin önemi.”, *J Turk Soc Intens Care*, 14:1-8, (2016).

Dirgayanti D.S., Koesnarpadi S., Hindryawati N., “Synthesis and characterization of Fe₃O₄-Activated Carbon and its application to adsorb methylene blue”, *Earth and Environmental Science*, 623 012070. (2021).

Dolan S.P., Nortrup D.A., Bolger P.M., Capar S.G., “Analysis of dietary supplements for arsenic, cadmium, mercury, and lead using inductively coupled plasma mass spectrometry”, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1307–1312, (2003).

Duran C., Senturk H.B., Gundogdu A., Bulut V.N., Elci L., Soylak M., Tufekci M., Uygur Y., “Determination of Some Trace Metals in Environmental Samples by Flame AAS Following Solid Phase Extraction with Amberlite XAD-2000 Resin after Complexing with 8-Hydroxyquinoline”, *Chinese Journal of Chemistry*, 25, 196—202, (2007).

Elçi Ş.G., “Determination of cobalt in food by magnetic solid-phase extraction MSPE preconcentration by polyaniline PANI and polythiophene PTH coated magnetic nanoparticles MNPs and microsample injection system flame atomic absorption spectrometry MIS-FAAS ,” *Instrumentation Science & Technology*, 49, 258–275, (2021).

Emma L.S., Abbott A.P., Karl S.R., “Deep eutectic solvents (DESs) and their applications”, *Chemical Reviews*, 114 11060–11082, (2014).

EPA 200.8 Method, “Determination Of Trace Elements In Waters And Wastes By Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”, <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-06/documents/epa-200.8.pdf>, (1994).

Fan X.H., Wang L.T., Chang Y.H., An J.Y., Zhu Y.W., Yang Q., Meng D., Fu Y.J., “Application of green and recyclable menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents aqueous for the extraction of main taxanes from *Taxus chinensis* needles”, *Journal of Molecular Liquids*, 326, 114970. (2021).

Farimani M.H.R., Shahtahmassebi N., Roknabadi M.R., Ghows N., “Synthesis and study of structural and magnetic properties of superparamagnetic Fe₃O₄@SiO₂ core/shell nanocomposite for biomedical applications”, *Nanomedicine Journal*, 1, 2, 71-78, (2014).

FDA, “Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics”, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Pharmaceutical Quality/CMC, <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>, (2015).

Feist B., Mikula B., “Preconcentration of some metal ions with lanthanum-8-Hydroxyquinoline co-precipitation system”, *Food Chemistry*, 147-15, 225-229, (2014).

Gao F., Liu L. L., Tang W., Zhu K. H. R. T., “Optimization of the chromatographic behaviors of quercetin using choline chloride-based deep eutectic solvents as HPLC mobile-phase additives”, *Separation Science and Technology*, 53:2,397-403, (2018).

Gonçalves M.S., Armstrong D.W., Cabral L.M., Pinto E.C., Sousa V.P., “Development and validation of a fast HPLC method for methyl dopa enantiomers using superficially porous particle based macrocyclic glycopeptide stationary phase”, *Microchemical Journal*, 164- 105957, (2021).

He S., Tang W., Row K.H., “Determination of Thiophanate-Methyl and Carbendazim from Environmental Water by Liquid-Liquid Microextraction (LLME) Using a

Terpenoid Based Hydrophobic Deep Eutectic Solvent and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)”, *Analytical Letters*, 55, 8, 1235–1248, (2022).

Heidari H., Mammotafaei C., “Spectrophotometric determination of lamotrigine in plasma samples: Ultrasound-assisted emulsification-microextraction based on a hydrophobic deep eutectic solvent followed by back-extraction”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 247, 119098, (2021).

Holm R., Elder D. P., “Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87, 118–135, (2016).

Höl A., “Bazı metal ve organometalik bileşiklerin kromatografik ve spektroskopik tayinleri”, Doktora tezi, *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2011).

Höl, A., Akdoğan, A., Kartal, A.A., Divrikli, U., Elci, L., “Dispersive Liquid–Liquid Microextraction of Nickel Prior to Its Determination by Microsample Injection System-Flame Atomic Absorption Spectrometry”, *Analytical Letters*, 47(13), 2195-2208, (2014).

Huang C., Hu B., “Silica-coated magnetic nanoparticles modified with γ -mercaptopropyl trimethoxysilane for fast and selective solid phase extraction of trace amounts of Cd, Cu, Hg, and Pb in environmental and biological samples prior to their determination by inductively coupled plasma mass spectrometry”, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63(3), 437-444, (2008).

ICH guidelines, Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products (revision 2), International Conference on Harmonization. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf>, (2003).

ICH guidelines, Q2(R1): Validation Of Analytical Procedures:Text And Methodology (revision 1), International Conference on Harmonization. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>, (2005).

ICH guidelines, Q3D(R2): Guideline For Elemental Impurities, International Conference on Harmonization. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D-R2_Guideline_Step4_2022_0308.pdf, (2022).

Jagirani M.S., Soylak M., “Deep eutectic solvents-based adsorbents in environmental analysis”, *Trends in Analytical Chemistry*, 157 (2022) 116762, (2022).

Kanberoglu G.S., Yilmaz E., Soylak M., “Application of deep eutectic solvent in ultrasound-assisted emulsification microextraction of quercetin from some fruits and vegetables”, *J Mol Liq*, 279: 571– 577, (2019).

Kanberoglu G.S., Yilmaz E., Soylak M., “Fabrication and characterization of SiO₂@Fe₃O₄@nanodiamonds for vortex- assisted magnetic solid- phase extraction of lead in cigarette samples prior to FAAS detection”, *Journal of the Iranian Chemical Society*, (2020).

Karaçağıl D., “İstanbul’da Belirlenmiş Sahil Şeritlerinde Toprak Kalitesi ve Ağır Metal Kirliliği”, Yüksek Lisans Tezi, *Bahçeşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 4-8-11-12, (2013)

Karatapanis A.E., Fiamegos Y., Stalikas C.D., “Silica-modified magnetic nanoparticles functionalized with cetylpyridinium bromide for the preconcentration of metals after complexation with 8-Hydroxyquinoline”, *Talanta*, 84-3, 834-839, (2011).

Kartal, G., Güven, A., Kahvecioğlu, Ö., Timur, S., *Metallerin Çevresel Etkileri –II*, İTÜ, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, (2004).

Khan S., Soylak M., Kazi T. G., “Room temperature ionic liquid-based dispersive liquid phase microextraction for the separation/preconcentration of trace Cd²⁺ as 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) complex from environmental and biological samples and determined by FAAS.”, *Biological Trace Element Research*, 156(1-3), 49-55.,(2013).

Köksal M., “Sıvı Yağlarda Eser Metal Zenginleştirilmesi İçin Yeni Bir Yaklaşım”, Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı*, (2016).

Lasztity A., Levai A.K., Varga I., Perenyi K.Z., Bertalan E., “Development of atomic spectrometric methods for trace metal analysis of pharmaceuticals” *Microchem. J.*, 73, 59–63, (2002).

Lewen N., Mathew S., Schenkenberger M., Raglione T., “A rapid ICP-MS screen for heavy elements in pharmaceutical compounds”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35, 739–752, (2004).

Li X. S., Zhu G. T., Luo Y. B., Yuan B. F., Feng Y. Q., “Synthesis and Applications of Functionalized Magnetic Materials in Sample Preparation”. *Tr AC Trends Anal. Chem.*, 45: 233-247, (2013).

Ma S., Jin X., Wei H., Liu Y., Guo M. “Hydrophobic deep eutectic solvent-based ultrasonic-assisted liquid-liquid micro-extraction combined with HPLC-FLD for diphenylamine determination in fruit”, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38:2, 339-349, (2021).

Maity, D., Agrawal, D.C., “Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 308(1), 46-55, (2007).

Martins M.A.R., Pinho S.P., Coutinho J.A.P., “Insights into the nature of eutectic and deep eutectic mixtures.” *J. Solut. Chem.*, 48, 962–982, (2019).

Marzouk H. M., Rezk M. R., Gouda A. S., Ahmed M., Megied A. M. A., “A novel stability-indicating HPLC-DAD method for determination of favipiravir, a potential antiviral drug for COVID-19 treatment; application to degradation kinetic studies and in-vitro dissolution profiling”, *Microchemical Journal*, 172, 106917, (2022).

Matong J.M., Nyaba L., Nomngongo P.N., “Determination of As, Cr, Mo, Sb, Se and V in agricultural soil samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after simple and rapid solvent extraction using choline chloride oxalic acid deep eutectic solvent”. *Ecotox Environ Safe*, 135: 152– 157., (2017).

Mattiazia P., Bohrer D., Becker E., Viana C., Nascimento P. C., Carvalho L. M., “High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for screening elemental impurities in drugs to adhere to the new international guidelines”, *Talanta*, 197 20–27, (2019).

Meszaros, E., Comparison of RNA and DNA extraction methods [online], 09.04.2022, <https://www.integra-biosciences.com/global/en/blog/article/comparison-rna-and-dna-extraction-methods>, (2021).

Mohammad H.A., Rahimpour Z., “CoFe₂O₄ nano-particles functionalized with 8-Hydroxyquinoline for dispersive solid-phase micro-extraction and direct fluorometric monitoring of aluminum in human serum and watersamples” *Analytica Chimica Acta*, 881-54, 64, (2015).

Munoz M., Pedro Z.M., Casas J.A., Rodriguez J.J., “Preparation of magnetite-based catalysts and their application in heterogeneous Fenton oxidation - A review”, *Applied Catalysis B: Environmental*, 176–177, 249–265, (2015).

Okcu M., Tozlu E., Kumlay A., Pehlivan M., “Ağır Metallerin Bitkiler Üzerinde Etkileri”, *Iğdır Üniversitesi Alinteri*, 17 (B), 14-26, (2009).

Okudan M., “Kobalt ve Molibden İçeren Kullanılmış Hidrodesülfürizasyon (HDS) Katalizör Atıklarına Asidik Ve Alkali Liç Uygulaması”, Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, 6-9-13, (2009).

Orisakwe O.E., Nduka J.K., “Lead and cadmium levels of commonly administered pediatric syrups in Nigera: a public health concern?” *Total Environ.*, 47, 5993–5996, (2009).

Osch D.J.G.P. , Zubeir L. F., Bruinhorst A. V., Rocha M.A.A., Kroon M. C., “Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants.”, *Green Chem.*, 17, 4518–4521. (2015).

Önder S., “Atıksular İle Sulanan Zirai Alanlardaki Ağır Metal Kirliliğinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 3-4-11-17-24-25, (2012).

Özbolat G, Tuli A. “Ağır metal toksisitesinin insan sağlığına etkileri.”, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 25(4):502-521, (2006).

Özkan G., “Endüstriyel Bölge Komşuluğunda Kıyısal Kırsal Alandaki Hava Kalitesi; Muallimköy’de Partikül Maddede ve Topraktaki Ağır Metal Kirliliği”, Yüksek Lisans Tezi, *GYTE Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gebze, 9,12-22, (2009).

Pasupuleti R. R., Wang Z.F., Ya W.J., Kuo C.A., Chao Y.Y., Huang Y.L., “Extraction and detection of chlorophenols in water samples using deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction coupled with HPLC-UV”, *Microchemical Journal*, 182, 107843, (2022).

Patel R., Dube A., Solanki R., Khunt D., Parikh S., Junnuthula V., Dyawanapelly S., “Structural Elucidation of Alkali Degradation Impurities of Favipiravir from the Oral Suspension: UPLC-TQ-ESI-MS/MS and NMR”, *Molecules*, 27, 5606, (2022).

Pathade A. R., Gurumukhi V. C., Chalikwar S. S., Patil K. R., “Development, Validation And Stability Indicating Hplc Method”, *An Overview. Indo American Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 06(04), 8401–8412, (2019).

Pinheiro F. C., Barros A. I., Obrega J. A. N., “Microwave-assisted sample preparation of medicines for determination of elemental impurities in compliance with United States Pharmacopeia: How simple can it be?”, *Analytica Chimica Acta*, 1065 1-11, (2019).

Pirhaseb M., Hosseini H., Sorkali H.M., Fattahi N., Noori N., “Preconcentration and determination of amoxicillin and ceftriaxone in hospital sewage using vortex-assisted liquid-phase microextraction based on the solidification of the deep eutectic solvent followed by HPLC–UV”, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 99:2, 112-123, (2019).

Reynolds, D. W., Facchine, K. L., Mullaney, J. F., Alsante, K. M., Hatajik, T. D., Motto M. G., “Conducting forced degradation studies.”, *Pharm Technol*, 26(2), 48-56, (2002).

Ribeiro B.D., Florindo C., Iff L.C., Coelho M.A.Z., Marrucho I.M., “Menthol-based eutectic mixtures: hydrophobic low viscosity solvents.”, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 3, 2469–2477, (2015).

Sakallıoğlu H., "Manyetik Nanopartiküller Üzerine Desteklenmiş Schiff Bazı Türevi Metal Komplekslerinin Sentezleri Ve Katalitik Etkinliklerinin İncelenmesi," Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2013).

Šafaříková M., Šafařík, I. “Magnetic solid-phase extraction”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194,1-3 (1999).

Seneviratne SL, Abeysuriya V, De Mel S, De Zoysa I, Niloofa R., “Favipiravir in COVID-19.”, *IJPSAT*.;19(2):143-145, (2020).

Sereshti H., Jazani S.S., Nouri N., Shams G., “Dispersive liquid–liquid microextraction based on hydrophobic deep eutectic solvents: Application for tetracyclines monitoring in milk”, *Microchemical Journal*, 158, 105269. (2020).

Singh S., Bakshi, M., “Guidance on the conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs.”, *Pharmaceutical Technology Asia*, 24-24, (2000).

Sodan N.E., Elci S.G., Kartal A.A., Hol A., Elci L., “Speciation and preconcentration of chromium in real samples by magnetic polythiophene nanoparticle solid-phase extraction (SPE) coupled with microsampling injection – flame atomic absorption spectrometry (FAAS)”, *Instrumentation Science & Technology*, Vol. 49, No. 6, 585–603, (2021).

Sodan N.E., Hol A., Çaylak O., Elçi L., “Use of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Coated with Polythiophene for Simultaneous Preconcentration of Cu (II), Co (II), Cd (II), Ni (II) and Zn(II) Ions Prior to their Determination by MIS-FAAS”, *Acta Chim. Slov.*, 67, 375–385, (2020).

Soylak M., Kaya B., Tuzen M., “Copper(II)-8-Hydroxquinoline coprecipitation system for preconcentration and separation of cobalt(II) and manganese(II) in real samples”, *Journal of Hazardous Materials*, 147, 832–837, (2007).

Sönmez S., Divrikli U., Elci L., “New use of polypyrrole-chloride for selective preconcentration of copper prior to its determination of flame atomic absorption spectrometry”, *Talanta*, 82, 939–94, (2010).

Sürmelioglu N., Demirkan K., “COVID-19 Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Akılcı İlaç Kullanımı”, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 29 (Özel Sayı 1):44-53, (2020).

Tahmasebi, E., Yamini, Y., Moradi, M., Esrafil, A., “Polythiophene-coated Fe₃O₄ superparamagnetic nano composite: Synthesis and application as a new sorbent for solid-phase extraction”, *Analytica Chimica Acta*, 770(3), 68-74, (2013).

Tan L., Wang J., Liu Q., Sun Y., Zhang H., Wang Y., Jing X., Liu J., Song K.D., Facile preparation of oxine functionalized magnetic Fe₃O₄ particles for enhanced uranium (VI) adsorption”, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 466 85–91, (2015).

Tang B., Row K.H., “Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences”, *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly*, 144 1427–1454, (2013).

Vemuri D. K., Gundla R., Konduru N., Mallavarapu R., Katari N. K., “Favipiravir (SARS-CoV-2) degradation impurities: Identification and route of degradation mechanism in the finished solid dosage form using LC/LC–MS method”, *Biomedical Chromatography*, 36:e5363, (2022).

Wagle D.V., Zhao H., Baker G.A., “Deep eutectic solvents: sustainable media for nanoscale and functional materials”, *Accounts of Chemical Research*, 47 2299–2308, (2014).

Wang H., Liu L. H., Liu X., Yin S., Lu R., Zhang S., Zhou W., Gao H., “Deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in water samples”, *Journal of Chromatography A*, 1516 1–8, (2017).

Wang T., Wu J., Hartman R., Jia X., Eagan R., “A multi-element ICP-MS survey method as an alternative to the heavy elements limit test for pharmaceutical materials”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23867–890, (2000).

Werner J., “Novel deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of the aqueous phase for HPLC-UV determination of aromatic amines in environmental samples”, *Microchemical Journal*, 153, 104405, (2020).

Wollein U., Bauer B., Habernegg R., Schramek N., “Potential metal impurities in active pharmaceutical substances and finished medicinal products – A market surveillance study”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77, 100–105, (2015).

Yalçın İ, Farmasötik Kimya Pratikleri, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 17-63, (2004).

Yan L., Li S. Yu H., Shan R., Du B., Liu T., “Facile solvothermal synthesis of Fe₃O₄/bentonite for efficient removal of heavy metals from aqueous solution”, *Powder Technology*, 301, 632–640, (2016).

Yavuz O, Aksoy A, “Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu”, *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 20(3), 259-269, (2006).

Yılmaz E., “Mikroekstraksiyon İle Eser Türlerin Ayrılması, Zenginleştirilmesi Ve Türleştirilmesi”, Doktora tezi, *Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı*, (2016).

Yuan P., Fan M., Yang D., He H., Liu D., Yuan A., Zhu J.X., Chen T.H., “Montmorillonite-supported magnetite nanoparticles for the removal of hexavalent chromium [Cr(VI)] from aqueous solutions”, *Journal of Hazardous Materials*, 166, 821–829, (2009).

Yuvali D., Seyhaneyildizi M., Soylak M., Narin İ., Yılmaz E., “An environment-friendly and rapid liquid-liquid microextraction based on new synthesized hydrophobic deep eutectic solvent for separation and preconcentration of erythrosine (E127) in biological and pharmaceutical samples”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 244, 118842, (2021).

Zachariadis G., Raidou E.S., Themelis D.G., Stratis J.A., “Determination of mineral content of active dry yeast used in pharmaceutical formulations”, *J. Pharm.Biomed. Anal.*, 28, 463–473, (2002).

Zachariadis G.A., Michos C.E., “Development of a slurry introduction method for multi-element analysis of antibiotics by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using various types of spray chamber and nebulizer configurations”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43, 951–958, (2007).

Zhao H., Xia S., Ma P., “Review use of ionic liquids as ‘green’ solvents for extractions”. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 1089–1096, (2005).