

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FENİTOİN İLAÇ ETKEN MADDESİNİN SENTEZİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE MEBÇS-SFME-GC-MS ANALİTİK
YÖNTEMİYLE ESER SEVİYELERDE TAYİNİ**

Gizem Nur AYAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı

Danışman

Doç. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA

Eş Danışman

Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

Temmuz, 2023

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FENİTOİN İLAÇ ETKEN MADDESİNİN SENTEZİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE MEBÇS-SFME-GC-MS ANALİTİK
YÖNTEMİYLE ESER SEVİYELERDE TAYİNİ

Gizem Nur AYAN tarafından hazırlanan tez çalışması 26.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Zuhale TURGUT, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Elif ÖZTÜRK ER, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA ve eş danışmanım Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “Fenitoin İlaç Etken Maddesinin Sentezi, Saflaştırılması ve MEBÇS-SFME-GC-MS Analitik Yöntemiyle Eser Seviyelerde Tayini” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Gizem Nur AYAN



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2022-4855 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Aileme
ve
tüm sevdiklerime

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada bana yön gösteren, engin bilgi ve tecrübesiyle lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca gelişimime büyük katkılar sağlamış olan, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım değerli danışmanım Doç. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA'ya,

Çalışma boyunca farklı bakış açıları kazanmamı sağlayan, beni yüreklendiren ve bu teze derin bilgisiyle katkılar sunan değerli eş danışmanım Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE'ye, Laboratuvar çalışmaları süresince gösterdikleri sabır, özveri ve desteklerinden dolayı Araş. Gör. Sezin ERARPAT, Kumsal EROĞLU, Araş. Gör. Süleyman BODUR'a ve Günkara Araştırma Grubu üyelerine,

Eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem, babam, ailem ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Gizem Nur AYAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1 GİRİŞ	18
1.1 Tezin Amacı	19
1.2 Hipotez	19
2 LİTERATÜR ÖZETİ	21
2.1 Antiepileptik İlaçlar Hakkında Genel Bilgi	21
2.2 Fenitoin (5,5-Difenilhidantoin)	24
2.3 Fenasemid (N-karbomoil-2-fenilasetamid)	28
2.4 Kromatografi	29
2.5 Sıvı Kromatografi	30
2.6 Gaz Kromatografi	31
2.7 Gaz Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi (GC-MS)	34
2.8 Ekstraksiyon	36
2.9 Katı Faz Ekstraksiyonu (KFE)	36
2.10 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon (SSE)	37
2.11 Mikroekstraksiyon	37
2.12 Validasyon	42
2.13 Gözlenebilme Limiti (GL) ve Tayin Limiti (TL)	42
2.14 Kesinlik, Doğruluk ve Geri Kazanım	43
2.15 Literatürde Fenitoin ile Yapılan Çalışmalar	43
3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR	46
3.1 Kimyasallar/ Reaktifler	46
3.2 Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler	48

3.3 Metal Elek Bağlantılı Çift Şırınga-Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (MEBÇŞ-SFME) Yöntemi.....	49
4 SONUÇ VE ÖNERİLER	51
4.1 Türevlendirme Rekasiyonları ve Karakterizasyon Çalışmaları	51
4.2 Optimizasyon Çalışması.....	69
4.3 GC-MS ve MEBÇŞ-SFME-GC-MS Sistemlerinin Analitik Performans Çalışmaları	73
4.4 MEBÇŞ-SFME Yöntemi İçin Geri Kazanım Çalışmaları	75
5 SONUÇ	79
KAYNAKÇA	80
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	91



SİMGE LİSTESİ

pKa	Asidik iyonlaşma sabiti
$\pm$	Belirsizlik
$\geq$	Büyük eşittir
$>$	Büyüktür
dk	Dakika
Rpm	Dakikada devir sayısı
D	Döteryum
M	Eğim
G	Gram
Kg	Kilogram
$<$	Küçüktür
m/z	Kütle/Yük
R ²	Korelasyon katsayısı
L	Litre
M	Metre
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar
Mg	Miligram
mL	Mililitre
M	Molar
Nm	Nanometre
Cm	Santimetre
S	Saniye
°C	Santigrat derece
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AAAS	Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi
BSS	Bağıl Standart Sapma
DSSME	Dağıtıcı Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DCE	Dikloroetan
DCM	Diklorometan
DA	Doğruluk Aralığı
DİS	Dörtlü İzotop Seyretlme
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
GABA	Gama Aminobütirik Asit
GC	Gaz Kromatografisi
GK	Geri Kazanım
GL	Gözlenebilme Limiti
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
KFE	Katı Faz Ekstraksiyonu
KFME	Katı Faz Mikroekstraksiyon
CHL	Kloroform
MS	Kütle Spektroskopisi
MEBÇŞ-SFME	Metal Elek Bağlantılı Çift Şırınga-Sıvı Faz Ekstraksiyon
5-HT	Serotonin
SFME	Sıvı Faz Mikroekstraksiyon
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi- Tandem Kütle Spektrometri
SSE	Sıvı Sıvı Ekstraksiyon
SS	Standart Sapma
TL	Tayin Limiti
TDME	Tek Damla Mikroekstraksiyon
UV	Ultraviyole

HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
YKDME	Yüzen Katı Damla Mikroekstraksiyon
YOKDME-HPLC-UV	Yüzen Organik Katı Damla Mikroekstraksiyon- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi- Ultraviyole
3'-HPPH	5-(3' hidroksifenil)-5-fenilhidantoin
3', 4'-diHPPH	5-(3', 4'-dihidroksifenil)-5-fenilhidantoin
4'-HPPH	5-(4'-hidroksifenil)-5-fenilhidantoin



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Epilepsi hastalığının insan beynindeki etkisi [13].....	22
Şekil 2.2	Sağlıklı ve epileptik nöbet esnasında beyin şematik gösterimi [20]	23
Şekil 2.3	Fenitoin molekülü.....	24
Şekil 2.4	Fenitoinin Na ⁺ kanalı üzerindeki etkisi [40].....	26
Şekil 2.5	Önerilen fenitoin mekanizması yolu [50].....	27
Şekil 2.6	Fenasemid molekülü.....	29
Şekil 2.7	HPLC sistemi için şematik diyagram a) Çözücü tankları; b) pompa; c) örnek enjeksiyon kısmı; d) kolon; e) dedektör; f) veri işleme; g) atık [87].....	31
Şekil 2.8	Gaz kromatografisi [91], [92].....	32
Şekil 2.9	GC-MS cihazı [103]	35
Şekil 2.10	MEBÇŞ-SFME-GC-MS yönteminin şematik gösterimi [141].....	41
Şekil 2.11	Kesinlik ve doğruluğun şematik gösterimi [147].....	43
Şekil 3.1	MEBÇŞ-SFME-GC-MS sistemi [142].....	49
Şekil 3.2	MEBÇŞ-SFME-GC-MS sisteminde kullanılan metal elek [141]	50
Şekil 4.1	Bileşik 1'e ait FTIR spektrumu	51
Şekil 4.2	Bileşik 1 reaksiyon aşamaları.....	52
Şekil 4.3	Bileşik 1'e ait FTIR spektrumu	52
Şekil 4.4	Bileşik 1 GC-MS kromatogramı	54
Şekil 4.5	Bileşik 2 sentez reaksiyonu	55
Şekil 4.6	Bileşik 2 reaksiyon aşamaları.....	55
Şekil 4.7	Bileşik 2 GC-MS kromatogramı	57
Şekil 4.8	Bileşik 3 sentez reaksiyonu	58
Şekil 4.9	Bileşik 3 GC-MS kromatogramı	59
Şekil 4.10	Bileşik 4 sentez reaksiyonu	60
Şekil 4.11	Bileşik 4 reaksiyon aşamaları.....	60
Şekil 4.12	Bileşik 4'e ait FTIR spektrumu	61
Şekil 4.13	GC-MS kütüphanesinde Bileşik 4.....	62
Şekil 4.14	Sentezlenen Bileşik 4 ile GC-MS kütüphanesinin karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.15	Bileşik 5 sentez reaksiyonu	64
Şekil 4.16	Bileşik 5 GC-MS kromatogramı ve MS spektrumu.....	66
Şekil 4.17	Bileşik 6 sentez reaksiyonu	67

Şekil 4.18 Bileşik 6 GC-MS kromatogramı	68
Şekil 4.19 Ekstraksiyon çözücü türü optimizasyonu.....	70
Şekil 4.20 Ekstraksiyon çözücü hacmi optimizasyonu	71
Şekil 4.21 Karıştırma süresi optimizasyonu	72
Şekil 4.22 Numune hacmi karşılaştırması	73
Şekil 4.23 Fenitoin GC-MS kalibrasyon grafiği.....	73
Şekil 4.24 Fenitoin MEBÇŞ-SFME kalibrasyon grafiği	74



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Kromatografi türlerinin sınıflandırılması [85]	29
Tablo 3.1 Deneylerde kullanılan kimyasallar/ reaktifler.....	46
Tablo 3.2 GC-MS cihaz programı.....	48
Tablo 4.1 Bileşik 1 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri	53
Tablo 4.2 Bileşik 2 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri	56
Tablo 4.3 Bileşik 3 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri	58
Tablo 4.4 Bileşik 4 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri	62
Tablo 4.5 Bileşik 5 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri	64
Tablo 4.6 Bileşik 6 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri	67
Tablo 4.7 GC-MS ve MEBÇS-SFME sistemlerinin karşılaştırılması	74
Tablo 4.8 Analitin çeşitli derişimlerde eklenmiş örnekler için geri kazanım değerleri	76
Tablo 4.9 MEBÇS-SFME yöntemi ile literatürdeki diğer yöntemlerin sistem analitik performanslarının karşılaştırılması	77

Fenitoin İlaç Etken Maddesinin Sentezi, Saflaştırılması ve MEBÇŞ-SFME-GC-MS Analitik Yöntemiyle Eser Seviyelerde Tayini

Gizem Nur AYAN

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA

Eş-Danışman: Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

İlaç etken maddelerinin eser düzeyde yüksek doğruluk ve duyarlılıkla belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında, epilepsi tedavisinde kullanılan bir ilaç etken madde olan fenitoinin eser miktarda tayini için yeni bir analitik strateji geliştirilmiştir. Fenitoinin önderiştirilmesi için metal elek bağlantılı çift şırınga-sıvı faz mikroekstraksiyon (MEBÇŞ-SFME) yöntemi kullanılmıştır. Fenitoinin eser seviyelerde ayrımı ve tespiti için gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları, analit için yüksek ekstraksiyon verimi elde etmek için ekstraksiyon solventinin türünü, ekstraksiyon solventinin hacmini, karıştırma süresini ve numune hacmi parametrelerini içermektedir. Geliştirilen MEBÇŞ-SFME-GC-MS yönteminin analitik performansı, gözlenebilme limiti (GL), tayin limiti (TL), lineer aralık, yüzde bağıl standart sapma (%BSS) açısından incelenmiştir. MEBÇŞ-SFME-GC-MS sisteminde fenitoin için GL ve TL değerleri sırasıyla 0,045 ve 0,151 mg/kg

olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem, 0,10 ve 10,96 mg/kg arasında 0,9995 (R^2) korelasyon katsayısı ile iyi bir doğrusallık göstermiştir. Geliştirilen yöntem, GC-MS sisteminin analitik performansı ile karşılaştırıldığında, analitin tespit gücünde yaklaşık 188 kat iyileşme sağlamıştır. Ayrıca yöntemin bazı gerçek numunelere uygulanabilirliğini test etmek amacıyla iki farklı yerden alınan evsel atıksu ve yapay idrar üzerinde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Evsel atık su ve yapay idrar örnekleri için yüzde geri kazanım değerleri sırasıyla %96-110 ve %92-107 arasındadır. %100'e yakın geri kazanım sonuçları, önerilen yöntemin evsel atıksu ve yapay idrar numunelerine yüksek doğruluk ve duyarlılıkla uygulanabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Fenitoin, gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi, metal elek bağlantılı çift şırınga-sıvı faz mikroekstraksiyon, evsel atık su, yapay idrar

Synthesis, Purification, and Determination of Trace Levels of Phenytoin Drug Substance Using MSCDS-LPME-GC-MS Analytical Method

Gizem Nur AYAN

Department of Chemistry

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA

Co-supervisor: Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

Determination of drug active ingredients at trace levels with high accuracy and sensitivity has great importance. In this thesis, a new analytical strategy was developed for the trace determination of phenytoin which is an active drug substance used in the treatment of epilepsy. Metal sieve coupled double syringe-liquid phase microextraction (MSCDS-LPME) method was used for the preconcentration of phenytoin. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used for the separation and detection of phenytoin at trace levels. Optimization studies included type of extraction solvent, volume of extraction solvent, mixing time and initial sample volume parameters to obtain high extraction efficiency for the analyte. Analytical performance of the developed MSCDS-LPME-GC-MS method was examined in terms of limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), linear range, percent relative standard deviation (%RSD). LOD and LOQ values for phenytoin in MSCDS-LPME-GC-MS system were calculated as 0.045 and 0.151 mg/kg, respectively. The developed method showed

good linearity with a correlation coefficient of 0.9995 (R^2) between 0.10 and 10.96 mg/kg. When compared to the analytical performance of the GC-MS system, the developed method provided an approximately 188-fold improvement in the detection power of the analyte. In addition, to test the applicability of the method to some real samples, recovery studies were carried out on domestic wastewater and artificial urine obtained from two different places. Percent recovery values for domestic wastewater and artificial urine samples were between 96-110% and 92-107%, respectively. Percent recovery results close to 100% showed that the proposed method was applicable to domestic wastewater and artificial urine samples with high accuracy and sensitivity.

Keywords: Phenytoin, gas chromatography-mass spectroscopy, metal sieve linked double syringe-liquid phase microextraction, domestic wastewater, artificial urine

Birçok nöbet bozukluğunun önlenmesi, kontrol edilmesi ve epilepsi hastalığının tedavisi amacıyla fenitoinin kullanımı oldukça yaygındır [1]. Uygun olmayan doz miktarında alındığında nöbet veya toksisite gibi ciddi sonuçlara yol açabilecek en sık kullanılan kritik ilaçlardandır. Bu sebeple fenitoin konsantrasyonlarının izlenmesi ve hassas tayini hastalar için büyük önem arz etmektedir [2], [3].

Literatürde kan ve tükürük gibi çeşitli matrisler üzerinde fenitoin tayini farklı yöntemlerle yapılmıştır [4]. Bunlar arasında gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) en yaygın yöntemlerden biridir. Ancak tek başına GC, MS olmaksızın fenitoinin serbest fraksiyonunu ve düşük biyolojik fenitoin konsantrasyonlarını ölçmek için gereken duyarlılığa ulaşamamaktadır [4]. Klinik deneyler için yetkililer tarafından onaylanmış bir yöntem gereklidir [5]. GC-MS, fenitoin ve metabolitlerini ayrı ayrı analiz etmek için etkili ve spesifik bir yöntemdir [6]. Hosli ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada GC-MS analizi için numuneyi temizlemek ve GC-MS sistemine enjeksiyondan önce proteinler ve lipitler gibi biyolojik matriksi ortadan kaldırmak için katı faz ekstraksiyonu (KFE) gibi bir ekstraksiyon yöntemine ihtiyaç duyulmuştur [4]. Diğer çalışmada ise kullanımı yaygın olan diğer bir antiepileptik ilaç için eş zamanlı türevlendirme ve dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (DSSME) takiben GC-MS/MS analizine dayalı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde, numune hazırlama genellikle ya sıvı-sıvı ekstraksiyon (SSE) ya KFE ile yapılmıştır [7]- [9]. SSE ve KFE büyük miktarda toksik çözücü gerektirdikleri ve zahmetli oldukları için bu ekstraksiyon yöntemlerinin mikroekstraksiyon yöntemleri değiştirilmesi hedeflenmiştir.

Bu tez kapsamında evsel atık su ve yapay idrar örneklerinde bulunan eser seviyelerdeki fenitoinin ekstraksiyonu için metal elek bağlantılı çift şırınga-sıvı faz mikroekstraksiyon (MEBÇŞ-SFME) yöntemi kullanılmıştır. Ekstraksiyon sonrası GC-MS sisteminde fenitoinin kromatografik ayrımı ve tayini gerçekleştirilmiştir.

1.1 Tezin Amacı

Bu tezdeki temel amaç, eser seviyelerde bulunan fenitoin analitini GC-MS sisteminde duyarlı, doğru ve tekrarlanabilirliği yüksek bir şekilde tayini amacıyla yeni bir analitik yöntem geliştirmektir.

Eser seviyelerde bulunan analitlerin tayini için GC-MS sistemi yeterli duyarlılığa sahip değildir. Analiz öncesi zenginleştirilme (önderiştirme) yapılması bu analitlerin bu sistemde tayin edilebilir hale gelmesi açısından önemlidir. Zenginleştirme yöntemi olarak kullanılan dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DSSME) yönteminde dağıtıcı çözücü kullanılmaktadır. Ancak bu tez kapsamında MEBÇŞ-SFME yöntemi kullanılmıştır ve bu yöntem sayesinde daha çevreci bir yaklaşım benimsenerek dağıtıcı çözücü ihtiyacı ortadan kaldırılmıştır. İlk olarak MEBÇŞ-SFME-GC-MS sistemi için optimum koşullar belirlenmiştir. Optimum şartlar altında geliştirilen yöntemin sistem analitik performans çalışmaları yapılmıştır. Geliştirilen analitik yöntemin gerçek örneklerle uygulanabilirliği ve yöntemin doğruluğu geri kazanım çalışmaları ile kanıtlanmıştır. Geri kazanım çalışmaları matriks eşleştirme kalibrasyon tekniği ile gerçekleştirilmiştir.

Bu tez kapsamında fenitoin ve fenasemid ilaç etken maddelerinin GC-MS sistemine uygun türevlendirme reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi de diğer bir amaçtır.

1.2 Hipotez

İlaç etken maddelerinin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı eser miktarlarda tayin edilebilmesi oldukça önemlidir. Bu bağlamda epilepsi hastalığının tedavisinde kullanılan fenasemid ve fenitoin molekülleri üzerinde çalışılmıştır. Böylece bu kimyasal maddelerin insan vücudundaki etkilerinin araştırılması ve toplum sağlığına etkilerini araştıran bilim insanları için yol gösterici analitik yöntemler geliştirilmiştir.

Tezin öncelikli amacı bu iki ilaç etken maddesinin GC-MS sistemine uygun türevlendirme reaksiyonlarının geliştirilerek GC-MS sisteminde tayinidir.

GC-MS sistemi eser miktardaki analitlerin tayini için yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle zenginleştirme işlemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. DSSME yöntemi kolay ve hızlı olması açısından tercih edilen bir yöntem olmasına karşın dağıtıcı çözücü gerektirmesi

bu yöntemin çevreye olan zararlı etkisini arttırmaktadır. Bu nedenle bu tez kapsamında bir dağıtıcı çözücüye olan ihtiyacı ortadan kaldıran MEBÇŞ-SFME sisteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilen sistem fenitoinin eser seviyelerde evsel atık su ve yapay idrar örneklerinden zenginleştirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Zenginleştirilen örneklerin analizi GC-MS sisteminde gerçekleştirilmiştir.



2.1 Antiepileptik İlaçlar Hakkında Genel Bilgi

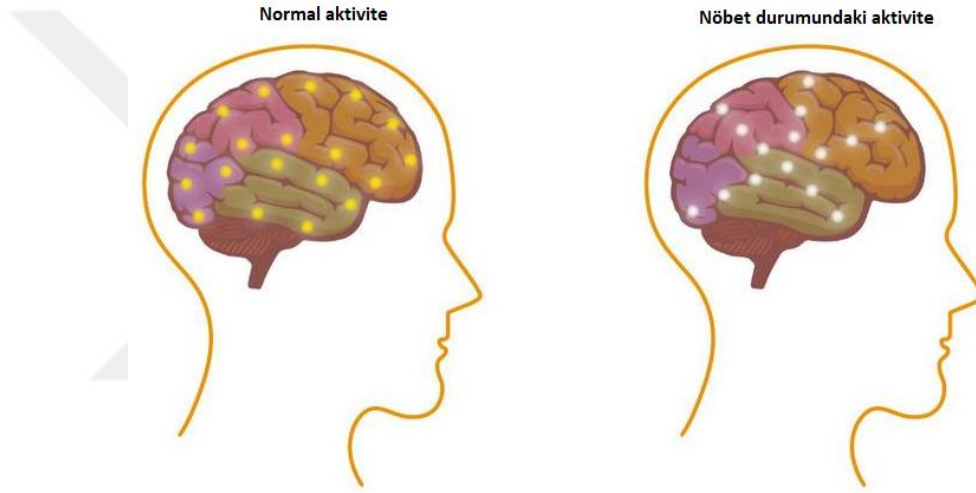
İlaç, tüketildiğine organizmanın fizyolojisinde veya psikolojisinde değişikliğe neden olan kimyasal maddedir. Bir hastalığı tedavi etmek, önlemek, teşhis etmek ya da sağlığı geliştirmek için kullanılmaktadır. İlaçlar tipik olarak gıda ve besin desteği sağlayan maddelerden ayırt edilirler. İlaçların tüketimi, inhalasyon, enjeksiyon, yutma, cilt üzerinden emilim, fitil veya dil altında eritme yoluyla olabilmektedir [10].

İlacın verilme yolu, şekli, hastanın vücut ağırlığı, cinsiyeti, yaşı, genetik özellikleri gibi etmenler ilacın etki edişinde önemli rol oynar. Geleneksel olarak ilaçlar, daha önceleri şifalı bitkilerden ekstraksiyon yoluyla elde edilmekte olup, daha yakın zamanda organik sentez yoluyla da elde edilmeye başlanmıştır [11].

İlaç keşfi ve geliştirmesi köklü bir geçmişe sahiptir. Eski zamanlarda ilaçlar sadece fiziksel tedaviler için kullanılmamış, aynı zamanda dini ve ruhsal şifa ile de ilişkilendirilmiştir. İlaçların keşfi ve geliştirmesi 1800'lerin sonlarında bilimsel tekniklerin gelişmesiyle başlamış olup o zamandan beri, ilaç ürünlerinin doğal kaynaklardan, nispeten küçük parti miktarlarında ekstraksiyonunun aksine, büyük ölçekli üretim tesislerinde giderek daha fazla ilaç keşfedilip test edilmiş ve sentezlenmiştir. Birinci Dünya Savaşı'ndan sonra, modern ilaç endüstrisi ortaya çıkmış ve bilimsel ilkeleri takip eden ilaç endüstrisi sağlam bir şekilde kurulmuştur. 1900'lü yılların başında kimyasal yöntemler kullanılarak sentetik ilaçlar ortaya çıkmış ve ilaç endüstrisi gelişmiştir. Birçok ilaç araştırılıp üretilmiştir, ancak çoğunlukla hastalıkları tamamen iyileştirmek yerine tedavi amaçlı kullanılmıştır. 1930'ların başından itibaren ilaç keşfi, doğal ürünleri taramaya ve hastalıkları tedavi etmek için aktif bileşenleri izole etmeye odaklanmıştır. Aktif bileşenler normalde doğal ürünlerin sentetik versiyonudur. 1970'lerin sonlarında, rekombinant DNA ürünlerinin geliştirilmesi, hücresel ve moleküler biyoloji bilgisi genişletilmiş ve biyoteknoloji endüstrisi için büyük adımlar atılmıştır. İlaç endüstrisi, gen terapisindeki ilerlemeler ve hastalıkların nedenlerinin mekanizmalarının anlaşılması ve İnsan Genomu Projesi'nin araştırma sonuçlarıyla

birlikte, çok sayıda fırsat açmış ve özellikle hastalıkların olduğu bölgeleri hedefleyen ilaçların geliştirilmesini ve kullanılmasını mümkün kılmıştır [11].

Epilepsi hastalığı kortikal nöronların anormal ve aşırı deşarjından kaynaklanan ani, tekrarlayan, provoke edilmemiş epileptik nöbetlerle ilişkili bir durumdur. Uluslararası Epilepsi ile Mücadele Derneği Epidemiyoloji Komitesi'nin tavsiyelerine göre, metabolik, toksik, yapısal, enfeksiyöz ve inflamatuvar nedenlerle geçici olarak ortaya çıkan ve akut merkezi sinir sistemi hasarı ile yakından ilişkili nöbetler, akut semptomatik nöbetler veya koşullara bağlı olarak nöbetler gerçekleşebilmektedir [12]. Epilepsi hastalığının insan beynindeki etkisi şematik olarak Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

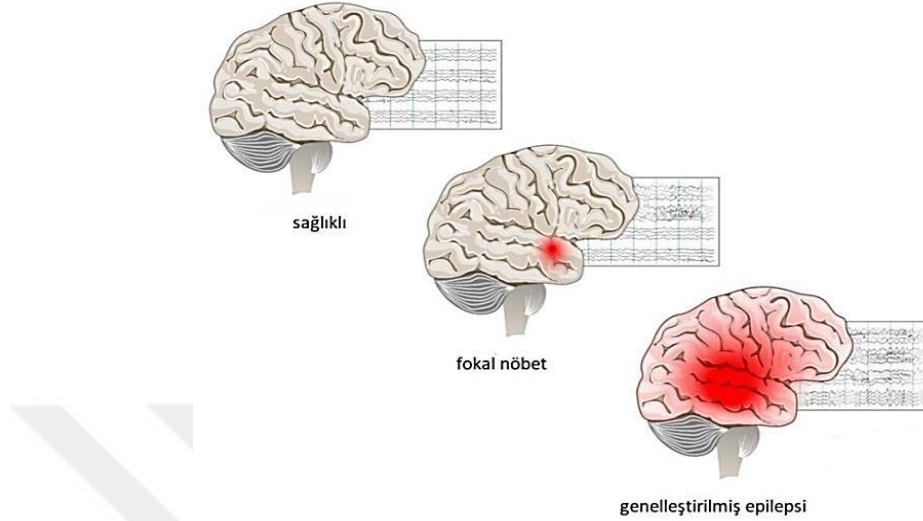


Şekil 2.1 Epilepsi hastalığının insan beynindeki etkisi [13]

Klinik ve epidemiyolojik olarak epilepsi hastaları 24 saatten fazla süreli aralıklarla iki veya daha fazla provoke edilmemiş refleks nöbeti olan, takip eden on yıl içinde %60'dan fazla nöbet geçirme ihtimali olan provoke edilmemiş refleks nöbeti olan veya belirlenmiş bir epilepsi sendromu bağlamında bir veya daha fazla nöbeti olan hastalar olarak tanımlanmaktadırlar [14], [15].

İnsanların yaklaşık %10' unun yaşamları boyunca bir epilepsi nöbetine maruz kaldıkları bilinmektedir [16]. Epilepsi, nörolojik bozukluklar için küresel hastalık yüküne en çok katkıda bulunan üçüncü hastalıktır ve dünya çapında yaklaşık 65 milyon insanı etkilemektedir [17], [18]. Epilepsi yatkınlığının en yüksek olduğu iki dönem, yaşamın ilk yılı ve 60 yaşından sonrasındır. Epilepsi çocuk ve ergenlerde en sık görülen nörolojik

hastalık olup, erişkinlerde serebrovasküler hastalıktan sonra en sık görülen ikinci nörolojik hastalıktır [19]. Sağlıklı ve epileptik nöbet esnasında beynin durumunun şematik olarak gösterimi Şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.2 Sağlıklı ve epileptik nöbet esnasında beynin şematik gösterimi [20]

Epilepsi tanısı alan bir kişide antiepileptik ilaç tedavisine başlanmasına karar verilirken nöbet tipinin, belirtilen epilepside nöbetlerin beklenen doğal seyrinin ve tekrarlama riskinin belirlenmesi esastır [21]. Epilepsi için birinci basamak tedavi anti-nöbet ilaçlarıdır ve bunların yirmiden fazlası Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı tarafından onaylanmıştır. Ancak, birçok antikonvülzanın mevcudiyetine rağmen, hastaların yaklaşık üçte biri nöbet kontrolünü sağlayamaz. Epilepsi cerrahisi, sadece az sayıda hasta ameliyat için uygun olsa da, bu hastaları nöbetsiz kılmak için en yüksek şansa sahiptir. İlaça dirençli epilepsili hastaların çoğu ameliyat için uygun değildir ve epilepsi ameliyatının nöbetleri kontrol edemediği kişiler için, nörostimülasyon cihazları, diyet tedavileri veya yeni antikonvülzanların klinik denemeleri alternatif seçeneklerdir [22].

Genel olarak, bir kişi nöbetsiz olduğunda ve yaşa bağlı bir epilepsi sendromu için geçerli yaştan daha büyük olduğunda veya alternatif olarak, kişi geçmişteki 5 yıl boyunca herhangi bir anti-nöbet ilacı almadan 10 yıldan fazla bir süre boyunca nöbet geçirmediğinde epilepsinin iyileşmiş olduğu kabul edilir. Epilepsi, nöbetlerin doğrudan etkileri (örneğin epilepside status epileptikus, ani beklenmedik ölüm, boğulma,

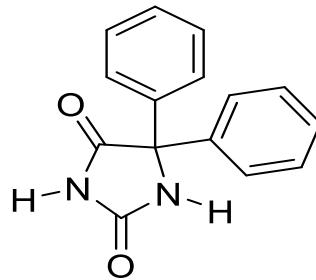
düşmeler, yanıklar, motorlu taşıt kazaları) veya dolaylı etkileri (örneğin aspirasyon pnömonisi, intihar ve yan etkiler) nedeniyle ölümcül olabilir [23].

İyi bir antikonvülzandan beklenen özellikler oral biyoyararlanımının iyi olması, yan etkisinin olmaması, ilaç etkileşimlerinin olmaması, basit lineer kinetiğe sahip olması, proteinlere az bağlanması veya hiç bağlanmaması, günde bir veya en fazla iki kere kullanılabilmesi, ilacı metabolize eden sistemleri etkilememesi ve ucuz olmasıdır [19].

2.2 Fenitoin (5,5-Difenilhidantoin)

Fenitoin, yaklaşık seksen yıldır klinik değerlendirme altında olan bir nöbet önleyici ilaçtır. Kısmi nöbetlerin iyileştirmesi amacıyla kullanımı mevcuttur [24]. Fenitoin, mide ortamında çöken zayıf bir asit olup çökeltilinin boyutu, yavaş ve değişken olan bağırsak absorpsiyonunun hızını ve derecesini belirler [25]. Terapötik dozlarda, fenitoin genellikle oral alımdan sonra tamamen emilir ve 1,5-3,0 saat içinde en yüksek serum konsantrasyonlarına ulaşır. Uzun salımlı preparatlar, 4,0 ila 12 saatte pik seviyeleri üretmek için absorpsiyon oranını azaltır [26]. Fenitoin maddesinin yararı fenobarbitale ait sedasyondan uzaklaşmaya çalışılırken, nöbet kontrolü amacıyla kullanımının mümkün olduğunun fark edilmesiyle açığa çıkarılmıştır [27]. Bununla birlikte ülserin çeşitli versiyonlarının tedavisini kontrol etmek amacıyla da kullanılabileceği belirlenmiştir [28]. Fenitoin ilaç etken maddesinin multipl sklerozun tedavisinde bir nörokoruyucu rolü oynayabileceği araştırma konusu olmuştur [29].

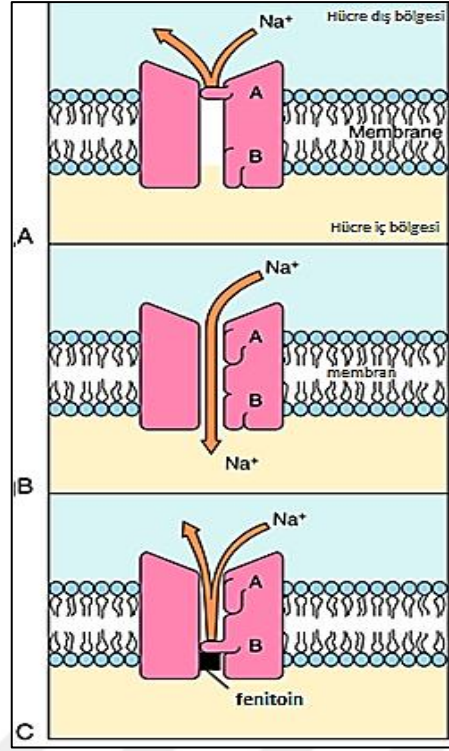
Fenitoinin genel adı 5,5-difenilhidantoin'dir. Kimyasal adı 5,5-difenil-2,4-imidazolin'dir. Moleküler formülü $C_{15}H_{12}N_2O_2$ ve mol kütlesi 252,26 g/mol olup pKa değeri yaklaşık olarak 8,1-9,2 arasında hesaplanmıştır. Erime noktası 295-298 °C'dir. Alkol ile kristallendirildiğinde iğne şeklinde beyaz kristaller meydana gelmektedir [30]. Fenitoin molekülünün yapısı Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Fenitoin molekülü

Fenitoin bir hidantoin türevidir ve suda az çözünür (32 mg/L) [31]. Ayrıca fenitoin, alkali hidroksitler, alkol, aseton ve asetik asit içinde de çözünür. Fenitoin ışıktan etkilenmekte ve çözeltileri ışık ile sararabilmektedir [32]. Fenitoine ait bir koku veya tat bulunmamaktadır [33]. Vücuttaki metabolizasyonunun hidroksilasyon şeklinde karaciğerde gerçekleştiği bilinmektedir. Bu ilacın dozlarındaki minimal değişiklikler plazma konsantrasyonunda büyük oranda artış ve toksik etki gösterebilmektedir [34]. Aromatik bir antikonvülsan olan fenitoinin hücresel etkileri ise iyon kanalları, genel membran stabilizasyonu ve aktif nakil üzerindeki etkilerdir. Birçok hastalığın tedavisinde önerilmiştir ancak fenitoinin diğer ilaçlarla etkileşimi ve yan etkilerinin çokluğu sebebiyle kullanımı sınırlı kalmıştır [35]. Fenitoinin en etkili olduğu durumu, nöronal refrakter periyodu uzatmak için Na^+ kanalına inaktif haldeyken bağlanmasıdır [36]. Buna ek olarak, fenitoin maddesinin beyindeki hücre zarı fonksiyonlarının stabilizasyonunu sağladığı, beyinde serotonin (5-HT) ile GABA seviyesinin artımını sağlayarak epilepsinin tedavisine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Böylelikle istenmeyen iyon akışlarının yayılımı engellenmekte ve epileptik durumlar önlenabilmektedir [36].

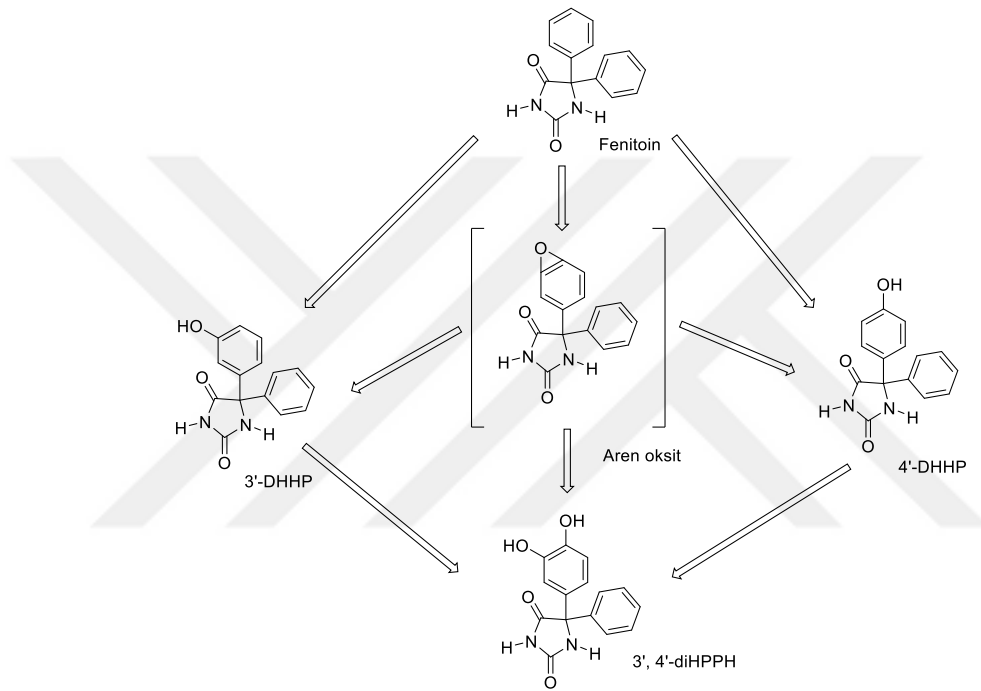
Nörofarmakolojik olarak fenitoin maddesinin nasıl bir etkiye sahip olduğu uzun yıllardır incelenmektedir [36]. Fenitoinin sodyum kanallarının açılımını engelleyerek etki ettiği bilinmektedir [37]. Sodyum kanallarını deaktive ederek bu durumu stabil kılmakta ve aktif olunmayan periyodun uzamasına katkıda bulunmaktadır [36], [38]-[39]. Fenitoinin bu etkisi ile birlikte insanda bulunan farklı sistemler biyoelektriksel aktiviteler bakımından düzenlenmektedir. Fenitoinin olağan devam eden biyoelektriğin üretim ve iletimi aksatmadan, ilgili hücrelerdeki olağan dışı elektrik aktivitesinin inhibisyonunu sağladığı ya da tamamen sönümlendiği bilinmektedir. Elektrofizyoloji temelinde bu durum, sodyum, potasyum ve kalsiyum iyonlarının membranlararası geçiş hareketi ve hücrenin iç düzenlenmesiyle açıklanmaktadır [36], [40]. Fenitoinin Na^+ kanalı üzerindeki etkisi şematik olarak Şekil 2.4’de gösterilmiştir. A durumu Na^+ kanalı aktivasyon kapısının kapalı olduğu dinlenme durumudur. B durumunda, bir potansiyelinin geldiği ve depolarizasyon oluşturarak aktivasyon kapısının açılmasına neden olup Na^+ iyonlarının hücre içine aktığı durumdur. C ise, depolarizasyon devam ettiğinde, bir inaktivasyon kapısının (B) devreye girdiği durumdur. Fenitoin, B’nin yeniden açılmasını önleyerek Na^+ kanalının inaktivasyon durumunu uzatmaktadır [40].



Şekil 2.4 Fenitoinin Na^+ kanalı üzerindeki etkisi [40]

Buna ek olarak fenitoinin endokrin bezi hücrelerindeki hormon salgılanmasını düzenlediği, karaciğerdeki ilaç-enzim sistem metabolizmasını uyardığı ve yoğun miktardaki lipoprotein konsantrasyonunun artmasına katkıda bulunması sebebiyle dokuda granülasyon ile kılcal oluşma hızını yükselttiği bilinmektedir [36], [41]. Fenitoin, asetilkolin, serotonin, norepinefrin, dopamin, GABA ve endorfinleri içeren bir dizi nörotransmitteri düzenlemektedir [42], [43]. Fenitoinin ağızdan alınmasının akabinde iyi emildiği bilinmektedir [44]. Emilimi ağırlıklı olarak onikiparmak bağırsağında gerçekleşmektedir. Fenitoinin bağırsakta çözünme hızı, emilim oranıyla ilişkilidir. İlacın dağılımı vücutta yaygındır (dağılım hacmi 0,8 L/kg). Fenitoin kan-beyin bariyerini kolayca geçmekte ve plazma albüminine geniş ölçüde (yaklaşık %90) bağlanmaktadır [45]. Fenitoin plasentaya kolayca geçebilmektedir [46]. Çalışmalarda benzer plazma fenitoin konsantrasyonları anne ve göbek kordonunda ölçülmüştür [47]. Buna ek olarak epilepsi hastalığına sahip annelerin sütünde düşük seviyelerde bulunmaktadır [46]. Fenitoin, sitokrom P450 enzimi tarafından 5-(p-hidroksifenil)-5-fenilhidantoine (4'-HPPH) metabolize edilir. Bir katekol oluşturmak üzere metabolize edilmesi mümkündür ve bu, kinon ve semikinon türlerine oksitlenebilir [47], [48].

Fenitoin doğrusal olmayan eliminasyon farmakokinetiği göstermektedir. Bu doğrusal olmamanın bir sonucu olarak, eliminasyon yarı ömrü plazma konsantrasyonu ile de farklılık göstermektedir. Fenitoinin eliminasyonundaki doğrusal olmamanın nedeni, metaboliti indükleyen enzimlerin doygunluğudur [49]. Şekil 2.5'de gösterildiği üzere, birincil metabolitler 5-(3' hidroksifenil)-5-fenilhidantoin (3'-HPPH), 4'-HPPH, 5-(3', 4'-dihidroksifenil)-5 fenilhidantoin (3', 4'-diHPPH)'dir. Ayrıca, hiçbir zaman izole edilememiş olan arenoksit, oldukça reaktif ve son derece kararsız bir varsayımsal metabolittir [49].



Şekil 2.5 Önerilen fenitoin mekanizması yolu [50]

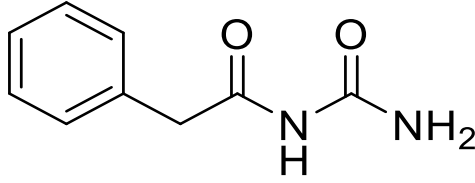
Fenitoin alımından sonra sıklıkla görülen yan etkiler mevcuttur. Bunlar arasında uyuşukluk, yorgunluk, bedensel hareketlerin kontrolünün kaybı ve denge veya koordinasyon kaybı, sinirlilik sayılabilmektedir [51]- [54]. Huzursuzluk ve istemsiz göz hareketleri dâhil olmak üzere çeşitli istemsiz işlevleri de yan etkileri arasındadır [55], [57]. Tipik olarak, reaksiyonlar zayıf koordinasyon, saç büyümesinde artış, mide ağrıları, iştahsızlık, mide bulantısı ve diş eti büyümesini içermektedir [58], [59]. Potansiyel olarak daha ciddi yan etkiler arasında karaciğer problemleri, kemik iliği baskılanması ve toksik epidermal nekroliz bulunmaktadır [60]- [63].

Bunun yanı sıra psikiyatrik rahatsızlıklar ya da davranış bozuklukları kullanım sonrası ortaya çıkabilecek durumlardandır. B12 vitamini ya da folik asit eksikliği halinde bu bozuklukların görülme ihtimali artmaktadır. Geçmiş yıllarda vitaminsizlik kaynaklı ender rastlanan bir zehirlenme vakası bildirilmiştir [64]. Ancak fenitoin dışında antiepileptik ilaç kullanan hastalarda psikolojik ve davranışsal yan etkilerin daha sık görüldüğü de bilinmektedir [65].

Fenitoinin terapötik aralığı dardır ve birçok hasta için 80 µM'den fazla toplam serum konsantrasyonu klinik olarak ilgili toksisite ile bağlantılıdır [66]. Fenitoinin metabolizasyonu karaciğerdeki enzimlerle gerçekleştirilmekte olup, ardından böbrekler ile vücuttan atılımı sağlanmaktadır. Bununla birlikte, toksik fenitoin birikimi kendini böbrek yetmezliği olan kişilerde göstermektedir [67]. Hemodiyaliz, %90 albümine bağlı olduğu için fenitoini ortadan kaldırmamaktadır [68]. Fenitoin zehirlenmesi hayati risk teşkil etmese dahi koma, yürüme, konuşma gibi temel hayati fonksiyonlarda kayba neden olabilmektedir [69]. Fenitoina bağlı zehirlenmelerin temel sebeplerinden bazıları uygun doz kullanmama, ilacın diğer bir ilaçla etkileşime girmesi ya da hastada meydana gelen fizyolojik değişikliklerdir [70], [71]. Zehirlenme durumunda öncelikli olarak ortaya çıkan temel emareler mide bulantısı, sinir sistemine ait bozukluklar, depresyon ve komadır [72]. Fenitoinin toksisite seviyesi ortalama bir düzeydedir [73]. Tek başına fenitoin zehirlenmesinin hasta ölümüyle sonuçlanma olasılığının çok düşük olduğu bilinmektedir. Laboratuvar hayvanlarda yapılan deneyler neticesinde fenitoinin kansere sebep olduğuna dair herhangi bir kanıt bulunamamıştır [74]- [76].

2.3 Fenasemid (N-karbamoil-2-fenilasetamid)

Fenasemid, N-karbamoil-2-fenilasetamid, $C_9H_{10}N_2O_2$ kimyasal formülüne sahip, 178,19 g/mol ağırlığında, epilepsi tedavisinde belirli nöbetleri kontrol etmek için kullanılan bir ilaç etken maddesidir [77]. Fenasemid, nöronal sodyum kanallarına veya voltaja duyarlı kalsiyum kanallarına bağlanmakta ve onları bloke etmektedir [78]. Fenasemid, 1948'de Spielman ve arkadaşları tarafından sentezlenmiş, Everett ve Swinyard tarafından antikonvülzan aktivite için incelenmiş ve ilk olarak 1949'da klinik olarak rapor edilmiştir [79]. Fenasemid molekül yapısı Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Fenacetil molekülü

2.4 Kromatografi

Kromatografi yönteminin ilk olarak 20. yüzyılın başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından kullanıldığı bilinmektedir. Klorofil ve ksantofili de içeren çeşitli pigment örneklerinin bulunduğu çözeltinin ayrımı Tswett tarafından kromatografi denilen yöntem sayesinde gerçekleştirilmiştir. Bu deney neticesinde ayrımı gözlenen her madde için ayrı renkte bir faz oluşmuş ve bunun sonucunda kullanılan yöntemle renkli fotoğraf manasına gelen “kromatografi” denilmiştir [80].

Kromatografi, bir yüzey üzerine uygulanan karışım halindeki moleküllerin, durağan fazın (sabit faz) hareketli bir faz yardımıyla hareket ederken birbirinden ayrılması esasına dayanmaktadır. Karışım içinde karışık halde bulunan maddeler, sabit ve hareketli fazla olan etkileşimleri sonucunda daha ilgili oldukları faza doğru değişik hızlarda harekete geçmektedirler [81]- [84]. Kromatografi türlerinin sınıflandırılması Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1 Kromatografi türlerinin sınıflandırılması [85]

Kromatografi Türleri	
Ayırma mekanizmasına göre	Adsorpsiyon Kromatografisi
	Dağılma (Partisyon) Kromatografisi
	İyon Kromatografisi
	Jel Geçirgenlik ve Jel Süzme Kromatografisi
	Afinite Kromatografisi
	Kiral Kromatografisi

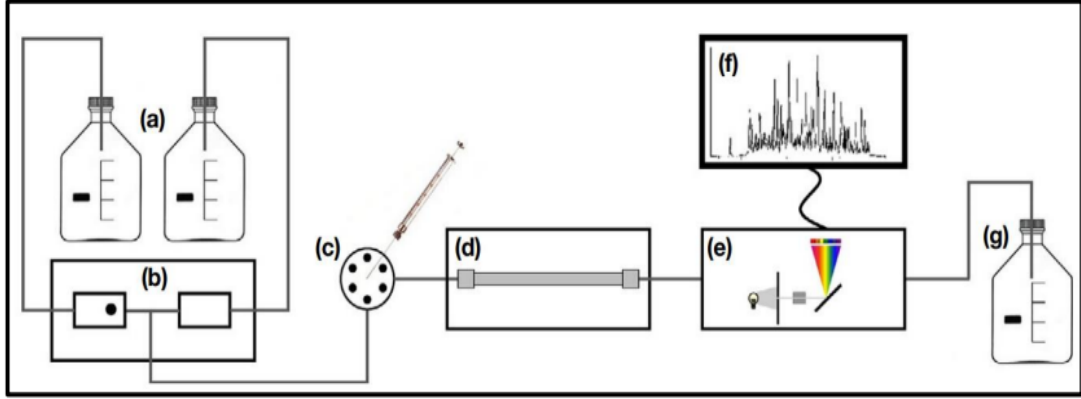
Tablo 2.1 Kromatografi türlerinin sınıflandırılması [85] (devamı)

Uygulanan Tekniğe Göre	Düzlem Kromatografisi
	Kolon Kromatografisi
Kullanım Amacına Göre	Analitik Kromatografi
	Preparatif Uygulamalar
Hareketli Faza Göre	Sıvı Kromatografisi
	Gaz Kromatografisi

2.5 Sıvı Kromatografi

Sıvı kromatografi ilk olarak bitki pigmentlerinin ayrılması için uygulanmış olup durağan faz olarak kalsiyum karbonat adsorbanı, hareketli faz olarak ise petrol eteri ve etanol kullanılmıştır [86]. Günümüzde sıvı kromatografinin geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Bu alanlardan bazıları gıda, farmasötik ve klinik alanlardır. Sıvı kromatografinin en yaygın kullanımı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'dir [87].

Analitler, kullanılan durağan fazın tipine göre ayrılmaktadır. Silika gibi polar özelliğe sahip bir sabit faz seçildiğinde, analitler dipol-dipol ve hidrojen bağı etkileşimleri ile birbirinden ayrılmaktadır. Hareketli faz, hekzan, diklorometan (DCM) ve kloroform (CHL) gibi polar olmayan çözücülerden seçilmektedir. Bu kromatografik moda normal faz sıvı kromatografisi olarak denilmektedir. Diğer bir mod ise ters fazlı sıvı kromatografisidir ve apolar sabit fazlar ile polar hareketli fazdan oluşmaktadır. Apolar sabit faz ve analitler arasındaki etkileşim esas olarak spesifik olmayan hidrofobik etkileşimlerdir [87]. HPLC sisteminin şematik gösterimi Şekil 2.7'de gösterilmiştir.

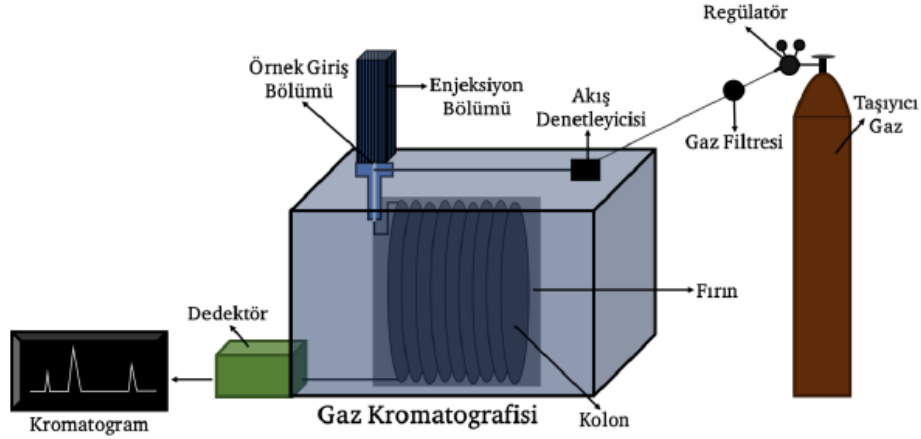


Şekil 2.7 HPLC sistemi için şematik diyagram a) Çözücü tankları; b) pompa; c) örnek enjeksiyon kısmı; d) kolon; e) dedektör; f) veri işleme; g) atık [87]

HPLC sistemlerinde analitler, sabit faz ile girdiği etkileşime bağlı olarak kolonda ayrılmaktadır. Daha fazla etkileşim analitin geç elüe olmasına sebep olurken, daha az etkileşim hızlı bir elüsyonla sonuçlanmaktadır. Organik çözücüler ve tampon çözeltiler gibi farklı elüentler hareketli faz olarak kullanılmaktadır [87]. MS, floresan, UV gibi birçok dedektör HPLC sistemlerine entegre edilebilmektedir [88].

2.6 Gaz Kromatografi

Gaz kromatografisi (GC) mobil gaz fazı ile sıvı veya katı durağan faz arasındaki dağılım sayesinde buharlaşan numune bileşenlerinin ayrılması esasına dayanmaktadır. 1952'de uçucu yağ asitlerinin gaz-sıvı partiyon kromatografisi kullanılarak ayrılması üzerine çalışmaları bulunan Martin ve James tarafından icat edilmiştir [89]. GC'nin temelinde analizi yapılmak istenen örneğin gaz fazına dönüştürülmesiyle birlikte fırın içerisindeki kolona iletilmesi bulunmaktadır. Bu aşamada hareketli faz olarak örnekle etkileşime girmeyecek inert bir gaz kullanılmaktadır. Hareketli faz sayesinde örnek içinde bulunan farklı kaynama noktasına sahip bileşenlerin ayrımı ve tayini yapılabilmektedir [90]. Gaz kromatografisi sistemi şematik olarak Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8 Gaz kromatografisi [91], [92]

Gaz sıvı kromatografisi ve gaz katı kromatografisi olmak üzere iki türü mevcut olup gaz-katı kromatografinin yaygın kullanımı bulunmamaktadır. GC esas olarak uçucu ve yarı uçucu bileşiklerin ayrılması, tanımlanması ve nicel tayini için kullanılmaktadır. Hem organik hem de inorganik maddelerin tayinleri gerçekleştirilebilmektedir. Numune bileşenleri, gaz ile taşınmakta ve uygun bir dedektör tarafından bir sinyale dönüştürülmektedir. Analitler, numune ile aynı koşullar altında analiz edilen saf standartlarıyla eşleştirildikten sonra alıkonma süreleri açısından tanımlanabilmektedir. GC sistemi, taşıyıcı gaz, akış denetleyicisi, enjeksiyon bölümü, kolon, fırın, dedektör ve veri işlemci parçalarından oluşmaktadır [93].

2.6.1 Ayırma İşlemi

Ayırma işlemi sırasında analiz edilmek istenen numunedan enjeksiyon sistemi ile az miktarda alınmakta ve daha sonra kendisiyle etkileşime geçmeyecek inert bir gaz ile birlikte ayırmanın gerçekleşeceği kolon içerisine iletilmektedir. İnert gaz akışı işlem süresi boyunca kesintisiz bir şekilde devam ettirilmektedir. Ayırma işleminde kolon uzunluğu ve yarıçapı gibi etmenler oldukça önemlidir. Günümüzde kullanımı olan kolonlar genellikle 1,50-150 m uzunlukları arasındadır. Kolonda örnek içerisindeki bileşenlerin ayrımı sağlanırken, işlem sonucunda cihaz tarafından bu bileşenlerin kolonda geçirdiği süreye karşılık gelen ve sinyal şiddetiyle ifade edilen grafikler çizilmektedir. İşlem sırasında alınan verilerin işlenmesi sonucu üretilen pik şeklindeki sinyallere kromatogram denilmektedir [94]- [96].

2.6.2 Taşıyıcı Gaz

Analiz yapılacak numune, sisteme enjekte edilerek kolona ulaştırılmaktadır. Kolon içerisinde ise taşıyıcı gaz ile birlikte kolonda ilerlemesi gerçekleştirilmektedir. Kullanılan hareketli fazın en önemli özelliği kolon içerisindeki sabit faz ve numunede bulunan maddelerle bir etkileşimde bulunmayacak inert bir gaz olmasıdır. Bu özellikleri barındıran gazlardan bazıları He, Ar, N₂, H₂ ve CO₂'dir. Taşıyıcı gaz seçiminde kullanılan dedektörün türü belirleyici olmaktadır [94], [97]- [98].

2.6.3 Kolon

Gaz kromatografisinde iki tip kolon kullanılmakta olup bunlar dolgulu ve kapiler kolondur. Cihazdaki fırın kısmının sıcaklığı sürekli olarak kontrol edilmekte ve kolon da bu bölümde bulunmaktadır. Çoğunlukla cam, teflon, bakır, paslanmaz çelik veya alüminyum gibi malzemeler kolon yapımında kullanılmaktadır. Kolonların doldurulması için hareketsiz bir sıvı faz ile birlikte inert bir katı malzemeden faydalanılmaktadır [94], [97].

2.6.4 Gaz Kromatografisinde Kullanılan Dedektörler

Cihaza gönderilen numunenin duyarlı ve seri bir şekilde algılanabilmesi için kullanılan parçaya dedektör denilmektedir. Maddenin dedektörden geçerek bir sinyal oluşturmaları en fazla bir saniye sürmektedir. Bu sebepten dolayı dedektörün algılama gücünün yüksek olması en çok istenen özelliklerdendir. Alev iyonizasyon dedektörü, elektron yakalama dedektörü, termal iletkenlik dedektörü, atomik emisyon dedektörü, fotoiyonizasyon dedektörü ve kütle spektrometresi güncel olarak sıklıkla kullanılan dedektörlerdendir [96], [98], [99].

2.6.4.1 Alev İyonlaşma Dedektörü

Karbon içeren organik bileşiklerin alev ile yakılarak iyonize edilmesi temeline dayanmaktadır. Alevde bulunan iyon, miktarıyla doğru orantılı bir akım oluşturmaktadır. Oluşan akımdaki değişim ölçülmektedir [100].

2.6.4.2 Elektron Yakalama Dedektörü

Elektron yakalama dedektörü ile enerjisi düşük olan beta ışınlarının ürettiği elektronlar kolondan çıkan numuneye çarpıştırılmaktadır. Böylelikle taşıyıcı gazın iyonlaşması sağlanmış olup bunun sonucunda da sabit bir akım değeri elde edilmektedir. Elektronlar

dedektöre bir madde ulaştığı anda yakalanarak sistemin akımının düşmesine sebebiyet verirler. Akımdaki azalışın sonucunda sistemde sinyal meydana gelmekte ve böylelikle analit karşısında bir yanıt oluşturulabilmektedir [100].

2.6.4.3 Termal İletkenlik Dedektörü

Bu dedektörün çalışma ilkesi mobil fazın ısı iletkenliğinin, numune varlığında değişiminin ölçümüne dayanmaktadır. Numune konsantrasyonunun artması ya da azalması iletkenlikteki değişimi doğrudan etkilemektedir. Kaynağa verilen elektrik sabit olup ısı da sabit tutulmaktadır. Dedektörün algıladığı analitin gaz formunda olması durumunda ısı iletkenlik değişmektedir. Kullanımı yaygın olduğu halde dedektör hassasiyeti istenilen seviyede değildir [100].

2.6.4.4 Kütle Spektrometresi (MS)

Kütle Spektrometresi (MS), GC ile beraber oldukça geniş bir kullanımı olan bir yöntem olup bu dedektör ile analizi yapılacak numunelerin ayrımı yapılmaktadır. Aynı zamanda m/z oranlarının belirlenerek bileşenlerin tanımlanabilmesi işlevini görmektedir. Kolonun çıkışında bulunan maddeler doğrudan MS'ye iletilmekte ve değişik tekniklerin kullanılması sonucu molekül farklı bölgelerinden parçalanmaktadır. Bu tekniklerden sıklıkla kullanılan elektron bombardımanı yapılması ve bunun sonucunda elektron kaybıyla birlikte moleküler iyonlaşmanın gerçekleşmesidir. Meydana gelen iyonların kütle analizörüne ulaşması sağlanarak bu aşamada m/z oranına göre ayırma gerçekleşmektedir. Kuadrapol kütle analizörleri kütlelerin ayrımını sağlarken, ayrılanların ölçülmesi elektron çoğaltıcı dedektörler ile mümkün kılınmaktadır. Ayrımı gerçekleştirilen analitlerin tayini dedektörler ile sağlanmaktadır [94], [98], [101].

2.7 Gaz Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi (GC-MS)

GC sistemi karmaşık matrikslerde mevcut olan numuneleri saptamak için spektroskopi ya da elektrokimya yöntemleriyle birlikte kullanılmaktadır. Nicel ve nitel analizlerin yapılabilmesi için sıklıkla kullanılan yöntemlerden birisi de kolon ile bağlantısı bulunan dedektörlerdir [94], [101]. Bu sistemde kullanılan fırının sıcaklığı 450°C'lere kadar çıkabilir. Ayırma işleminin meydana geldiği kapiler kolonlar mevcuttur. Analizi yapılacak maddelerin moleküler olarak ısıya dayanıklı ve uçuculuğunun yüksek olması GC'de tayin edilebilmesi için önemli olan hususlardır [95], [102]. GC kısmında ayrımı gerçekleştirilen analitler MS'de parçalarına ayrılarak iyonlaştırılması sağlanmaktadır.

Böylelikle m/z oranlarına bağı olarak ayırım sağlanmaktadır. Dedektörün ölçtüğü değer parçalanmış moleküllerin m/z oranlarıdır. Cihazda tanımlı olan kütüphaneye yapılan karşılaştırmayla birlikte nitel olarak analiz yapılabilmektedir [98]. Örnek bir GC-MS sistemi Şekil 2.9’da gösterilmiştir.



Şekil 2.9 GC-MS cihazı [103]

GC-MS’nin en önemli yararlarından biri sıvı kromatografisi ve diğer dedektörleri barındıran GC sistemlerinin aksine uçucu ve yarı uçuculuğa sahip maddelerin tayinine olanak vermesidir. Analiz süresinin düşük olması, sabit fazın karmaşık olmaması, karışık bir matristeki maddeleri kolaylıkla ayırt edebilmesi, duyarlılığın yüksekliği, element bileşimini tayin edebilmesi ve bu sayede moleküler yapıya dair somut veriler elde edebilmeyi sağlaması GC-MS’nin yararlarından bazılarıdır [104].

Tandem kütle spektrometresi bileşiklerin analizi için iki kütle spektrometresinin birleşimidir. İlk MS, iyon parçalarını m/z oranlarına göre ayırmaktadır, ardından bu bileşiğin parçalanmasıyla oluşan ana iyon iki MS arasında mevcut olan bir çarpışma bölümüne gönderilmektedir. Ana iyon, yine m/z oranlarına dayalı olarak ikinci MS’de ayrılan daha küçük iyonlara tamamen parçalanır. Böylelikle edinilen kütle spektrumuna ait veriler yalnızca ana iyonu yansıtır [105]. Spektrumda olması arzu edilmeyen iyonların yok edilmesi ve bileşiklere ait yapıların net olarak verilebilmesi sayesinde GC-MS/MS daha güvenilir spektrumlar sunar. MS/MS oldukça hassas ölçüm yapan bir dedektör çeşididir [106].

Numunenin nicel ve nitel olarak tayini için kromatografik ayırma ihtiyaç duyulmayan bir yöntem olup bu da bu sistemi çevre, adli tıp, gıda ve birçok alandaki kompleks matriksleri içeren örnekler için faydalı bir yöntem olarak ortaya çıkarmaktadır [106].

2.8 Ekstraksiyon

Ekstraksiyon, analitleri çeşitli karmaşık matrikslerden ayırmak ve daha düşük tayin limitlerine ulaşmak amacıyla analitleri önderiştirmek için kullanılan bir yöntemdir [107]. Ekstraksiyon yönteminin temel ilkesi, analitin, katı, sıvı, süperkritik akışkan veya gaz olabilen ayrı bir karışmaz faz (ekstraksiyon çözücüsü) kullanılarak örnek matriksinden alınması veya ayrılmasıdır. Bir analitin örnek matriksinden ekstraksiyon çözücüsüne kütle transferi, hem analitin hem de ekstraksiyon çözücüsünün özelliklerine ve örnek matriksinin belirli özelliklerine bağlıdır. Bu özelliklerden bazıları çözünürlük, yoğunluk, buhar basıncı, pH ve hidrofobisitedir [108]. Geleneksel yöntemler olan sıvı sıvı ekstraksiyon (SSE) ve katı faz ekstraksiyon (KFE), çevre ve insanlar için toksik olan organik çözücülerin yüksek miktarda kullanımını gerektirir. Yeşil analitik kimya daha önemli hâle geldikçe, organik çözücülerin kullanımının azaltılması ve analitik işlemlerin minyatürleştirilmesi önem kazanmaktadır [109]. Bundan dolayı, çözücüsüz ekstraksiyon yöntemleri geliştirmek için çeşitli mikroekstraksiyon yöntemleri literatüre sunulmuştur [110]. Analitin yüksek oranda geri kazanılabilmesi, organik çözücü kullanımının düşük seviyelerde olması, maliyetin yüksek olmaması ve kullanılan yöntemin kısa sürede uygulanabilmesi ekstraksiyon yöntemini seçme aşamasında göz önüne alınan faktörlerdendir [111], [112].

2.9 Katı Faz Ekstraksiyonu (KFE)

Farmasötik, biyolojik, çevresel ve gıda örnekleri analizi yapılabilecek karmaşık yapıya sahip örnek matriksine sahiptir [113]. Temel prensip olarak KFE’de organik ya da silikadan oluşan polimerik tutucu maddeler kolona doldurulmakta ve analit doldurulan faz üzerinden geçirilmektedir. Bu işlem sonrasında sıvı numune içerisinde bulunan arzu edilmeyen çeşitli maddelerden analitin ayrımının sağlanması ve son aşamada da katı fazda bulunan analitin ayrışması temeline dayanmaktadır [94], [114]. Adsorban ile numune arasında hidrofobisite, polarite veya iyonik niteliklerden kaynaklı etkileşimler mevcut olmasından ötürü adsorban tercihi oldukça önemlidir [115], [116]. Yüksek zenginleştirme faktörüne sahip olması, reaktif kullanımının düşük olmasıyla birlikte

adsorbanın yinelenerek kullanılabilmesi KFE yönteminin avantajlarından bazılarıdır [117], [118]. SSE yöntemine kıyasla çevresel su örneklerinde kullanılan ön arıtma işlemi için KFE oldukça popüler bir yöntemdir. Organik çözücü kullanımının ve maliyetinin düşük olması, yöntem süresinin uzun olmayışı ve buna rağmen geri kazanımının yüksekliği bu popüleritenin temel sebeplerindendir [119].

2.10 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon (SSE)

SSE, sulu örneklerde analit ekstraksiyonu amacıyla oldukça sık kullanımı olan bir teknik olup temel olarak numunelerin çözünürlüklerinin değişik çözücülerdeki farklılığına dayanmaktadır [112], [120]. Çoğunlukla su fazının yoğunluğu ya da ağırlığı baskın durumdadır. Kullanımı zor olmayan bu yöntem ile birlikte organik ve inorganik maddelerin ekstraksiyonu yapılabilmektedir. Yöntem dezavantajlarından bazıları organik çözücü gereksiniminin fazla oluşu, zenginleştirme faktörünün yüksek olmayışı ve fazların ayrımının zor oluşudur. Bunun yanı sıra bu tekniğin kan, atık su ve idrar numunelerine uygulanışı kolay olmamaktadır [117], [121], [122].

Yeşil kimya yöntemlerinin kullanımı çevreye zararlı kimyasal kullanımında azalmaya gidilebilmesi amacıyla günümüzde oldukça önem arz etmektedir. Bu amaçla toksisitesi düşük çözücülerin kullanıldığı yöntem arayışları başlamış ve bu özelliğe sahip mikroekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesi sağlanmıştır [123], [124].

2.11 Mikroekstraksiyon

Mikroekstraksiyon yöntemine olan yönelim Arthur ve Pawliszyn adlı araştırmacıların 1990 yılındaki katı faz mikroekstraksiyonu çalışmasıyla başlamış olup böylelikle bu konuda yapılan çalışmalarda artış görülmüştür. Diğer geleneksel ekstraksiyon işlemlerinde çoğunlukla tehlike arz eden toksik organik çözücüler kullanıldığından dolayı çevreye zararlı etkileri olmaktadır. Mikroekstraksiyon tekniklerinin çevreye duyarlı olmasının sebebi ise organik çözücülere minimum seviyelerde ihtiyaç duyulmasıdır [121].

Geleneksel ekstraksiyon tekniklerinin dezavantajlarından birkaçı şunlardır:

- Yeşil kimya ilkeleri tarafından önerilmeyen zehirli solventlerin kullanımının fazlalığı,
- Meydana gelen fazların ayrılmasının zor oluşu,

- Zenginleştirme faktörlerinin yüksek olmayışı,
- Yöntemin uygulanışının uzun zaman alması,
- Katı faz için gözenek tıkanması [123], [125]

Bu tür dezavantajlardan dolayı yeni mikroekstraksiyon yöntemlerinin geliştirilmesinin önü açılmıştır.

2.11.1 Katı Faz Mikroekstraksiyonu (KFME)

Uçuculuk özelliği gösteren maddelerin nitel ve nicel olarak tayin edilebilmesi için KFME yöntemi kullanılmaktadır [126]. 1990 yılında Arthur ve Pawliszyn'in KFME'yi keşfetmesinin ardından tekniğin kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Organik çözücülere olan ihtiyaç geliştirilmiş bu yöntem sayesinde minimum seviyelere inmiştir [127]. Numune bir katı üzerine adsorbe edilirken arzu edilmeyen maddeler çevreden uzaklaştırılmaktadır. Katı üzerine adsorbe edilen numune uygun bir solvent tarafında elüe edilmektedir [128].

2.11.2 Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (SFME)

SSE tekniğiyle karşılaştırıldığında ekstraksiyon solventinin μL seviyesinde kullanımı SFME'nin en önemli avantajlarındanıdır. Analitin zenginleştirilmesi sayesinde çözücü kullanımı azaltılmış, aynı zamanda da ekstra bir basamak olan buharlaştırmaya gerek kalmamıştır. Bu yöntemde sulu çözeltideki analitler su ile karışma özelliği olmayan bir organik solvente aktarılmaktadır [121].

SFME tekniklerinden bazıları şunlardır:

- Tek Damla Mikroekstraksiyon
- Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon
- Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon
- Metal Elek Bağlantılı Çift Şırınga-Sıvı Faz Mikroekstraksiyon

Bu yöntemlerin literatür uygulamaları da oldukça yaygındır [117], [121], [122], [127].

2.11.2.1 Tek Damla Mikroekstraksiyonu (TDME)

Tek damla mikroekstraksiyon (TDME) yöntemini 1996 senesinde Jeannot ile Cantwell tarafından bulunmuş olup bir şırınganın uç kısmında asılı olan organik damlanın pasif difüzyonla birlikte sulu ortamdaki çözünmüş veya gaz formundaki numunenin ekstrakte

edilmesi, sonrasında da bu işlemin sonlanmasıyla birlikte organik damlanın yeniden enjektöre alınmasıdır [129]. Sıvı ile gaz formundaki numuneleri ayırmak ve zenginleştirmek amacıyla sıklıkla kullanılan avantajlı bir tekniktir. Uygulamasının kolay oluşu, yüksek maliyete sahip olmaması, ekstraksiyon işleminin çabukluğu, analitik ekipmanlara kolaylıkla adapte edilebilmesi yöntemin avantajlarından [130]. Her ekstraksiyon için oluşan damla boyutlarının farklılığı sebebiyle bu analiz yönteminin tekrarlanabilirliği düşüktür [123], [131], [132].

2.11.2.2 Yüzen Katı Damla Mikroekstraksiyonu (YKDME)

Yüzen katı damla mikroekstraksiyonu (YKDME) yöntemi ilk olarak 2006 senesinde Khalili ve araştırma grubu geliştirmiş olup bu teknik ile TDME yönteminin olumsuz yönlerinin giderilmesi amaç edinilmiştir. Yer çekimi ile birlikte enjektörün ucundaki damlanın kolayca kopuşu ve bu mini damlanın enjektöre transferinin kolay olmaması yöntemin bazı eksikliklerindendir [133]- [135]. Geliştirilmiş olan teknik sayesinde erime noktası oda sıcaklığı civarında ve yüksek yoğunluğa sahip olmayan maddeden oldukça az miktarda örnek alınmasıyla birlikte numunenin mevcut olduğu çözelti içerisine eklenmesi ve numunelerin toplanması mümkün kılınmıştır. İşlem, ekstraksiyon çözücüsünün buzlu bir ortam içerisinde soğutulması ile sıvının üst kısmından alımıyla devam etmektedir. Alınan katı damlanın eritilmesi sonrasında analizi yapılabilmektedir [127], [133]- [136].

2.11.2.3 Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (DSSME)

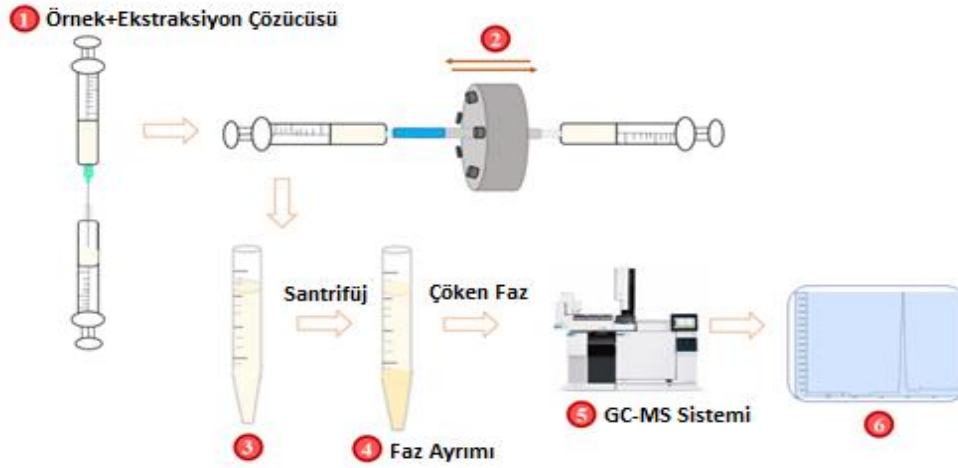
DSSME tekniği ile ilgili yapılan ilk çalışma Rezaee ve grubunun katkılarıyla literatüre sunulmuştur [137]. Temeli SSE'ye dayanan bu yöntemi diğerlerinden ayıran yön, suda bulunan analitin içine ekstraksiyon solventinin dağıtıcı bir solvent ile enjeksiyonunun sağlanmasıdır. Ekstraksiyonda verimin artabilmesi amacıyla ekstraksiyon solventi yalnız olarak değil, dağılımı kolaylaştıracak bir başka solventle birlikte verilerek ekstraksiyon solventinin yüzey alanının artması sağlanmıştır. Yalnızca ekstraksiyon solventinin kullanıldığı tekniklerde ekstraksiyon çözücüsünün sadece temas yüzeyinde mevcut olan numuneyle etkileşime geçebildiği ve bu sebeple yüksek verime ulaşamadığı görülmektedir. Bu yöntemde kullanılacak çözücülerden beklenen nitelikler şunlardır: ekstraksiyonda kullanılacak çözücü dağıtıcı faz ile karışabilmeli fakat su ile karışmamalı; dağıtma amaçlı kullanılacak olan çözücüsünün ise su ile birlikte

diğer çözücü ile de karışabilmesi beklenmektedir. Ekstraksiyonda sıklıkla kullanılan solventler CHL, DCM, karbon tetraklorür olarak tercih edilirken, dağıtma amaçlı kullanılan solventler etanol, metanol, asetonitril gibi kimyasallardır [138]. Su içerisinde bulunan analitin içerisine kullanılacak olan iki solvent ilave edildiğinde iki ayrı faz oluşumu görülmektedir. Ekstraksiyonun ardından santrifüj edildiğinde ise fazlar arasındaki ayırım kesin bir biçimde gözlenebilmektedir. Meydana gelen faz kullanılmış olan ekstraksiyon solventinin özkütlesine bağlı olarak santrifüj tüpünde altta ya da üstte konumlanabilmektedir. Kullanılmış olan ekstraksiyon solventinin özkütlesinin sudan büyük olması durumunda aşağı, küçük olması durumunda ise yukarı fazda toplanması söz konusudur. Meydana gelen faz bir pipet ile çekilebilmektedir. Bu işlem için şırınga da kullanılabilir. Bu aşamadan sonra alevli atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAAS) ile çalışılacağı durumda faz uçurulup ardından asit yardımıyla çözünmesi sağlanmaktadır. DSSME yönteminde genellikle çalışılacak olan fazın alttaki faz olması durumu arzu edilmektedir. Bu tercihin sebebi ise uçuculuğu yüksek organik solventlerin üstte bulunması durumunda kolaylıkla buharlaşıp derişimlerinin değişebilecek olması ve yöntem tekrarlanabilirliğin düşüklüğüdür [139], [140].

2.11.2.4 Metal Elek Bağlantılı Çift Şırınga- Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (MEBÇŞ-SFME)

MEBÇŞ-SFME sisteminde iki adet şırınga, aralarında metal elekli filtre ile birbirine bağlanarak şırıngaların eş zamanlı olarak biri içeri doğru yönlenirken diğerinin dışarı doğru hareket edeceği şekilde tasarlanmıştır. Ekstraksiyon çözücüsü olarak suda çözünmeyen DCM, CHL, 1, 2-dikloroetan (DCE) gibi organik çözücüler kullanılabilir [141].

İki şırınga arasına yerleştirilen metal elek, ekstraksiyon çözücüsünün sulu çözelti içindeki dağılımını arttırmak için tasarlanmıştır. Ekstraksiyon çözücüsünün dağılımı, şırıngalardaki hava boşluklarının neden olduğu basınçla daha da arttırılmaktadır. Geliştirilen yöntem sayesinde dağıtıcı çözücüye gerek kalmadan, küçük hacimde ekstraksiyon çözücüsü kullanılarak ekstraksiyon işlemi yapılabilir [141]. Şekil 2.10'da MEBÇŞ-SFME-GC-MS yöntemin şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.10 MEBÇŞ-SFME–GC-MS yönteminin şematik gösterimi [141]

Gösterişli ve arkadaşları piridafentiyon pestisitinin eser miktarlarda tayini için MEBÇŞ-SFME yöntemini kullanmışlardır. Bu çalışmada doğru, uygulanabilir ve kesin sonuçlar elde edilmesi için GC-MS’ten yararlanılmıştır. Deneylerde çözücü olarak diklorometan kullanılmış olup GL ve TL değerleri sırasıyla 0,8 ve 2,7 $\mu\text{g/L}$ olarak hesaplanmıştır. Geleneksel GC-MS sisteminin analitik performansı ile karşılaştırıldığında, geliştirilen bu yöntem sayesinde tayin gücünde yaklaşık 273 kat iyileşme sağlanmıştır [141].

2022 yılında yapılan bir çalışmada zeytin yaprağı ekstraktı numunesinde bakır tayini için basit, duyarlı ve düşük maliyetli bir yöntem olan MEBÇŞ-SFME yöntemini kullanılmış ve AAAS ile tayin edilmiştir. Yöntem AAAS ile karşılaştırıldığında tayin gücünde 20 katlık bir artış elde edilmiştir. Bu yöntem sayesinde dağıtıcı çözücüye olan ihtiyaç ortadan kaldırılmıştır. GL, TL ve %BSS değerleri sırasıyla 1,5, 5,1 $\mu\text{g/L}$ ve % 8,4 olarak hesaplanmıştır [142].

Gösterişli ve arkadaşları elek bağlantılı basınçlı çift şırınga sıvı faz mikroekstraksiyon ve yarıklı kuvars tüp-AAAS ile değerli metal atıklarında paladyum tayini yapmışlardır. Uygulaması basit ve verimli sonuçlar elde edilebilen bu yöntem sayesinde ekstraksiyon çözücüsünün yüzey alanını arttırmak için kullanılan dağıtıcı çözücüye olan ihtiyacın ortadan kalkmıştır. Şırınga pistonlarının hareketiyle oluşturulan yüksek basınç, ekstraksiyon çözücüsünün numune çözeltisi içerisinde etkili bir şekilde dağılmasını sağlamaktadır. Optimum koşullar altında GL ve TL sırasıyla 6,0 ve 20 $\mu\text{g/L}$ bulunmuştur. Geleneksel AAAS’ye kıyasla tayin gücünde 25 kat artış sağlanmıştır [143].

2022 yılında yayınlanan diğer bir çalışmada ise farklı su matrislerinde Cr (VI)'nın HPLC-UV ve dijital görüntü tabanlı kolorimetrik tayin yöntemiyle, metal eleğe bağlı çift şırınga sistemi yardımıyla kompleks halinde Cr (VI) tayini üzerinde çalışmıştır. MEBÇŞ sistemi krom kompleksinin (Cr-difenilkarbazit) oluşumu için kullanılmıştır [144].

Bu çalışmalara göre MEBÇŞ-SFME yöntemi kolay, hızlı, az çözücü kullanımı gerektiren ve etkili bir mikroekstraksiyon yöntemi olması açısından bu tez kapsamında fenitoinin evsel atık su ve yapay idrar örneklerinden zenginleştirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

2.12 Validasyon

Bir analitik yöntemin amacı, güvenilir, doğru ve duyarlı sonuçlara ulaşabilmektir. Doğruluk, bir yöntem ile ulaşılmış sonuçların ne kadar güvenilir ve tutarlı olduğunun bir ölçüsüdür. Laboratuvarlarda kullanılan analitik teknik ve yöntemlerin doğruluğunun ispat edilmesi gereklidir. Rutin testlerin uygulanacağı yeni veya eski analitik yöntemlerin geçerliliğinin doğrulanması veya yeniden değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Ayrıca, onaylanmış bir ya da birden çok prosedür değişikliği geçirmiş yöntemin geçerli olup olmadığı yeniden test edilmesi gerekmektedir. Yöntem validasyonunda kullanılmakta olan parametreler; gözlenebilme limiti (GL), tayin limiti (TL), çalışma aralığı, kesinlik, yüzde bağlı standart sapma (%BSS), doğruluk, sağlamlık, geri kazanım, tutarlılık, ve doğrusallıktır [145].

2.13 Gözlenebilme Limiti (GL) ve Tayin Limiti (TL)

Gözlenebilme limiti (GL), bir cihazın bir analiti tespit edilebildiği en düşük miktardır. Bu limit değerinde bir cevap alınsa dahi hata oranının yüksek olması sebebiyle tam bir değer olarak nitelendirilmek için oldukça düşüktür. Kör denemeler sonucunda önemli verilere ulaşıldığı zamanlarda bu veriler GL'yi hesaplamak için de kullanılabilir. TL, bir cihazın bir analiti tam ve doğru bir şekilde ölçebildiği tespit edilebilen en düşük konsantrasyondur. GL ve TL değerlerinin matematiksel ifadesi Denklem 2.1 ve Denklem 2.2'de gösterildiği gibidir [145].

$$GL = 3 \times SS/m \quad (2.1)$$

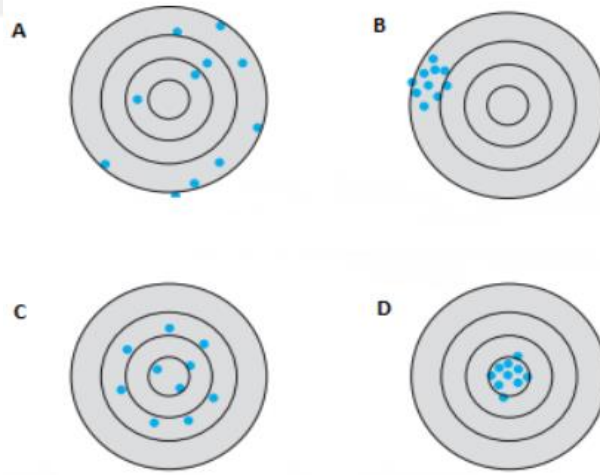
$$TL = 10 \times SS/m \quad (2.2)$$

Bu denklemlerde SS en düşük konsantrasyonun veya kör denemenin en az altı, en fazla on tekrarlı ölçümünün yapılmasıyla hesaplanan standart sapmayı, m ise kalibrasyon doğrusunun eğimini ifade etmektedir [146].

2.14 Kesinlik, Doğruluk ve Geri Kazanım

Kesinlik, tekrarlı olan ölçümlerin birbirine olan yakınlığını göstermekteyken doğruluk ise ölçüm sonuçlarının gerçek değere olan yakınlığını ifade etmektedir [147]. Kesinlik, standart sapmanın ortalama değerine oranı olan tekrarlı ölçümlerin %BSS ile temsil edilmektedir. İyi bir hassasiyet için %BSS değerinin 10'un altında olması istenmektedir [147].

Şekil 2.11'de kesinlik ve doğruluk şematik olarak gösterilmiştir. A durumu düşük doğruluk düşük kesinliği, B durumu düşük doğruluk yüksek kesinliği, C durumu yüksek doğruluk düşük kesinliği ve D durumunda ise en ideal durum olan yüksek doğruluk ve yüksek kesinliği göstermektedir [147].



Şekil 2.11 Kesinlik ve doğruluğun şematik gösterimi [147]

2.15 Literatürde Fenitoin ile Yapılan Çalışmalar

İlaç etken maddelerinin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri mevcuttur. Bu sebepten dolayı tayin edilebilmeleri önem arz etmektedir. Epilepsi hastalığının tedavisinde kullanılan fenitoin adlı ilaç etken maddesinin tayini literatüre sıklıkla konu olmuştur.

Fenitoin, yetersiz veya aşırı dozun nöbet veya toksisite gibi ciddi sonuçlara yol açabileceği en sık kullanılan kritik doz ilaçlarından biridir. Bu nedenle, hastalarda fenitoin konsantrasyonlarının izlenmesi ve kesin olarak ölçülmesi çok önemlidir [148].

Pourbasheer ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada HPLC ile su ve idrar numunelerinde fenitoinin zenginleştirilmesi ve tayini için DSSME yöntemi geliştirilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsü, dağıtıcı çözücü, tuz etkisi, ekstraksiyon süresi, santrifüj süresi, santrifüj hızı ve numune hacmi gibi çeşitli deneysel değişkenler incelenmiştir. Su ve idrar numuneleri için GL ve TL değerleri sırasıyla 0,94 ve 2,84 µg/mL ve 1,63 ve 4,94 µg/mL olarak hesaplanmıştır [149].

Asadi ve arkadaşları YOKDME ve HPLC kullanılarak insan plazma ve idrar numunelerinde lamotrijin, fenobarbital ve fenitoinin eş zamanlı ekstraksiyonu ve miktarının belirlenmesi konulu çalışmayı yürütmüş ve fenitoin için GL değerini 0,3 µg/L, doğrusal kalibrasyon aralığını ise 1,0–200 µg/L olarak hesaplamışlardır [150].

Hösli ve arkadaşları insan kanında ve tükürüğünde fenitoin tayini için LC-MS/MS sisteminde analitik yöntem geliştirmişler ve bu yöntemi GC-MS sistemindeki analitik yöntemle karşılaştırmışlardır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre LC-MS/MS yöntemi, GC-MS yöntemine kıyasla daha yüksek bir performans göstermiştir. LC-MS/MS yönteminde yüksek duyarlılığa sahip olunup, daha küçük bir numune hacmine ihtiyaç duyulmuştur (25 µL). Bunun yanında daha az kimyasal gerektirmiş ve temizleme, numune hazırlama ve analiz süresi olarak daha az zaman alıcı olmuştur. Bu yöntem daha iyi bir GL (<1 ng/mL)/TL (10 ng/mL) ile sonuçlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi çizildiğinde LC-MS/MS yönteminin 10–2000 ng/mL aralığında doğrusallık göstermiş ve test edilen tüm matriksler (kan, tükürük ve diyalizat) için $R^2 > 0,995$ korelasyon katsayısı elde edilmiştir. Farmakokinetik/farmakodinamik çalışmalarda ve rutin analizlerde olduğu gibi daha büyük numune sayıları için LC-MS/MS yöntemi, GC-MS yöntemine göre önemli avantajlar sunmaktadır. [148].

2023 yılında literatüre sunulan diğer bir çalışmada hastalardan alınan plazma örneklerinde terapötik ilaç izlemesi için tek referanslı HPLC yöntemi geliştirilip doğrulanmıştır. Analitik parametreler doğrusallık, kesinlik, GL, TL bakımından değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntem iyi bir doğrusallık göstermiştir. 254 nm’de fenitoin için TL değeri 1,56 µg/mL bulunmuştur [151].

Prentice ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı bir çalışmada fenitoinin karmaşık farmakokinetik özelliklere sahip güçlü bir nöbet önleyici ilaç olduğu ve bunun, onu, özellikle beyne ilaç dağıtımını iyileştirmeyi amaçlayan formülasyonlar açısından, prelinik in vivo araştırmalarda kullanmak için ilginç bir model ilaç haline getirdiği vurgulanmıştır. Ayrıca, vücuttaki davranışının daha iyi değerlendirilmesini sağlamak için eş zamanlı olarak incelenebilen 4'- HPPH adlı ana metabolite sahip olmasının önemli avantajlarından bahsedilmiştir. Bu çalışmada, bu tür prelinik çalışmalarda kullanılabilen sıçan plazmasında ve beyinde fenitoin ve 4'- HPPH miktarının belirlenmesi için duyarlı bir LC-MS/MS yönteminin geliştirilmesini ve doğrulanmasını açıklanmıştır. Üretilen kalibrasyon eğrileri, her iki analit için 7,81 ila 250 ng/mL (plazma) ve 23,4 ila 750 ng/g (beyin dokusu) aralığını kapsamaktadır. Yöntem, özgüllük, duyarlılık, doğruluk ve kesinlik açısından doğrulanmış ve her iki doku tipinde de bu aralığın üzerinde kabul edilebilir $\pm\%15$ sınırları içinde olduğu bulunmuştur [152].

3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kimyasallar/ Reaktifler

Bu çalışmada kullanılmış olan reaktiflerin tümü analitik saflıktadır. Fenitoin maddesi İstanbul'daki bir ilaç firmasından temin edilmiştir. Fenitoin ana stok çözeltisi (926,8 mg/kg) metanol içerisinde hazırlanmıştır. Farklı derişimlerdeki standart çözeltileri ise Milli-Q® Referans ultra saf su arıtma sisteminden elde edilen deiyonize su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Deneysel aşamalarda kullanılan tüm kimyasallar/reaktifler Tablo 3.1'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1 Deneylerde kullanılan kimyasallar/ reaktifler

Kimyasal Adı	Saflık Yüzdesi	Marka
Aseton	$\geq\%99,8$	Merck, Almanya
1,2-Dikloroetan	$\geq\%99,8$	Merck, Almanya
Kloroform	$\geq\%99$	Merck, Almanya
Asetonitril	$\geq\%99,9$	Merck, Almanya
Diklorometan	$\geq\%99,9$	Merck, Almanya
Etanol	$\%96$	Merck, Almanya
Metanol	$\geq\%99,9$	Merck, Almanya
Sodyum Hidroksit	$\geq\%97,0$	Merck, Almanya
Sülfirik Asit	$\%98$	Merck, Almanya

Tablo 3.1 Deneylerde kullanılan kimyasallar/ reaktifler (devamı)

Benzil	%98	Merck, Almanya
Üre	≥% 99,5	Merck, Almanya
Fenilasetil Klorür	%98	Merck, Almanya
Etil Asetat	≥%99,8	Merck, Almanya
Hekzan	≥%99,9	Merck, Almanya
Benzoil Klorür	%99	Merck, Almanya
Asetik Anhidrit	≥%99,8	Merck, Almanya
Sodyum Klorür	%99	Merck, Almanya
Kalsiyum Klorür	≥%97	Merck, Almanya
Potasyum Klorür	%99	Merck, Almanya
Sodyum Sülfat	≥%99	Merck, Almanya
Potasyum Dihidrojen Fosfat	%99,9	Merck, Almanya
Amonyum Klorür	≥%99,5	Merck, Almanya
Potasyum Hidroksit	%99,9	Merck, Almanya

3.2 Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler

Analitlerin tayininde kullanılan GC-MS'e ait donanımsal bilgiler Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2 GC-MS cihaz programı

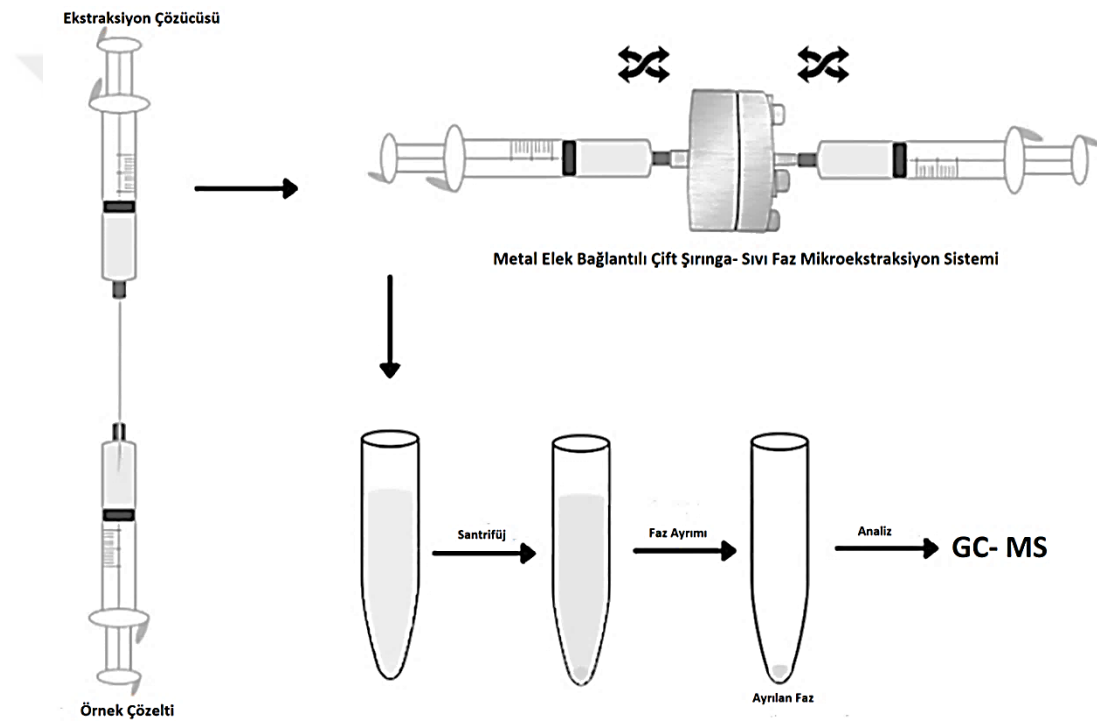
Parametre	Değer
Kolon	HP-5MS kapiler kolon (30 m × 250 µm i.d. × 0.25 µm film kalınlığı)
Taşıyıcı Gaz	Helyum 1.2 mL/dk
Enjeksiyon Modu	Bölücüsüz/ 1.0 µL
Sıcaklık Programı	Başlangıç sıcaklığı 120 °C'dir. 20 °C/dk hız ile 300 °C'ye sıcaklık yükseltip 1,0 dk boyunca bu sıcaklıkta bekletilir.
MS Source Sıcaklığı	230 °C
MS Quad Sıcaklığı	150 °C
Inlet Sıcaklığı	290 °C

Sentezler aşamalarında bileşiklerin elde edilmesi ve kolondan ayırma işlemleri sırasında çözücülerin geri kazanılmasında, Heidolph marka Laborota 4000 (Schwabach, Almanya) model döner buharlaştırıcı kullanılmıştır. Fenitoin ve fenasemid sentez aşamalarında Heidolph ısıtıcılı karıştırıcı (Schwabach, Almanya) ve Radley Starfish çoklu reaktör (Essex, İngiltere); türevlendirme aşamalarında Bandelin Sonorex Super Ultrasonik Banyo (Berlin, Almanya) cihazları kullanılmıştır. Sentezlenen ve saflaştırılan bileşiklerin FTIR spektrumları Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü'nde bulunan Perkin Elmer (Massachusetts, Amerika Birleşik Devletleri) cihazı

ile ölçümü alınmıştır. Kullanılan diğer gereçler ise Sartorius Analytic A 120 S (Illinois, Amerika Birleşik Devletleri) marka hassas terazi, Hettich Zentrifugen (Bäch/ SZ, İsviçre) marka santrifüj cihazı ve Beybi (İstanbul, Türkiye) markalı 10CC enjektördür.

3.3 Metal Elek Bağlantılı Çift Şırınga-Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (MEBÇŞ-SFME) Yöntemi

Sistem tasarımında iki adet şırınga, aralarında metal elek olacak şekilde ve şırıngalar eş zamanlı olarak biri içeri diğeri dışarı hareket edecek şekilde birbirine tutturulmuştur. MEBÇŞ-SFME sisteminin şematik gösterimi Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 MEBÇŞ-SFME-GC-MS sistemi [142]

İki şırınga arasına yerleştirilen metal elek, ekstraksiyon çözücüsünün çözelti içindeki dağılımını arttırmak için kullanılmaktadır. Manuel olarak gerçekleştirilen şırınga pistonlarının ileri-geri hareketiyle oluşan basınç yardımıyla karıştırma yapılmıştır. MEBÇŞ-SFME-GC-MS sisteminde kullanılan metal elek Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Kullanılan metal elek 5,0 cm çapında, 2,5 cm genişliğinde paslanmaz çelikten yapılmış olup 1,4 cm çapında metal elek ve yüzlerce delikten oluşan bir alettir.



Şekil 3.2 MEBÇŞ-SFME-GC-MS sisteminde kullanılan metal elek [141]

Bu yöntemde 10,0 mL standart/numune çözeltisi 10 mL'lik şırınga içerisine aktarılmıştır. Ekstraksiyon çözücüsü (200 μ L kloroform) bir mikropipet ile çekilmiş ve 10 mL hacimli şırıngadaki standart/numune çözeltisine eklenmiştir. Şırıngalar 5,0 kez ileri-geri hareket ettirilerek ekstraksiyon çözücüsünün numune içerisine dağılımı sağlanmıştır. Bu durum sonucunda bulanık bir çözelti elde edilmiş olup oluşan bulanık çözelti temiz bir tüpe aktarılmış ve hızlı ve temiz bir faz ayrımı sağlamak için 2,0 dakika süreyle 6000 rpm'de santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj tüpünün alt kısmında oluşan kloroform fazı mikropipet yardımıyla alınarak temiz bir vial e aktarılmış ve tayin için GC-MS sistemine gönderilmiştir.

3.3.1 Örnek Hazırlama

Geri kazanım çalışmasında hazır yapay idrar örneği “Cerilliant Surine™ Negative Synthetic Urine digger” kullanılmıştır. Diğer bir yapay idrar örneği araştırma laboratuvarımızda hazırlanmıştır. 0,1482 g NaCl, 0,0834 g KCl, 0,0575 g CaCl₂, 0,1122 g Na₂SO₄, 0,0727 g KH₂PO₄, 0,0508 g NH₄Cl ve 1,2552 g üre bir balon jojeye tartılmış, daha sonra 250 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır [153]. Her iki yapay idrar örneğinden ayrı ayrı tüplere 4,0 mL alınarak 40 mL'ye saf su ile seyreltilmiştir.

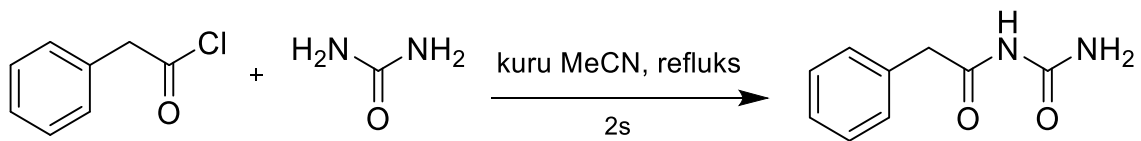
Geri kazanım çalışmalarında kullanılan evsel atık suyu numuneleri Yıldız Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiş ve 4,0 °C'de saklanmıştır. Atık su numuneleri analiz öncesinde siyah bantlı süzgeç kağıdı ve bir selüloz asetat (RC) 0,45 μ m şırınga filtresi kullanılarak süzölmüştür.

4.1 Türevlendirme Reaksiyonları ve Karakterizasyon Çalışmaları

Bu bölümde fenasemid ve fenitoin ilaç etken maddelerinin GC-MS sisteminde tayini için yeni bir türevlendirme reaksiyonunun geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmış ve karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar ortamında sentezlenen altı ayrı bileşiğe ait bazı FTIR ve MS spektrumları ile GC-MS kromatogramları kullanılarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

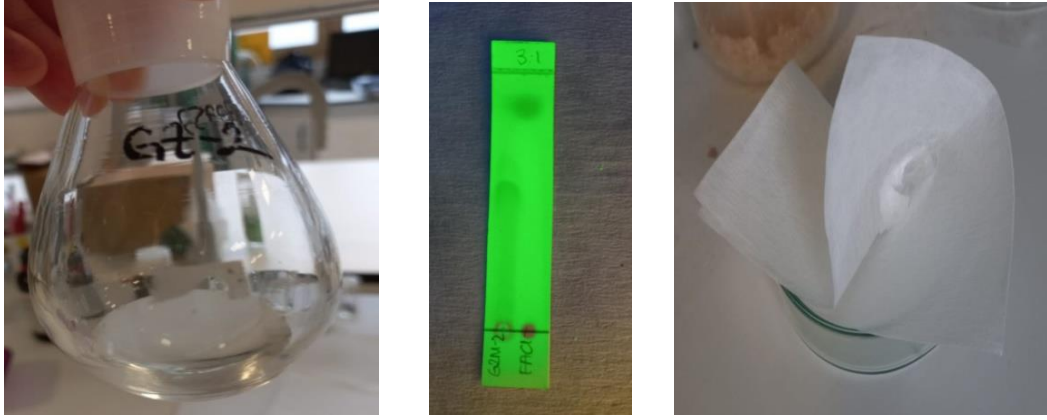
4.1.1 N-(karbamoil)-2-fenilasetamid-N (Fenasemid) (Bileşik 1) Sentezi ve Karakterizasyonu

Yuvarlak dipli bir balona 1,0 mmol (0,164 gram) fenilasetil klorür alındıktan sonra üzerine 10 mL kuru asetonitril çözücü olarak eklenmiştir. Daha sonra 1,5 mmol (0,0966 gram) üre reaksiyon ortamına ilave edilmiştir. Reaksiyonun 4 saat boyunca 50°C’de reflüks olması sağlanmış, 3:1 etil asetat/ hekzan sisteminde bakılan İTK kontrolü ile reaksiyon sonlandırılmıştır. Döner buharlaştırıcıda reaksiyon çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra beyaz renkli katı elde edilmiştir. Bileşik 1’in sentez reaksiyonu Şekil 4.1’de verilmiştir.



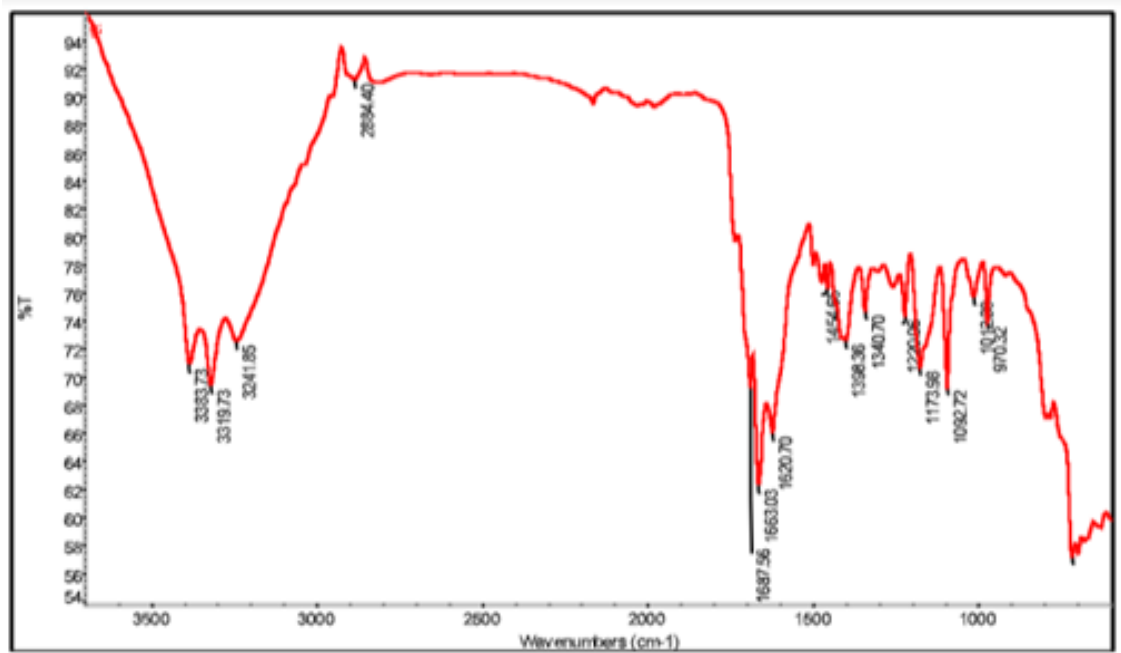
Şekil 4.1 Bileşik 1’e ait FTIR spektrumu

Bileşik 1'in sentezlendiği yuvarlak dipli balon, reaksiyonu sonucu bakılan İTK örneği ve reaksiyon sonucu elde edilen beyaz katı Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Bileşik 1 reaksiyon aşamaları

Bileşik 1'e ait FTIR spektrumu Şekil 4.3'de verilmiştir.



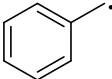
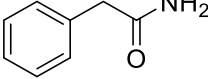
Şekil 4.3 Bileşik 1'e ait FTIR spektrumu

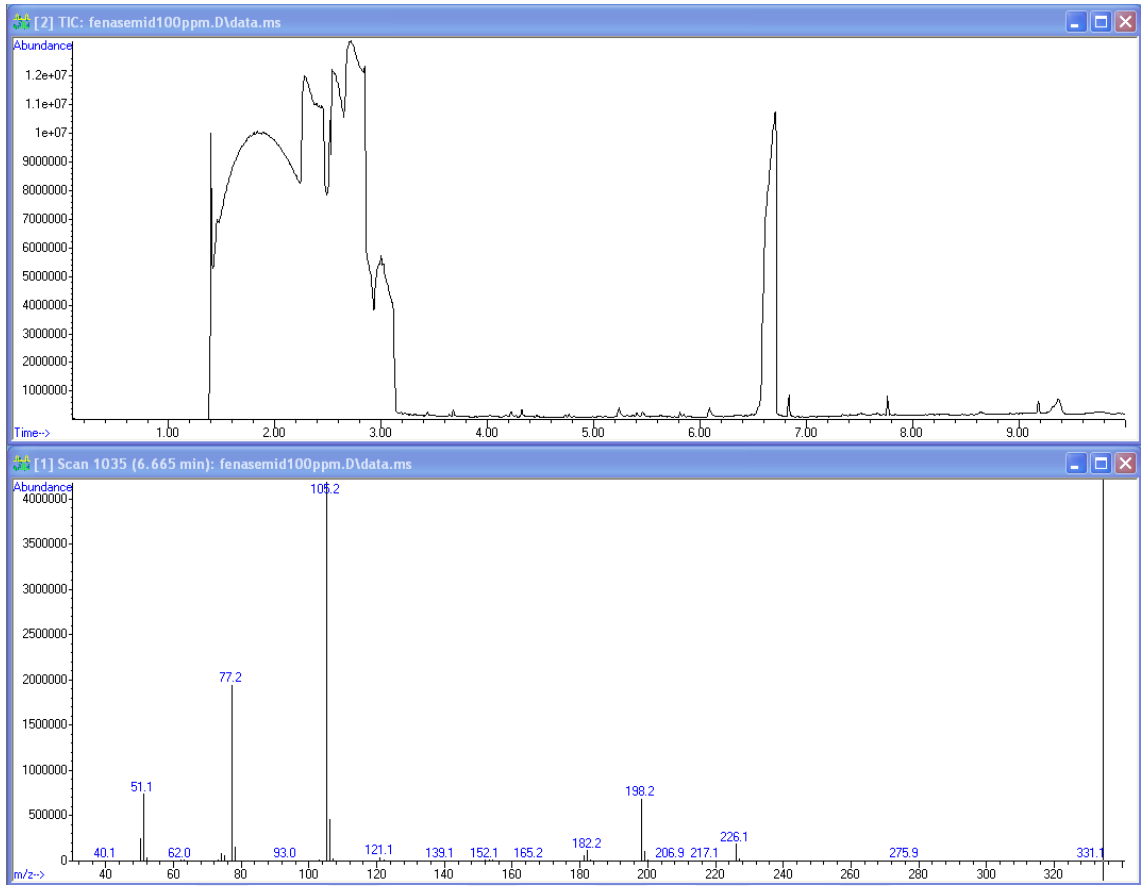
FTIR(ATR): ν = 3383 ve 3319 (N-H gerilimleri), 3241 (alkenik C-H gerilimi), 2834 (alifatik C-H gerilimi), 1637 (C=O gerilim), 1173 (C-N salınımı), 970 (aromatik halka düzlem içi C-H eğilimi) cm^{-1}

FTIR spektrumunda 3383 ve 3319 cm^{-1} 'de görülen N-H gerilme pikleri ve 1637 cm^{-1} 'deki karbonil grubu pikinden yola çıkarak Bileşik 1 sentezi başarı ile gerçekleşmiştir.

Fenasemid molekölü için beklenen temel parçalanma ürünlerinin m/z kütleleri şunlardır; 91, 43, 44; 77, 43, 44, 15; 135, 44. Bu parçalanma ürünleri ve karşılık gelen m/z kütleleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Bileşik 1 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri

Beklenen Parçalanma Ürünü	Beklenen m/z Kütlesi
	91,05
	43,01
	44,01
	77,04
	43,02
	135,07
	16,02

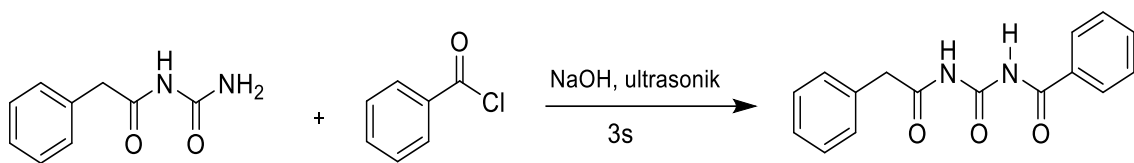


Şekil 4.4 Bileşik 1 GC-MS kromatogramı

Şekil 4.4’de elde edilen kromatogram ve MS spektrumuna göre fenasemid için beklenen m/z değerleri tespit edilememiştir. Bu durum sentezlenen bileşiğin GC-MS sistemine uygun bir analit olmadığı sonucuna varılmıştır.

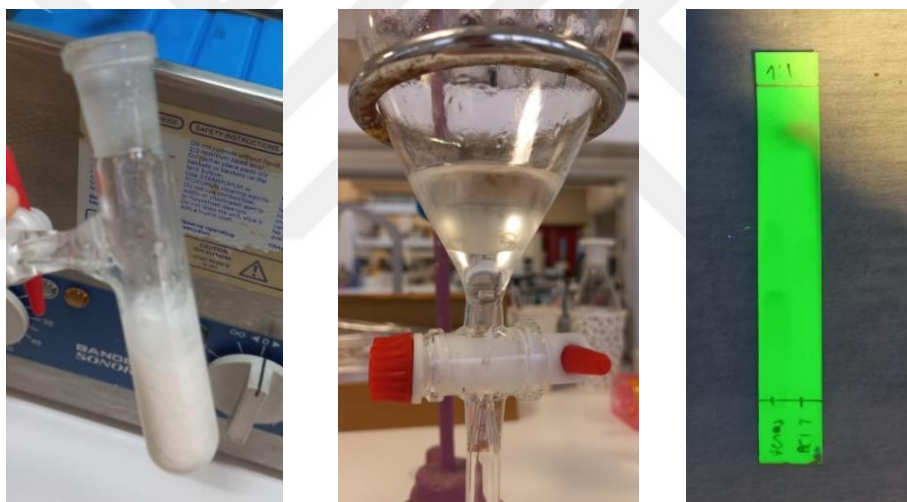
4.1.2 N-((2-fenilasetil) karbamoil) benzamid) (Bileşik 2) Sentezi ve Karakterizasyonu

Bir Schlenk tüpüne 0,25 mmol (44,54 mg) fenasemid katısı tartılmıştır. Sonrasında 1,0 mmol (40 mg) NaOH 2,0 mL saf suda çözülerek tüpe aktarılmış ve katının çözünmesi sağlanmıştır. Üzerine 1,0 mmol (140,57 mg) benzoil klorür eklenmiştir. Eklendikten hemen sonra beyaz katı çökeltilinin oluşmaya başladığı görülmüş olup reaksiyon karışımı 3,0 saat boyunca ultrasonik banyo içerisinde tutulmuştur. Etil asetat ile ekstrakte edilen organik faz Na_2SO_4 ile kurutulmuş, çözücüsü döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmıştır. 1:1 (v/v) etil asetat/hekzan çözücü sisteminde gerçekleştirilen İTK kontrolü sonucu reaksiyon sonlandırılmıştır. Gerçekleşen reaksiyon Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



Şekil 4.5 Bileşik 2 sentez reaksiyonu

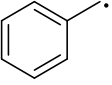
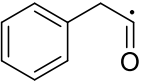
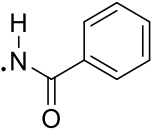
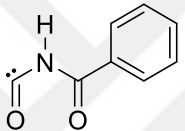
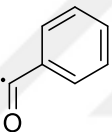
Reaksiyonun gerçekleştiği Schlenk tüpü, reaksiyon bitiminde bakılan İTK örneği ve ekstraksiyonun gerçekleştiği ayırma hunisi Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



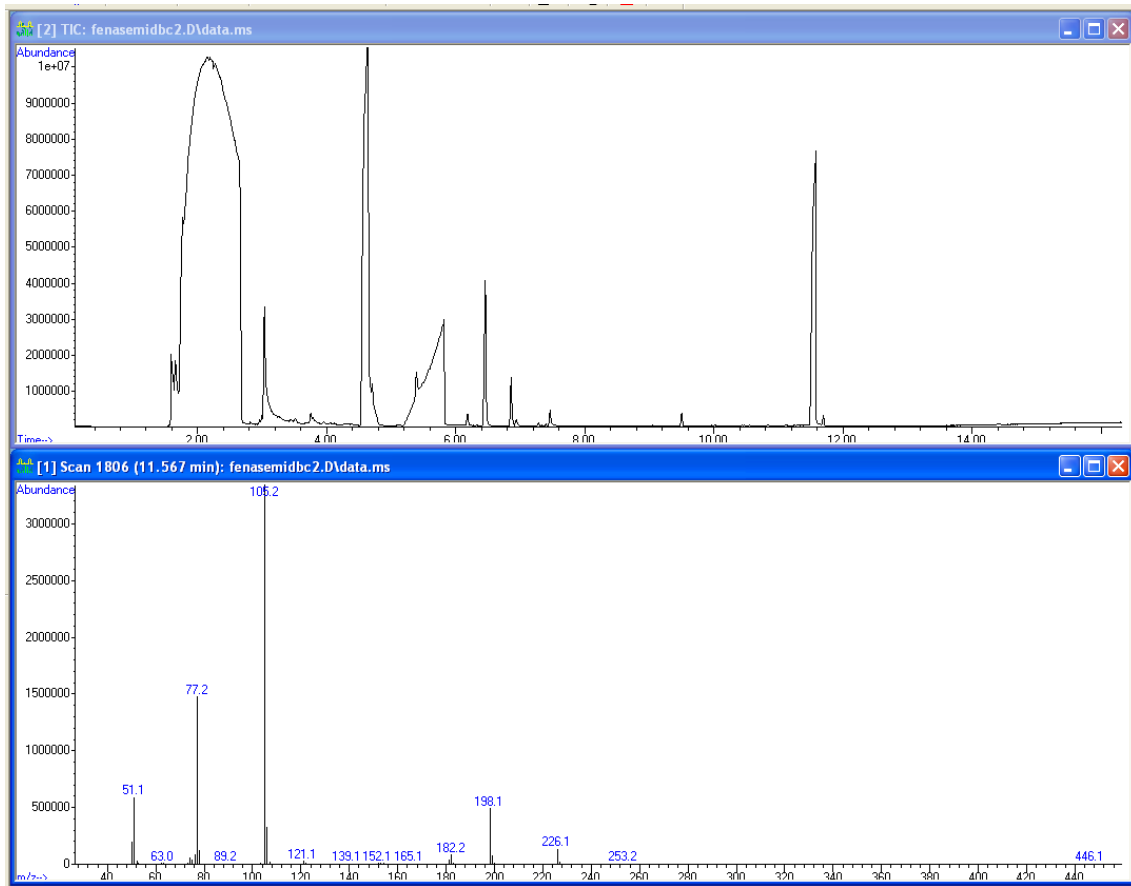
Şekil 4.6 Bileşik 2 reaksiyon aşamaları

Bileşik 2’nin GC-MS analizi esnasında beklenen parçalanma ürünleri ve bunlara karşılık gelen m/z kütleleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2 Bileşik 2 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri

Beklenen Parçalanma Ürünü	Beklenen m/z Kütlesi
	91,05
	43,01
	119,05
	120,04
	149,05
	105,03

Fenasemid molekülünün benzoil klorür reaktifi ile türevlendirilmesiyle edilen yeni bileşiğin temel parçalanma ürünlerinin m/z kütleleri şunlardır; 91, 43, 105; 119, 43,120; 91, 43, 120. Bileşik 2'ye ait GC-MS kromatogramı ve MS spektrumu Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

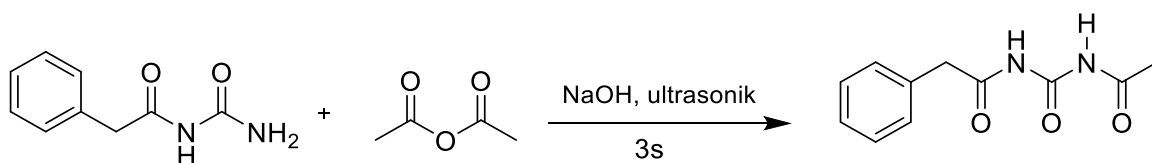


Şekil 4.7 Bileşik 2 GC-MS kromatogramı

Şekil 4.7’de görüldüğü üzere sentezlenen türevin GC-MS analiz sonucunda beklenen m/z oranlarına sahip parçalanma ürünleri elde edilememiştir. Bu nedenle benzoil klorür ile GC-MS sistemine uygun bir fenasemid türevi elde edilememiştir.

4.1.3 N-(asetilkarbamoyl)-2-fenilasetamid (Bileşik 3) Sentezi ve Karakterizasyonu

Bir Schlenk tüpüne 0,25 mmol (44,54 mg) fenasemid katısı tartıldıktan sonra 1,0 mmol (40 mg) NaOH 2,0 mL saf suda çözülerek reaksiyon ortamına eklenmiş ve katının çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra üzerine 1,0 mmol (102,09 mg) asetik anhidrit eklenmiş olup 4,0 saat boyunca ultrasonik banyo içerisinde reaksiyon devam ettirilmiştir. Etil asetat ile ekstraksiyon yapılarak organik faz alındıktan sonra Na₂SO₄ ile kurutulmuştur. Reaksiyonun çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Reaksiyon esnasında herhangi bir katı oluşumu gözlenmemiştir. Bileşik 3 sentez reaksiyonu Şekil 4.8’de gösterilmiştir.

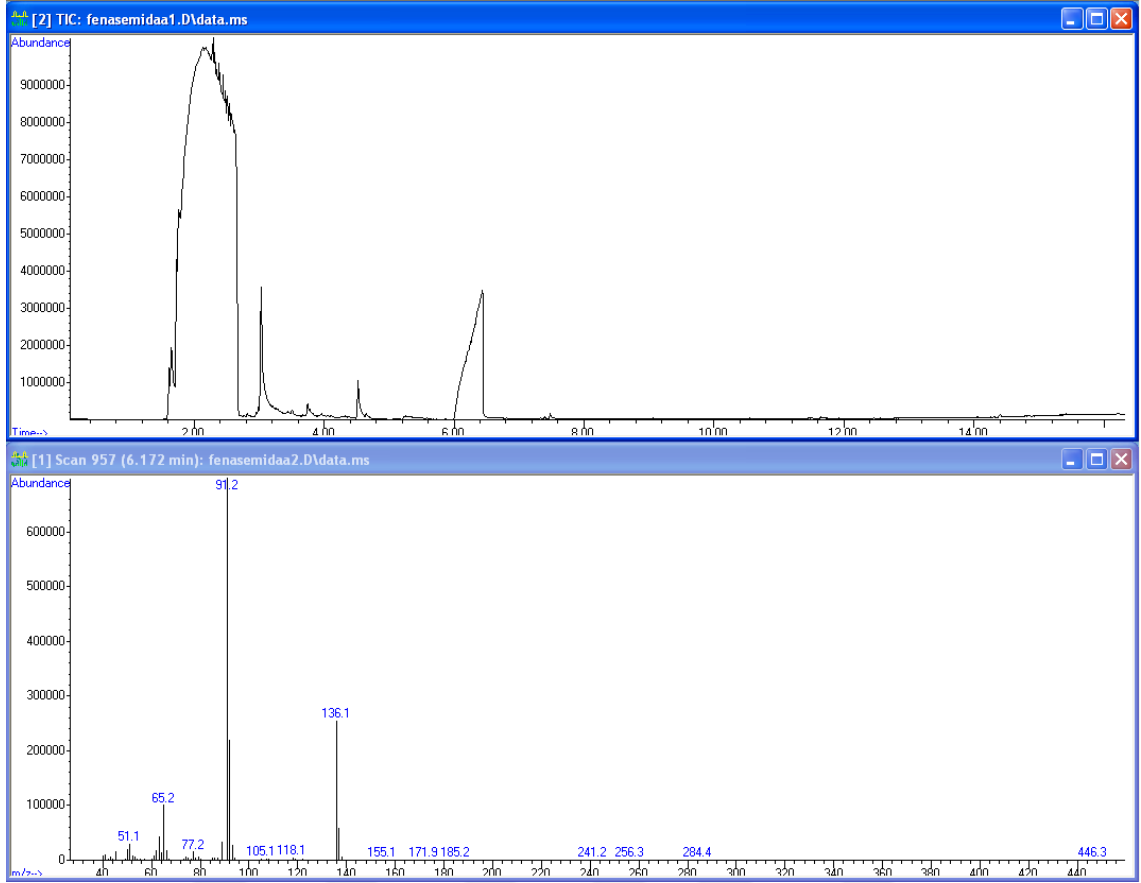


Şekil 4.8 Bileşik 3 sentez reaksiyonu

Tablo 4.3 Bileşik 3 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri

Beklenen Parçalanma Ürünü	Beklenen m/z Kütlesi
	77,04
	85,02
	58,03
	91,05
	43,01
	86,02

Tablo 4.3’de de gösterildiği üzere fenasetid molekülünün asetik anhidrit reaktifi ile türevlendirilmesiyle edilen yeni bileşiğin temel parçalanma ürünlerinin beklenen m/z kütleleri şunlardır; 77, 85, 58; 91, 43, 86. Bu bileşiğe ait GC-MS kromatogramı ise Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9 Bileşik 3 GC-MS kromatogramı

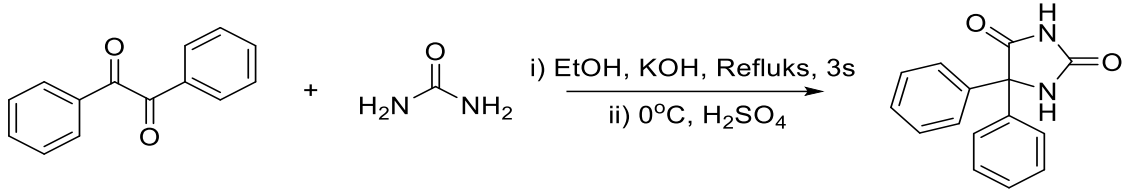
GC-MS analiz sonucunda fenasemid asetik anhidrit türevine ait beklenen parçalanma ürünleri gözlemlenmemiştir. Bu nedenle elde edilen türevin GC-MS sistemine uygun olmadığı ve bu sebeple fenasemidin GC-MS sisteminde tayinine ilişkin asetik anhidrit ile türevlendirme işleminin yapılamayacağı sonucuna varılmıştır.

Hem benzoil klorür hem de asetik anhidrit ile türevlendirme sonucunda GC-MS sisteminde beklenen parçalanma ürünlerinin elde edilememesi nedeniyle fenasemid molekülünün GC-MS sisteminde tayini gerçekleştirilememiştir.

4.1.4 5, 5-difenilimidazolidin-2, 4-dion (Fenitoin) (Bileşik 4) Sentezi ve Karakterizasyonu

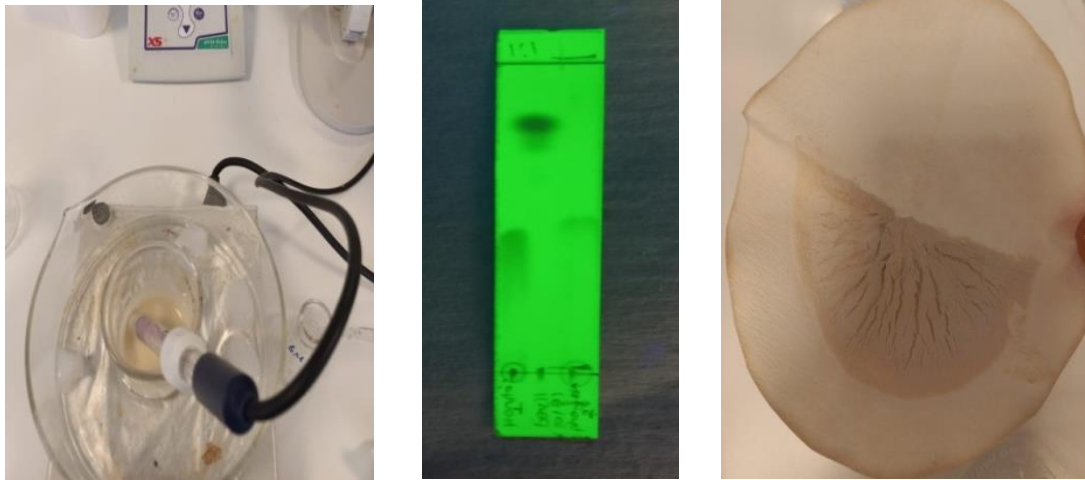
Yuvarlak dipli bir balona 0,6 g benzil ve 0,36 g üre alındıktan sonra üzerine 6,0 mL %95'lik etanol ilave edilerek katıların bir miktar çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra 14,8 M KOH çözeltisinden yaklaşık 2,0 mL reaksiyon ortamına eklenmiştir. Reaksiyon karışımının 3,0 saat boyunca 100°C'de karıştırılarak reflüks olması sağlanmıştır. Oda sıcaklığına gelen karışımda meydana gelen çökeltiler süzülerek uzaklaştırılmıştır. Süzüntü bir buz banyosunun içine yerleştirilerek soğuması sağlanmıştır. 6,0 M HCl

çözeltisi ile pH değeri 2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Macunumsu kıvamda bir ürün meydana gelmiştir. Bu ürün süzgeç kağıdından süzülüp saf su ile yıkanmıştır. Bu sayede inorganik tuzlar ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen krem rengi katı kurutulduktan sonra etanolden kristallendirilmiştir. Bileşik 4'e ait sentez reaksiyonu Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



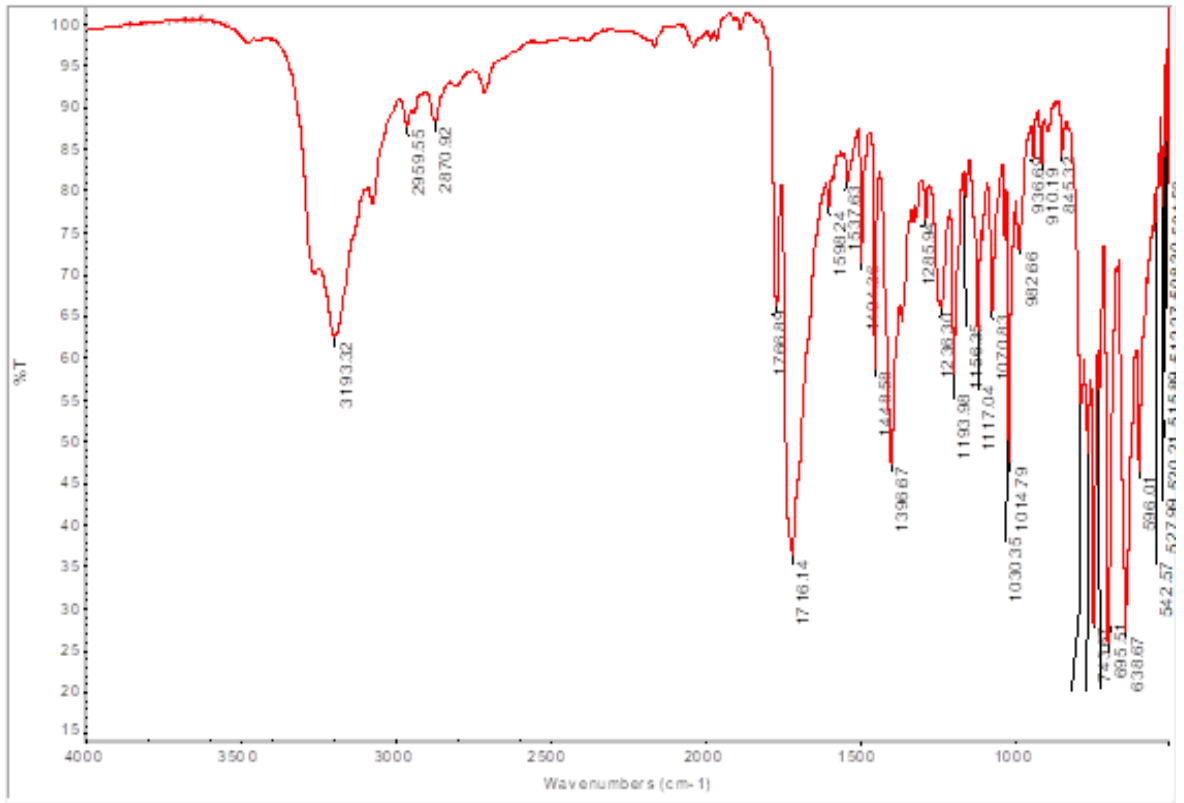
Şekil 4.10 Bileşik 4 sentez reaksiyonu

Reaksiyon esnasında pH ayarlama, reaksiyon sonucu bakılan İTK örneği ve elde edilen krem rengi katı Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11 Bileşik 4 reaksiyon aşamaları

Bileşik 4'e ait FTIR Spektrumu Şekil 4.12'de verilmiştir.

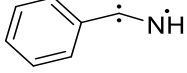


Şekil 4.12 Bileşik 4'e ait FTIR spektrumu

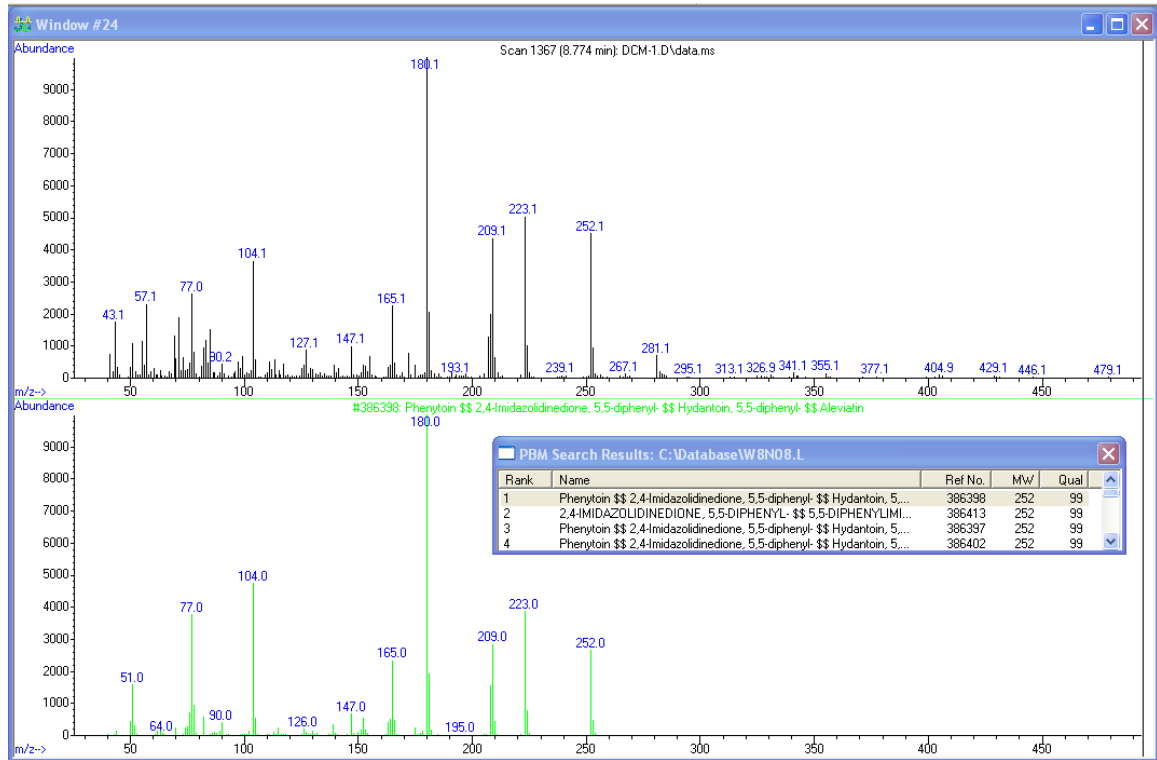
FTIR (ATR): ν = 3193 (N-H gerilimi), 1766 (C=O gerilimi) 1173 (C-N salınımı), 1030 (C-N gerilimi), 695 ve 638 (aromatik halka düzlem içi C-H eğilimi) cm^{-1}

FTIR spektrumunda 3193 cm^{-1} 'de görülen sekonder amin piki ve 1766 cm^{-1} 'de görülen karbonil grubu pikine dayanarak Bileşik 4 sentezinin başarılı olduğu sonucuna varılmıştır. Bileşik 4'ün MS kütüphanesindeki kütle spektrumu Şekil 4.13'de verilmiştir.

Tablo 4.4 Bileşik 4 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri (devamı)

	104,05
	71,00

Tablo 4.4’de gösterildiği üzere Bileşik 5’in temel parçalanma ürünlerinin m/z kütleleri şunlardır; 181, 28, 43; 104, 77, 71.



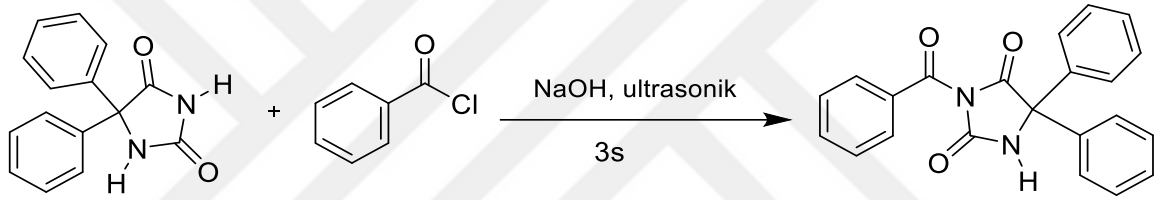
Şekil 4.14 Sentezlenen Bileşik 4 ile GC-MS kütüphanesinin karşılaştırılması

Şekil 4.14’de gösterilmiş olan spektrumlarda üst spektrum sentezlenen maddeye, alt spektrum ise kütüphanede bulunan fenitoine aittir. Şekilde görüldüğü üzere sentezden elde edilen spektrumun MS kütüphanesinde bulunan fenitoin MS spektrumu ile uyumludur. Bu durumun fenitoin sentezinin başarılı şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Üre-d4 ile Bileşik 4-d2'nin sentezi, mekanizma koşullarından dolayı mümkün olmadığından denemesi yapılmamıştır.

4.1.5 3-benzoil-5,5 -difenilimidazolidin-2,4-dion (Bileşik 5) Sentezi ve Karakterizasyonu

Bir Schlenk tüpüne 0,5 mmol (126,13 mg) fenitoin tartılıp, üzerine 2,0 mmol (80 mg) NaOH 5,0 mL deiyonize suda çözülerek reaksiyon ortamına ilave edilmiş ve katının çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra reaksiyon ortamına ortama 2,0 mmol benzoil klorür (0,282 mg) eklenmiştir. Bu eklemekten sonra beyaz katı çökeltiler görünmeye başlamış ve 3 saat reaksiyonun devam etmesi sağlanmıştır. Daha sonra etil asetat ile ekstraksiyon yapılmış, organik faz Na_2SO_4 ile kurutulmuş, çözücüsü döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldıktan sonra beyaz katı elde edilmiştir. Bileşik 5 sentez reaksiyonu Şekil 4.15'de gösterilmiştir.



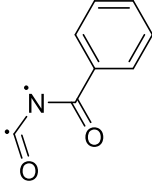
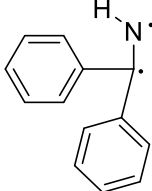
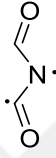
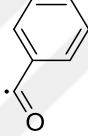
Şekil 4.15 Bileşik 5 sentez reaksiyonu

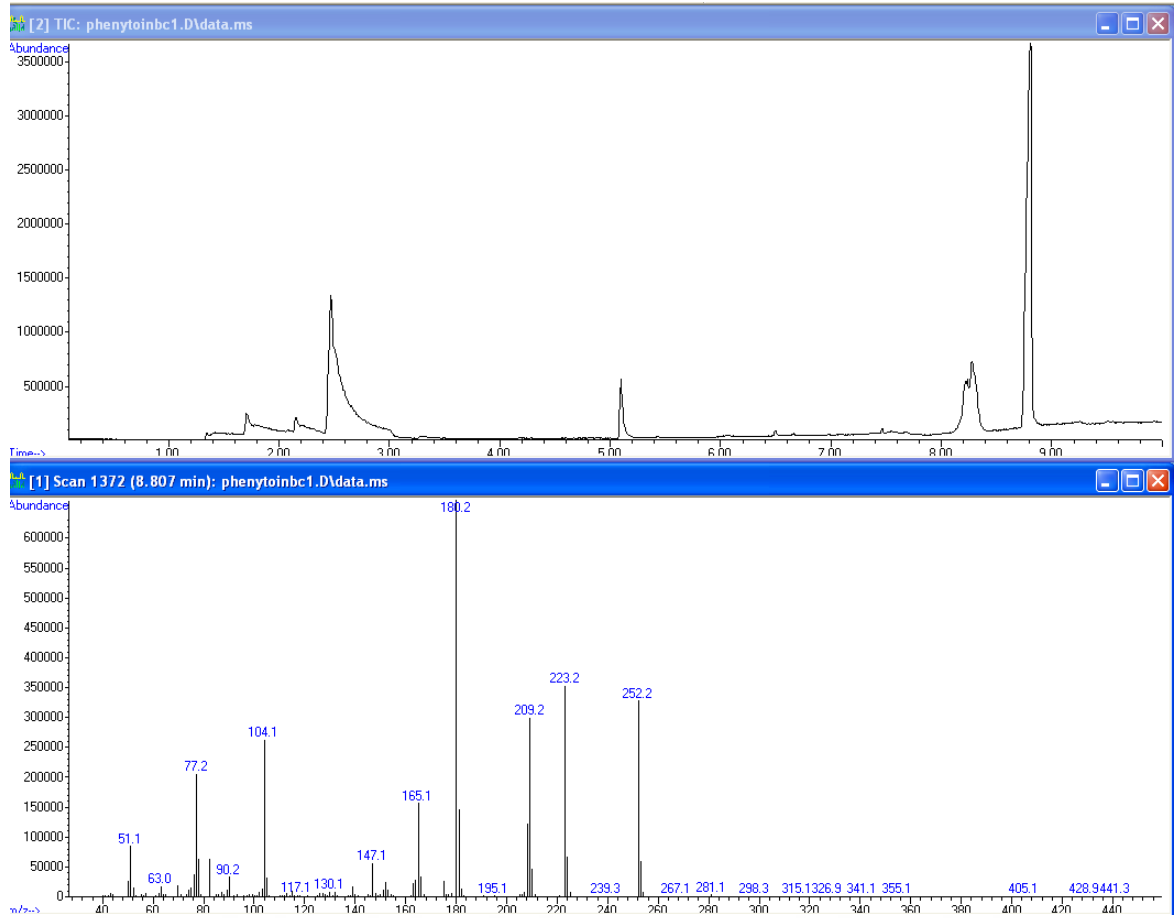
Tablo 4.5'de görüldüğü gibi Bileşik-5'in temel parçalanma ürünlerinin m/z oranları şunlardır; 166, 43, 147; 105, 70, 181.

Tablo 4.5 Bileşik 5 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri

Beklenen Parçalanma Ürünü	Beklenen m/z Kütlesi
	166,08
	43,01

Tablo 4.5 Bileşik 5 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri (devamı)

	147,03
	181,09
	69,99
	105,03

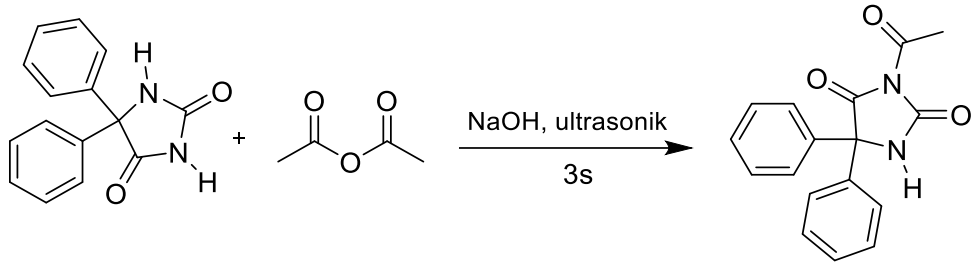


Şekil 4.16 Bileşik 5 GC-MS kromatogramı ve MS spektrumu

Şekil 4.16’da gösterilmiş olan MS spektrumunda beklenen m/z kütleleri görülememiştir. Bu nedenle fenitoinin benzoyl klorür ile türevlendirme reaksiyonu GC-MS sisteminde tayini gerçekleştirilememiştir.

4.1.6 3-asetil-5,5-difenilimidazolidin-2,4-dion (Bileşik 6) Sentezi ve Karakterizasyonu

Bir Schlenk tüpü içerisine 0,5 mmol (126,13 mg) fenitoin katısı alındıktan sonra üzerine 2,0 mmol (80 mg) NaOH 5,0 mL deiyonize suda çözülerek reaksiyon ortamına ilave edilmiş ve katının çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra reaksiyon ortamına 2,0 mmol asetik anhidrit (0,204 mg) eklenmiştir. Bu eklemekten sonra beyaz katı çökeltiler görünmeye başlanmış olup reaksiyonun 3,0 saat devam etmesi sağlanmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra etil asetat ile ekstraksiyon yapılmış, elde edilen organik faz Na_2SO_4 ile kurutumuş, çözücüsü döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmış ve beyaz katı elde edilmiştir. Bileşik 6’ya ait sentez reaksiyonu Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



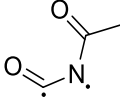
Şekil 4.17 Bileşik 6 sentez reaksiyonu

Tablo 4.6’da Bileşik 6 için beklenen parçalanma ürünleri ve bunlara karşılık gelen m/z kütleleri verilmiştir.

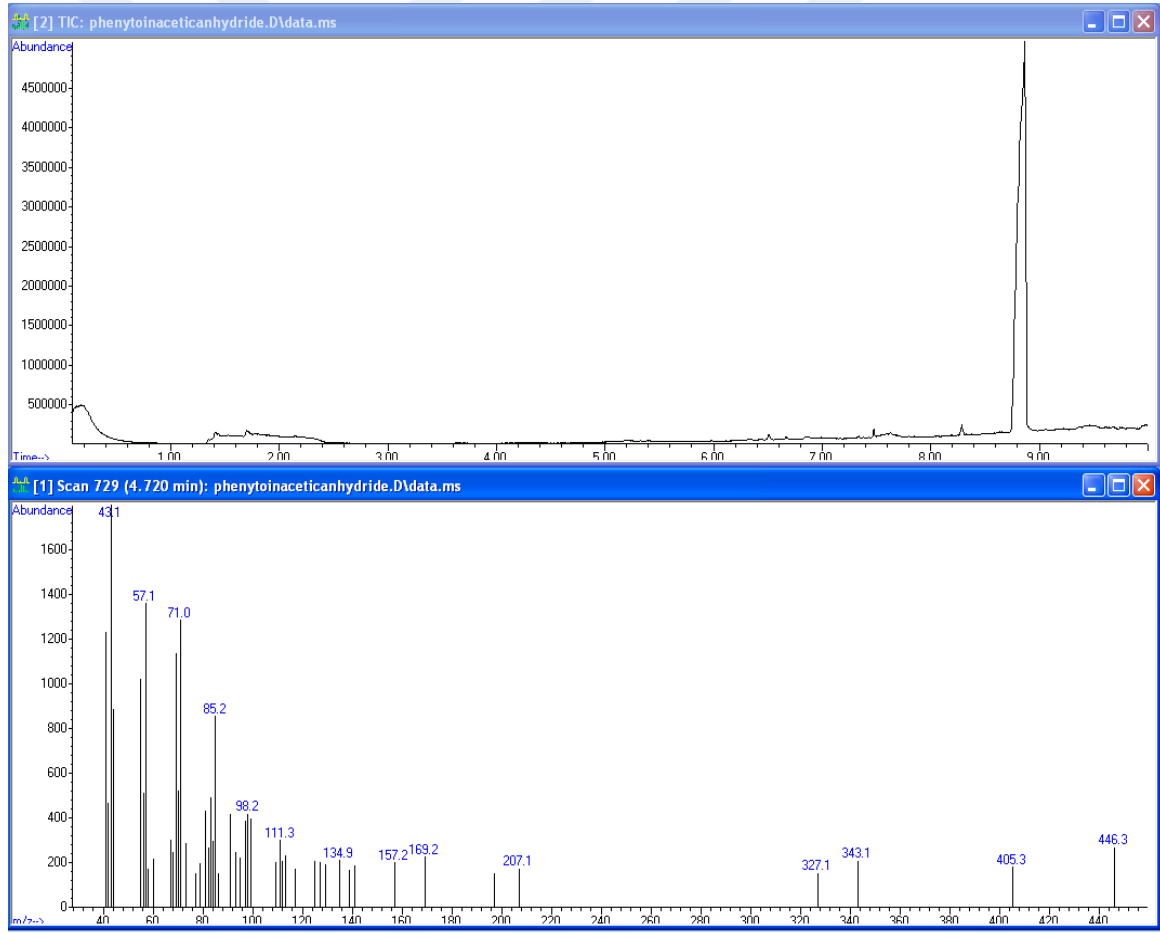
Tablo 4.6 Bileşik 6 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri

Beklenen Parçalanma Ürünü	Beklenen m/z Kütlesi
	77,04
	117,03
	100,03
	166,08

Tablo 4.6 Bileşik 6 için beklenen parçalanma ürünleri ve kütleleri (devamı)

	43,01
	85,02

Tablo 4.6’da gösterildiği gibi fenitoinin asetik anhidrit ile türevlendirilmesiyle elde edilen bileşiğin temel parçalanma ürünlerinin m/z kütleleri şunlardır; 77, 117, 100; 85, 166, 43.



Şekil 4.18 Bileşik 6 GC-MS kromatogramı

Şekil 4.18’de Bileşik 6’ya ait GC-MS kromatogramı ve MS spektrumu verilmiştir. Türevden beklenen m/z oranları elde edilememiştir. Bu nedenle fenitoinin asetik anhidrit ile türevlendirilmesi sonucu GC-MS’de tayini gerçekleştirilememiştir.

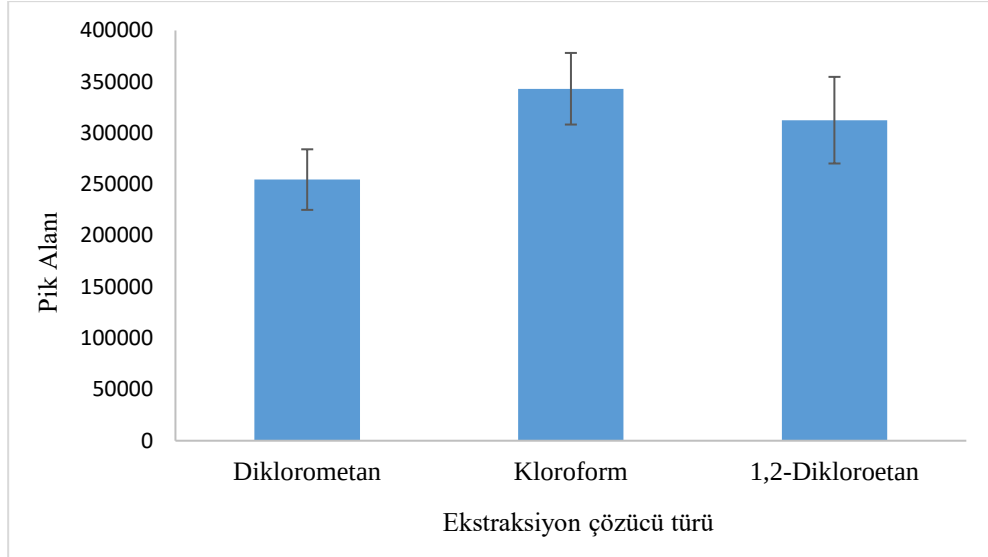
Fenasemid ve fenitoin moleküllerinin GC-MS sisteminde tayini için yeni bir türevlendirme reaksiyonu geliştirilmesi hedeflenmiş ancak uygulanan yöntemler sonucu elde edilen türevlerin GC-MS sistemine uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle GC-MS sisteminde türevlendirmeden tayini yapılabilen fenitoin ilaç etken maddesine yönelik analitik yöntem geliştirilmiştir.

4.2 Fenitoinin MEBÇŞ-SFME Yöntemi ile Önderiştirilmesine Yönelik Optimizasyon Çalışmaları

MEBÇŞ-SFME yönteminin önemli parametrelerinin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu parametreler; ekstraksiyon çözücü türü ve hacmi, karıştırma süresi ve numune hacmidir. Bir parametrenin optimizasyonu gerçekleştirilirken optimize edilecek parametrenin değeri değiştirilip diğer parametreler sabit tutulmuştur. Optimizasyon çalışmalarında üç tekrarlı olarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

4.2.1 Ekstraksiyon Çözücü Türü Optimizasyonu

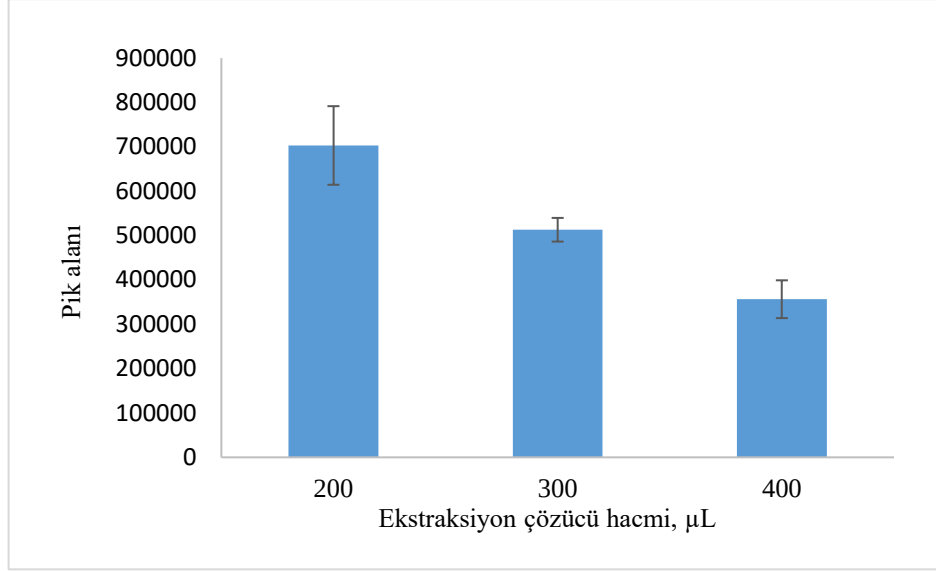
Uygun bir ekstraksiyon çözücü türünün seçilmesi SFE yöntemlerindeki en önemli optimizasyon adımıdır. Çünkü prosedürün genel verimliliği çözücünün analite olan afinitesine bağlıdır [141]. Bir ekstraksiyon çözücüsünün sahip olması gereken özelliklerden biri analiti içeren sulu numune ile karışmaması ve net ve belirgin bir faz ayrımı elde edilebilmesi için yoğunluğunun sudan önemli ölçüde farklı olmasıdır [141]. Bu gerekliliklere ek olarak, sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemleri, düşük hacimli organik çözücülerin kolayca toplanmasını sağlamak için dar numune kapları gerektirmektedir [141]. Bu çalışmada fazların ayrılması için konik tabanlı santrifüj tüpleri kullanıldığından, yalnızca 1,0 g/mL’den büyük yoğunluklara sahip çözücülerin ekstraksiyon verimliliği test edilmiştir. Bu çözücüler DCM, DCE ve CHL’dir. Kloroform için elde edilen ortalama pik alan değeri, Şekil 4.19’da gösterildiği gibi diklorometan ve DCE için elde edilen değerlerden sırasıyla 1,3 ve 1,1 kat daha fazla elde edilmiştir. Bu nedenle, optimum ekstraksiyon çözücüsü olarak kloroform seçilmiştir.



Şekil 4.19 Ekstraksiyon çözücü türü optimizasyonu

4.2.2 Ekstraksiyon Çözücü Hacmi Optimizasyonu

Geleneksel SSE ve SFME yöntemleri arasındaki en büyük fark ekstraksiyon çözücüsünün hacmidir [141]. Ekstraksiyon için kullanılan organik çözücüler, bu yöntem ile birlikte yeşil kimya ilkelerine uygun olarak düşük hacimlerde kullanılmaktadır [141]. Ekstraksiyon çözücülerinin düşük hacimli olması sayesinde SFME yöntemleriyle yüksek zenginleştirme faktörleri elde edilebilmektedir [141]. Bununla birlikte, yeterli miktarda analit organik faz içerisine toplanmayacağından ve ekstraksiyon sonrası elde edilen ekstraktda yüksek çözücü kaybı riski olacağından sonsuz küçük hacimler kullanılamaz [141]. Bu nedenle ekstraksiyon çözücüsü olarak seçilen kloroformun hacmi analitin verimli bir şekilde ekstraksiyonu ve yüksek bir zenginleştirme faktörü sağlamak açısından optimize edilmiştir. Test edilen kloroform hacimleri 200, 300, 400 μL olup, elde edilen pik alan değerleri grafiksel olarak Şekil 4.20’de verilmiştir. 200 μL için kaydedilen pik alan değeri, 300 μL ve 400 μL pik alan değerlerinin sırasıyla 1,3 ve 1,8 kat yüksek olduğu hesaplanmıştır. Bu nedenle 200 μL optimum ekstraksiyon çözücü hacmi olarak seçilmiştir. Artan hacimlerde gözlenen pik alanındaki azalma ise organik fazda bulunan analitin artan organik faz hacimleri ile seyrelmesinden kaynaklanmıştır.

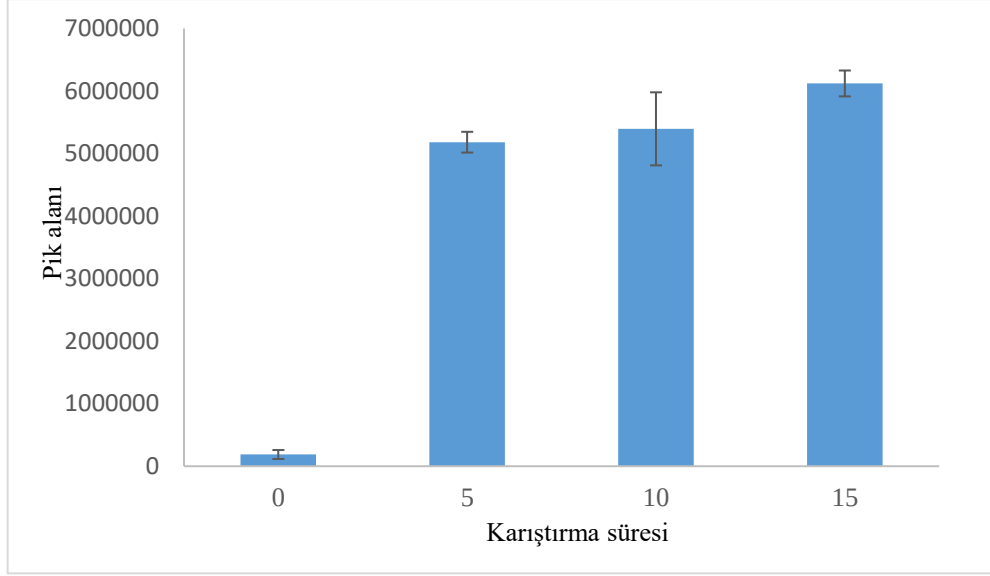


Şekil 4.20 Ekstraksiyon çözücü hacmi optimizasyonu

4.2.3 Karıştırma Süresi Optimizasyonu

Geleneksel SSE yönteminde, analitlerin sulu çözeltilerden organik ekstraksiyon çözücülerine kütle transferini artırmak için uzun karıştırma süreleri kullanılmaktadır [141]. Geliştirilen yeni mikroekstraksiyon yöntemlerinde dağıtıcı çözücülerin kullanılması, uzun karıştırma sürelerinin bu dezavantajının üstesinden gelmektedir [141]. Bu çalışmada ise dağıtıcı çözücüler yerine karıştırma işlemini çözücüsüz bir şekilde yapabilecek çift şırınga ve bir metal elek kullanılmıştır. Bu şırıngalar arasındaki metal elek içerisine nüfuz eden çözelti ekstraksiyon çözücüsünü verimli bir şekilde dağıtmaktadır. Ancak sulu çözeltinin şırıngalar arasında karıştırılma süresi de önemli bir parametredir.

Farklı karıştırma sürelerinin ekstraksiyon verimliliği üzerindeki etkisi, karıştırma yapılmamış duruma ek olarak 5, 10, 15 kez karıştırma işlemi test edilerek incelenmiş ve karıştırma yapılmamış çözeltilerin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Karıştırma sırasında 1 kez karıştırma olarak ifade edilen işlem birbirine elek ile bağlı iki şırınganın sağdan sola veya soldan sağa ileri geri hareketi yapmasıdır.

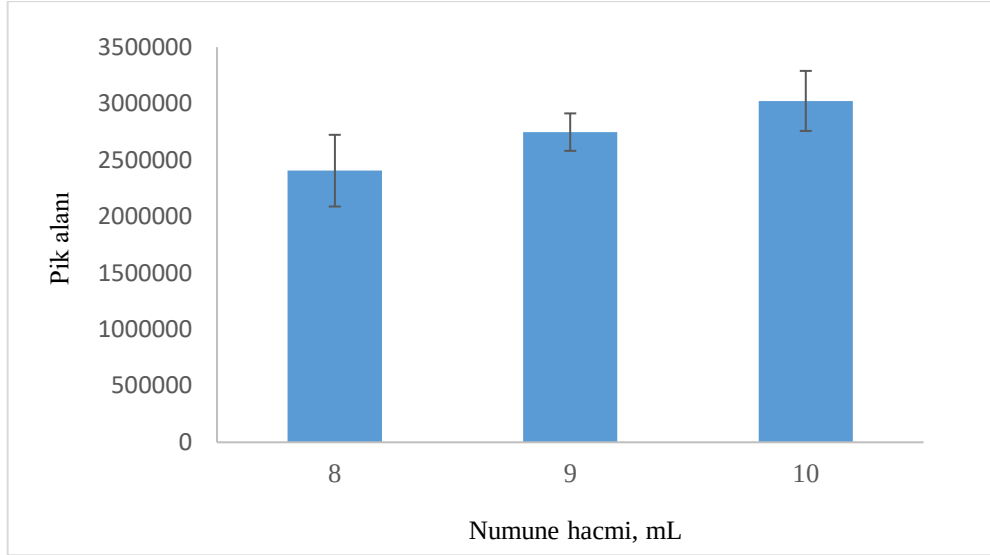


Şekil 4.21 Karıştırma süresi optimizasyonu

5 kez karıştırma için elde edilen pik alan değerleri, karıştırılmayan çözelti için elde edilen değerlerin yaklaşık 28 katı olarak bulunmuştur. Şekil 4.21'de gösterildiği gibi, pik alan değeri, 5 kez karıştırma ile 10 ve 15 kez karıştırma arasında kayda değer bir fark bulunmamaktadır. Bu sebeple, ekstraksiyon süresinin uzun olmaması ve uygulanabilirlik açısından 5 kez karıştırma optimum olarak seçilmiştir.

4.2.4 Numune Hacmi Optimizasyonu

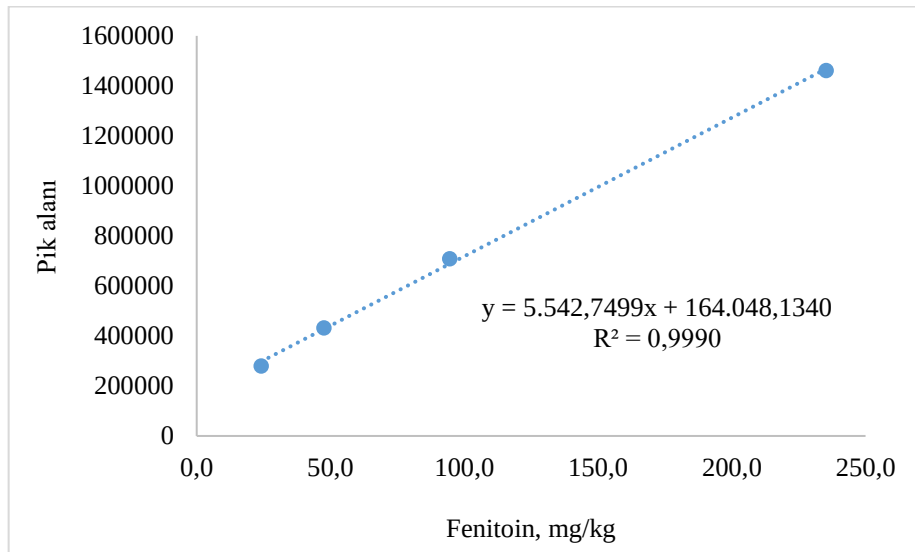
Numune hacmi eser seviyelerde bulunan analitlerin sulu çözletilerden ekstraksiyonunda oldukça kritik bir parametredir [154]. Başlangıç numune hacminin etkisini test etmek amacıyla 8,0, 9,0 ve 10 mL'lik çözeltilere geliştirilen MEBÇŞ-SFME yöntemi uygulanmıştır. Şekil 4.22'de görüldüğü üzere 10 mL'lik numune hacminden elde edilen pik alanları ortalaması diğer hacimlere göre yüksektir. Bu nedenle optimum numune hacmi değeri 10 mL olarak belirlenmiştir. MEBÇŞ-SFME yönteminde kullanılan şırıngaların maksimum hacim kapasitesinin 10 mL olması sebebiyle daha yüksek hacim değerleri denenmemiştir.



Şekil 4.22 Numune hacmi karşılaştırması

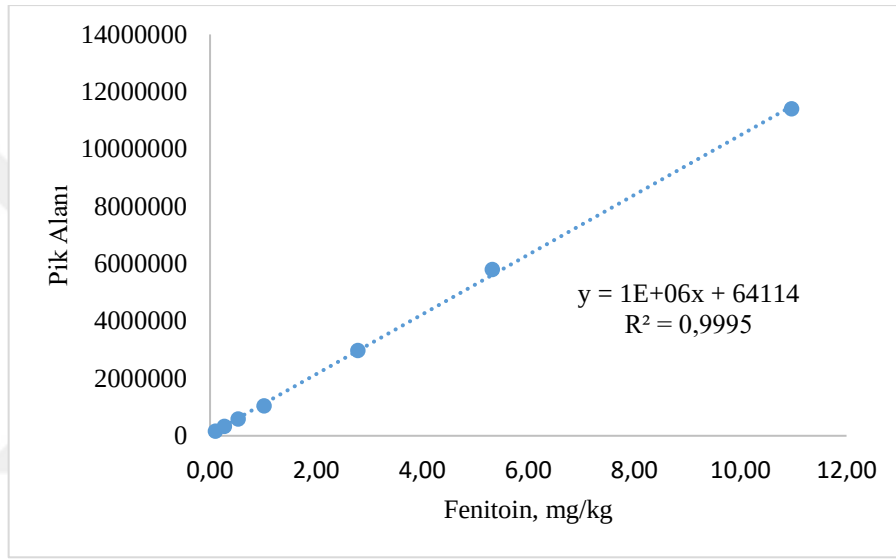
4.3 GC-MS ve MEBÇŞ-SFME-GC-MS Sistemlerinin Analitik Performans Çalışmaları

Optimum kromatografik şartlar altında fenitoinin GC-MS sistemindeki GL, TL ve doğrusal aralığı test edilmiştir. Bu amaçla 4,8-690,3 mg/kg aralığında fenitoin standard çözeltileri metanol içerisinde hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin analizi sonucu doğrusal aralık 24 mg/kg ile 235,3 mg/kg arasında elde edilmiştir. GL ve TL değerleri sırasıyla 8,5 ve 28,3 mg/kg olarak bulunmuştur. Elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 4.23’de verilmiştir.



Şekil 4.23 Fenitoin GC-MS kalibrasyon grafiği

Fenitoinin MEBÇŞ-SFME-GC-MS sistemindeki analitik performans değerlerini belirlemek amacıyla 0,05 mg/kg ile 20 mg/kg arasında fenitoin standard çözeltileri optimum MEBÇŞ-SFME koşulları altında ekstraksiyonları yapılmış ve GC-MS sistemine gönderilmiştir. GC-MS analizi sonucunda doğrusal aralık 0,10-10,96 mg/kg aralığında tespit edilmiştir. GL ve TL değerleri sırasıyla 0,045 mg/kg ve 0,151 mg/kg olarak bulunmuştur. Geleneksel GC-MS yöntemiyle karşılaştırıldığında yeni geliştirilen MEBÇŞ-SFME-GC-MS yöntemi fenitoinin GC-MS sistemindeki tayin edilebilme gücünde yaklaşık 188 katlık bir artış sağlamıştır. MEBÇŞ-SFME-GC-MS yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.24’de verilmiştir.



Şekil 4.24 Fenitoin MEBÇŞ-SFME kalibrasyon grafiği

Tablo 4.7’de GC-MS ve geliştirilen MEBÇŞ-SFME-GC-MS yöntemlerine ait sistem analitik performans parametreleri özetlenmiştir.

Tablo 4.7 GC-MS ve MEBÇŞ-SFME sistemlerinin karşılaştırılması

Validasyon parametreleri	GC-MS	MEBÇŞ-SFME
GL, mg/kg	8,5	0,045
TL, mg/kg	28,3	0,151
Doğrusal aralık, mg/kg	24-235,3 mg/kg	0,10-10,96 mg/kg

Tablo 4.7 GC-MS ve MEBÇŞ-SFME sistemlerinin karşılaştırılması (devamı)

Doğru denklemi, y=mx+n	y=5542,7x+164048	y=1042296,85x+64114,17
Korelasyon katsayısı, R²	0,9990	0,9995
Tayin gücünde iyileştirme katsayısı	-	187,7

4.4 MEBÇŞ-SFME Yöntemi İçin Geri Kazanım Çalışmaları

Geliştirilen yöntemin gerçek numunelere uygulanabilirliğini ve doğruluğunu test etmek amacıyla evsel atık su ve yapay idrar numunelerinde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu numunelerin tayin edilecek konsantrasyonda analiti içerip içermediğini belirlemek için numunelerin kör çözeltileri hazırlanıp MEBÇŞ-SFME-GC-MS sistemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, analiz edilen iki farklı evsel atık su ve yapay idrar numunelerinde fenitoin tespit edilememiştir. Bundan dolayı E1 ve E2 ile kodlanan evsel atık su örneklerine, ayrıca Y1 ve Y2 olarak kodlanan yapay idrar örneklerine son konsantrasyonu 0,25-5,0 mg/kg aralığında olacak şekilde beş farklı konsantrasyonda standart çözelti numunelere eklenmiştir. Optimum koşullar altında, geliştirilen MEBÇŞ-SFME yöntemi uygulanmış ve GC-MS sisteminde analizleri sonrası her bir numune için kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. 0,25 mg/kg ve 5,0 mg/kg eklenmiş numuneler için yüzde geri kazanım sonuçları varyasyon katsayılarıyla birlikte Tablo 4.8’de gösterilmiştir. Elde edilen geri kazanım sonuçları %100’e yakın olup geliştirilen analitik yöntemin seçili matrikslere uygulanabilir olduğunu kanıtlamıştır. Yapay idrar örneklerinden Y1’in pH değeri 5,35 ve Y2’ nin ise 6,9 olmasına karşılık, uygulanan matriks eşleştirme kalibrasyon stratejisinin pH değerinden etkilenmediği belirlenmiştir.

Tablo 4.8 Analitin çeşitli derişimlerde eklenmiş örnekler için geri kazanım değerleri

Örnek	Eklenen Konsantrasyon	% Geri Kazanım $\pm$ Varyasyon Katsayısı
Eysel Atık Su (E1)	0.26	108,6 $\pm$ 0,2
	0.50	95,6 $\pm$ 3,4
	1.02	98,3 $\pm$ 4,7
	2.51	98,7 $\pm$ 4,0
	5.01	100,4 $\pm$ 3,7
Eysel Atık Su (E2)	0.25	110,3 $\pm$ 5,4
	0.49	101,4 $\pm$ 4,4
	0.99	96,4 $\pm$ 1,4
	2.55	102,0 $\pm$ 3,5
	5.12	99,6 $\pm$ 2,7
Yapay İdrar (Y1)	0.26	105,0 $\pm$ 7,0
	0.49	102,1 $\pm$ 4,8
	1.06	91,7 $\pm$ 1,7
	2.33	99,3 $\pm$ 0,4
	5.09	100,0 $\pm$ 2,9
Yapay İdrar (Y2)	0.26	99,7 $\pm$ 2,7
	0.50	99,2 $\pm$ 6,7

Tablo 4.8 Analitin çeşitli derişimlerde eklenmiş örnekler için geri kazanım değerleri (devamı)

Yapay İdrar (Y2)	1.03	96,6 ± 4,7
	2.65	106,6 ± 2,2
	5.45	99,0 ± 2,3

Literatürde fenitoin tayininde kullanılan diğer yöntemler ile yeni geliştirilen MEBÇŞ-SFME yönteminin çeşitli parametreler ile karşılaştırılması Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9 MEBÇŞ-SFME yöntemi ile literatürdeki diğer yöntemlerin sistem analitik performanslarının karşılaştırılması

Yöntem	GL	TL	Doğrusal Aralık	%BSS	R²
GC-MS	8,5 mg/kg	28,3 mg/kg	24-235,3 mg/kg	11,3	0,9990
MEBÇŞ-SFME-GC-MS	0,045 mg/kg	0,151 mg/kg	0,10-10,96 mg/kg	9,4	0,9995
GS-MS [148]	15 ng/mL	50 ng/mL	50-1200 ng/mL	-	0,998
LC-MS/MS [148]	<1,0 ng/mL	10 ng/mL	10-2000 ng/mL	-	0,996
YOKDME-HPLC-UV [150]	0,3 µg/L		1,0-200 µg/L	4.6	0,999

Tablo 4.9’da verilen fenitoinin eser seviyelerde tayini için kullanılan GC-MS [148], LC-MS/MS [148] ve yüzen organik katı damla mikroekstraksiyon-yüksek performanslı sıvı kromatografisi ultraviyole dedektör (YOKDME-HPLC-UV) [150] yöntemleri literatüre sunulmuştur. Geliştirilen MEBÇŞ-SFME-GC-MS yöntemi diğer yöntemlerle yarışan GL ve TL değerlerine sahiptir. Bunun yanı sıra, geliştirilen mikroekstraksiyon yöntemi, daha düşük GL ve TL değerleri elde etmek için GC-MS/MS ve LC-MS/MS sistemleri gibi duyarlılığı daha yüksek cihazlarla birleştirilebilir. Ayrıca geliştirilen sistem az miktarda çözücü kullanımı gerektirmesi nedeniyle çevre dostu bir yöntem olmaktadır. Kullanılan şırınga ve elek içeren system basit, ucuz ve ekstraksiyon verimliliği oldukça yüksek bir yöntemdir. Bu nedenle geliştirilen MEBÇŞ-SFME yöntemi diğer ilaç etken maddelerin de ekstraksiyonu amacıyla kullanılabilecek bir yöntem olabileceği öngörülmektedir.

Bu tez kapsamında evsel atık su ve yapay idrar numunelerinde eser seviyelerde bulunan fenitoinin tayini için MEBÇŞ-SFME-GC-MS yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin ekstraksiyon etkinliğini ve analitin sinyal/gürültü oranını artırmak için ekstraksiyon çözücü türü/hacmi, karıştırma süresi ve numune hacmi gibi tüm değişken parametreler sistematik olarak optimize edilmiştir. Optimum deneysel koşullar altında, yöntemin analitik performansı değerlendirilmiştir. Fenitoin için GL ve TL değerleri sırasıyla 0,045 ve 0,151 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem fenitoinin GC-MS sistemindeki tayin gücünde yaklaşık 188 kat iyileşme sağlamıştır. Geliştirilen yöntemin uygulanabilirliği ve doğruluğu iki farklı evsel atık su örneği ve yapay idrar numuneleri üzerinde geri kazanım çalışmaları yapılarak kanıtlanmıştır. %GK sonuçları evsel atık su numuneleri için %96-110 ve yapay idrar numuneleri için %92-107 aralığında hesaplanmıştır. Elde edilen geri kazanım sonuçlarının %100'e yakın olması, geliştirilen yöntemin bu matrikslere yüksek doğrulukta uygulanabilir olduğunu göstermiştir. Geliştirilen yöntem az miktarda organik çözücü kullanımıyla çevreye duyarlı, az sayıda işlem basamakları ile uygulaması kolay ve sunduğu yüksek zenginleştirme katsayısı ile oldukça avantaj sağlamaktadır. Literatürde, fenitoin tayini için MEBÇŞ-SFME-GC-MS sisteminin kullanıldığı herhangi bir çalışma bildirilmemiştir.

- [1] E. H. Grover, Y. Nazzal, and L. J. Hirsch, "Treatment of convulsive status epilepticus," *Current Treatment Options in Neurology*, vol. 18, no. 3, 2016.
- [2] M. F. Wu and W. H. Lim, "Phenytoin: a guide to therapeutic drug monitoring," *Proceedings of Singapore Healthcare*, vol. 22, no. 3, pp. 198–202, 2013.
- [3] A. Tobler, R. Hosli, S. Muhlebach, and A. Huber, "Free phenytoin assessment in patients: measured versus calculated blood serum levels," *International Journal of Clinical Pharmacy*, vol. 38, no. 2, pp. 303–309, 2016.
- [4] R. Hosli, A. Tobler, S. Konig and S. Muhlebach, "A quantitative phenytoin GC-MS method and its validation for samples from human ex situ brain microdialysis, blood and saliva using solid-phase extraction," *Journal of Analytical Toxicology*, 37(2), 102–109, 2013.
- [5] M. Burt, D.C. Anderson, J. Kloss and F.S. Apple, "Evidence-based implementation of free phenytoin therapeutic drug monitoring," *Clinical Chemistry*, 46, 1132–1135, 2000.
- [6] M.H. Nelson, A. K. Birnbaum, P. J. Nyhus and R.P. Remmel, "A capillary GC- MS method for analysis of phenytoin and [¹³C₃]-phenytoin from plasma obtained from pulse dose pharmacokinetic studies," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17, 1311–1323, 1998.
- [7] V. Kiencke, H. A. Streichert, A. Muller and S. I. Bergmann, "Quantitative determination of valproic acid in postmortem blood samples-evidence of strong matrix dependency and instability," *International Journal of Legal Medicine*, 127, 1101–1107, 2013.
- [8] J. Tonic-Ribarska, A. Haxhiu, Z. Sterjev, G. Kiteva, L. Suturkova and S. Trajkovic-Jolevska, "Development and validation of a bioanalytical LC-UV method with solid-phase extraction for determination of valproic acid in saliva," *Acta Pharm*, 62, 211–220, 2012.
- [9] N. V. S. Ramakrishna, K. N. Vishwottam, S. Manoj, M. Koteshwara, M. Santosh, J. Chidambara and B. R. Kumar, "Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry method for the quantification of valproic acid in human plasma," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 1970–1978, 2005.
- [10] National Cancer Institue, "NCI Dictionary of Cancer Terms," <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/drug>, (accessed March, 2023).
- [11] C. G. Smith, and J. T. O'Donnell, "The Process of New Drug Discovery and Development," 2nd ed., Informa Healthcare, 391-397, 2006.
- [12] S. Bora, S. N. Yeni, ve C. Gürses, "Epilepsi," s: 707-734, 1. Basım, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008.
- [13] U. R. Acharya, S. L. Oh, Y. Hagiwara, J. H. Tan, and H. Adeli, "Deep convolutional neural network for the automated detection and diagnosis of seizure using EEG signals," *Computers in biology and medicine*, 100, 270–278, 2018.

- [14] R. S. Fisher, C. Acevedo, A. Arzimanoglou, A. Bogacz, J. H. Cross, C. E. Elger, J. Jr Engel, L. Forsgren, J. A. French, M. Glynn, D. C. Hesdorffer, B. I. Lee, G. W. Mathern, S. L. Moshé, E. Perucca, I. E. Scheffer, T. Tomson, M. Watanabe, and S. Wiebe, “ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy,” *Epilepsia*, 55(4), 475–482, 2014.
- [15] W. A. Hauser, S. S. Rich, J. R. J. Lee, J. F. Annegers, and V. E. Anderson, “Risk of recurrent seizures after two unprovoked seizures,” *N. Engl. J. Med.* 338, 429–434, 1998.
- [16] W. A. Hauser and E. Beghi, “First seizure definitions and worldwide incidence and mortality,” *Epilepsia*, 49, 8–12, 2008.
- [17] GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, “Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study,” *Lancet*, 1545-1602, 2016.
- [18] A. K. Ngugi, C. Bottomley, I. Kleinschmidt, J. W. Sander and C. R. Newton, “Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach,” *Epilepsia*, 51, 883–890, 2010.
- [19] E. Öge ve B. Baykan, “Nöroloji,” Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2011.
- [20] “Focal Seizures,” <https://www.defeatingepilepsy.org/understanding-epilepsy/focal-seizure/>, (accessed March, 2023).
- [21] G. Akdağ, D. İ. Algin ve O. O. Erdinç, “Epilepsi,” *Osmangazi Journal of Medicine*, 38, 35-41, 2016.
- [22] S. Wiebe, W. T. Blume, J. P. Girvin and M. A. Eliasziw, “Randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy,” *N. Engl. J. Med.* 345, 311–318, 2001.
- [23] O. Devinsky, T. Spruill, D. Thurman ve D. Friedman, “Recognizing and preventing epilepsy-related mortality,” *Neurology*, 86, 779–786, 2016.
- [24]. B. W. Abou-Khalil, “Antiepileptic Drugs,” *Continuum (Minneapolis)*, 22,132–156, 2016.
- [25] G. Burckart and S. Ternullo, “Management of anticonvulsant overdoses,” *Clin Toxicol Consult*, 2; 88–99, 1980.
- [26] J. R. Larsen, and L. S. Larsen, “Clinical features and management of poisoning due to phenytoin,” *Med Toxicol Adverse Drug Exp*, 4:229–245, 1989.
- [27] H. H. Merritt, and T. J. Putnam, “Sodium diphenylhydantoinate in the treatment of convulsive disorders,” *J. Am. Med. Assoc.* 251 (8), 1062–1067, 1984.
- [28] P. Thangaraju, T. Tamilselvan, S. Venkatesan, T. Eswaran, H. Singh, V. C. Giri and M. K. Showkath Ali, “Topical phenytoin for managing various ulcers: A metaanalysis,” *Sudan Medical Monitor*, 10 (2), 63–67, 2015.
- [29] R. Raftopoulos, S. J. Hickman, A. Toosy, B. Sharrack, S. Mallik, D. Paling, D. R. Altmann, M. C. Yiannakas, P. Malladi, R. Sheridan, P. G. Sarrigiannis, N. Hoggard, M. Koltzenburg, C. A. Gandini Wheeler-Kingshott, K. Schmierer, G. Giovannoni, D. H. Miller, and R. Kapoor, “Phenytoin for neuroprotection in patients with acute optic neuritis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial.” *Lancet Neurol*, 15 (3), 259–269, 2016.

- [30] D. R. Lide and G. W. A. Milne “Handbook of Data on Organic Compounds,” Volume I., 3rd ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, p. V4: 3216, 1994.
- [31] S. H. Yalkowsky, and Y. He, “Handbook of aqueous solubility data: an extensive compilation of aqueous solubility data for organic compounds extracted from the aquasol database,” CRC Press LLC, Boca Raton, FL, pp. 998, 2003.
- [32] The Merck Index, “An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals,” thirteenth ed. Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, pp. 1312, 2001.
- [33] IARC, “Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans,” World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, vol. 66. Geneva, pp. 175, 1972.
- [34] C. Uzaras, “Radyoaktif işaretli fenitoinin görüntüleme ve tedavide kullanılabilirliğinin hücre düzeyinde incelenmesi,” Celal Bayar Üniversitesi, 53p, 2014.
- [35] A. Aldaz, R. Ferriols, D. Aumente, M. V. Calvo, M. R. Farre, B. García, R. Marques, P. Mas, B. Porta, M. Outeda, y D. Soy, “Monitorización farmacocinética de antiepilépticos,” *Farmacia Hospitalaria*, 35(6), 326–339, 2011.
- [36] J. M. K. Hesselink, “Phenytoin: a step by step insight into its multiple mechanisms of action—80 years of mechanistic studies in neuropharmacology.” *J. Neurol.*, 264 (9), 2043–2047, 2017.
- [37] B. C. Hains, C. Y. Saab, A. C. Lo, and S. G. Waxman, “Sodium channel blockade with phenytoin protects spinal cord axons, enhances axonal conduction, and improves functional motor recovery after contusion” *SCI. Exp. Neurol.* 188 (2), 365–377, 2004.
- [38] J. M. Keppel Hesselink, and D. J. Kopsky, “Phenytoin: 80 years young, from epilepsy to breast cancer, a remarkable molecule with multiple modes of action,” *J. Neurol.*, 264, 1617–1621, 2017a.
- [39] J. M. Keppel Hesselink, and D. J. Kopsky, “Phenytoin: neuroprotection or neurotoxicity?” *Neurol. Sci.*, 38, 1137–1141, 2017b.
- [40] L. J. Martin, R. Chao, B. Corry, “Molecular dynamics simulation of the partitioning of benzocaine and phenytoin into a lipid bilayer,” *Biophys. Chem.*, 185, 98–107, 2014.
- [41] K. D. Taing, T. J. Brien, D. A. Williams, and C. R. French, “Anti-epileptic drug combination efficacy in an in vitro seizure model- phenytoin and valproate, lamotrigine and valproate,” *PloS One*, 12 (1), 2017.
- [42] M. Y. Chou, C. Y. Lee, H. H. Liou, and C. Y. Pan, “Phenytoin attenuates the hyper-exciting neurotransmission in cultured embryonic cortical neurons,” *Neuropharmacology*, 83, 54–61;3, 2014.
- [43] P. Granger, B. Biton, and C. Faure, “Modulation of the gammaaminobutyric acid type A receptor by the antiepileptic drugs carbamazepine and phenytoin,” *Mol. Pharmacol.*, 47 (6), 1189–1196, 1995.
- [44] Y. Urashima, K. Urashima, M. Ohnishi, K. Matsushita, K. Suzuki, K. Kurachi, M. Nishihara, T. Katsumata, M. Myotoku, K. Ikeda, and Y. Hirotsu, “Interaction between phenytoin and enteral nutrients and its influence on gastrointestinal absorption,” *Pharmazie*, 74 (9), 559–562, 2019.

- [45] D. M. Treiman, and D. M. Woodbury, "Phenytoin: absorption, distribution, and excretion." In: Levy, R.H., Mattson, R.H., Meldrum, B.S. (Eds.), *Antiepileptic Drugs*, fourthed. Raven Press, New York, pp. 301–314, 1995
- [46] M. L. Mirkin, "Diphenylhydantoin: placental transport, fetal localisation, neonatal metabolism, and possible teratogenic effects," *J. Pediatr.*, 78 (2), 329–33, 1971.
- [47] H. Nau, W. Kuhn, H. J. Egger, D. Rating, H. Helge, "Anticonvulsants during pregnancy and lactation. Transplacental, maternal and neonatal pharmacokinetics," *Clin. Pharmacokinet.*, 7 (6), 508–543, 1982.
- [48] L. Cuttle, A. J. Munns, N. A. Hogg, J. R. Scott, W. D. Hooper, R. G. Dickinson, and E. M. Gillam, "Phenytoin metabolism by human cytochrome P450: involvement of P450 3A and 2C forms in secondary metabolism and drug-protein adduct formation," *Drug Metab. Dispos.*, 28 (8), 945–950, 2000.
- [49] T. R. Browne, and B. LeDuc, "Phenytoin: chemistry and biotransformation," In: Levy, R.H., Mattson, R.H., Meldrum, B.S. (Eds.), *Antiepileptic Drugs*, fourth ed. Raven Press, New York, pp. 283–300, 1995.
- [50] J. Patocka, Q. Wu, E. Nepovimova, and K. Kuca, "Phenytoin- An anti- seizure drug: Overview of its chemistry, pharmacology and toxicology," *Food Chem Toxicol.*, 2020.
- [51] M. C. Salinsky, B. S. Oken, and L. M. Binder, "Assessment of drowsiness in epilepsy patients receiving chronic antiepileptic drug therapy," *Epilepsia*, 37 (2), 181–187, 1996.
- [52] A. Siniscalchi, L. Gallelli, E. Russo, and G. De Sarro, "A review on antiepileptic drugs-dependent fatigue: pathophysiological mechanisms and incidence," *Eur. J. Pharmacol.*, 718 (1–3), 10–16, 2013.
- [53] M. Iivanainen, and H. Savolainen, "Side effects of phenobarbital and phenytoin during long-term treatment of epilepsy," *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 97, 49–67, 1983.
- [54] J. H. Stephens, and J. W. Shaffer, "A controlled study of the effects of diphenylhydantoin on anxiety, irritability, and anger in neurotic outpatients," *Psychopharmacologia*, 17(2), 169–181, 1970.
- [55] M. E. Drake, "Restless legs with antiepileptic drug therapy," *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 90 (2), 151–154, 1988.
- [56] P. R. Bittencourt, M. A. Gresty, and A. Richens, "Quantitative assessment of smoothpursuit eye movements in healthy and epileptic subjects," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 43 (12), 1119–1124, 1980.
- [57] Y. Matsue, S. Wagatsuma, K. Ito, and T. Okuma, "Smooth pursuit eye movements in epileptics under antiepileptic medication," *Tohoku J. Exp. Med.*, 134 (4), 341–349, 1981.
- [58] R. Arya, and S. Gulati, "Phenytoin-induced gingival overgrowth," *Acta Neurol. Scand.*, 125 (3), 149–155., 2012.
- [59] A. Y. Onaolapo, A. A. Adebayo, and O. J. Onaolapo, "Oral phenytoin protects against experimental cyclophosphamide-chemotherapy induced hairloss," *Pathophysiology*, 25 (1), 31–39, 2018.

- [60] T. J. Lee, C. N. Carney, J. L. Lapis, T. Higgins, and H. J. Fallon, "Diphenylhydantoin-induced hepatic necrosis. A case study," *Gastroenterology*, 70 (3), 422–424, 1976.
- [61] B. Curry, L. Mican, and T. L. Smith, "Phenytoin-induced chronic liver enzyme elevation and hepatic fibrosis: a case report," *Ment Health Clin.*, 8 (4), 184–187, 2018.
- [62] M. Sugimoto, Y. Wakabayashi, Y. Shiokawa, and F. Takaku, "Bone heme synthesis suppression by diphenylhydantoin in vitro in pure red cell aplasia," *Rinsho Ketsueki*, 23 (9), 1446–1452, 1982.
- [63] X. Wu, W. Liu, and W. Zhou, "Association of CYP2C9*3 with phenytoin-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: a systematic review and meta-analysis," *J. Clin. Pharm. Therapeut.*, 43 (3), 408–413, 2018.
- [64] M. Borasi, R.P. Verma, and S. K. Gupta, "Psychosis as harbinger of phenytoin toxicity," *Toxicol. Int.*, 22 (1), 160–161, 2015.
- [65] B. Chen, H. Choi, L. J. Hirsch, A. Katz, A. Legge, R. Buchsbaum, and K. Detyniecki, "Psychiatric and behavioral side effects of antiepileptic drugs in adults with epilepsy," *Epilepsy Behav.* 76, 24–31, 2017.
- [66] S. Praveen-kumar, and M. Desai, "Ocular motor abnormalities in a patient with phenytoin toxicity—case report and minireview," *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 127, 116–117, 2014.
- [67] H. C. Chua, N. Venketasubramanian, H. Tjia, and S. P. Chan, "Elimination of phenytoin in toxic overdose," *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 102 (1), 6–8, 2000.
- [68] E. Martin, J. G. Gambertoglio, D. S. Adler, T. N. Tozer, L. A. Roman, and H. Grausz, "Removal of phenytoin by hemodialysis in uremic patients," *J. Am. Med. Assoc.*, 238 (16), 1750–1753, 1977.
- [69] P. D. Shanmugarajah, N. Hoggard, D. P. Aeschlimann, P. C. Aeschlimann, G. J. Dennis, S. J. Howell, M. Reuber, R. A. Grunewald, and M. Hadjivassiliou, "Phenytoin-related ataxia in patients with epilepsy: clinical and radiological characteristics," 56, 26–30, 2018.
- [70] C. K. Kang, M. K. Kim, M. J. Kim, K. I. Jun, K. W. Kim, S. H. Park, and K. H. Song, "Acute respiratory failure caused by phenytoin overdose," *The Korean journal of internal medicine*, 28(6), 736–738, 2013.
- [71] G. Srinivasan, M. Wyawahare, P. G. Mathen, and D. K. Subrahmanyam, "Life-threatening bradyarrhythmia with oral phenytoin overdose," *J. Pharmacol. Pharmacother.* 6(3), 179–181, 2015.
- [72] S. Craig, "Phenytoin poisoning," *Neurocritical Care*, 3(2), 161–170, 2005.
- [73] S. H. Imam, K. Landry, V. Kaul, H. Gambhir, D. John, and B. Kloss, "Free phenytoin toxicity," *Am. J. Emerg. Med.* 32 (10) 1301, 2014.
- [74] J.J. Jang, M. Takahashi, F. Furukawa, K. Toyoda, R. Hasegawa, H. Sato, and Y. Hayashi, "Long-term in vivo carcinogenicity study of phenytoin (5,5-diphenylhydantoin) in F344 rats," *Food Chem. Toxicol.*, 25 (9), 697–702, 1987.
- [75] T. Maeda, N. Sano, K. Toge, M. Shibata, K. Izumi, and H. Otsuka, "Lack of carcinogenicity of phenytoin in (C57BL/6 x C3H) F1 mice," *J. Toxicol. Environ. Health*, 24 (1) 111–119, 1988.

- [76] R. S. Chhabra, J. R. Bucher, J. K. Haseman, M. R. Elwell, P. J. Kurtz, and B. D. Carlton, "Comparative carcinogenicity of 5,5-diphenylhydantoin with or 81 without perinatal exposure in rats and mice," *Fund. Appl. Toxicol.*, 21 (2), 174–186 Erratum in: *Fundam Appl Toxicol.*, 1994; 22(1): 159, 1993.
- [77] M. A. Spielman, A. O. Geiszler, and W. J. Close, "Anticonvulsant drugs. II, Some acetylureas," *J. Am. Chem. Soc.*, 70: 4189-4191, 1948.
- [78] G. M. Everett, and R. K. Richards, "Pharmacological studies of phenacetylurea (phenurone), anticolvulsant drug," *J. Pharm. Exper. Therap.*, 106:303-313, 1952.
- [79] R. W. Levy, D. J. Simon, and S. Aronson, "Fatal hepatorenal syndrome associated with Phenurone therapy," *New Eng. J. Med.*, 242: 933-936, 1950.
- [80] J. A. Jonsson, "Chromatographic theory and basic principles" vol. 38: CRC Press, 1987.
- [81] C. Bryant, A. Adam, D. Tayior, and R. Rowe, "A review of expert systems for chromatography," *Analytica Chimica Acta*, vol. 297, pp. 317-347, 1994.
- [82] L. R. Snyder, "Role of the solvent in liquid-solid chromatography. Review," *Analytical Chemistry*, vol. 46, pp. 1384-1393, 1974.
- [83] D. B. Hibbert, "Experimental design in chromatography: a tutorial review," *Journal of chromatography B*, vol. 910, pp. 2-13, 2012.
- [84] V. Ivanov, O. Monogaro, and K. Oskolok, "Capabilities and prospects of the development of a chromatography method in analytical chemistry," *Journal of analytical chemistry*, vol. 70, pp. 1165-1178, 2015.
- [85] J. A. Jonsson, "Chromatographic theory and basic principles" vol. 38: CRC Press, 1987.
- [86] L. S. Ettre and K. I. Sakodinskii, "M. S. Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899–1903)," *Chromatographia*, vol. 35, no. 3–4, pp. 223–231, Feb. 1993.
- [87] H. Gika, G. Kaklamanos, P. Manesiotis, and G. Theodoridis, "Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography," *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, pp. 93–99, Jan. 2016.
- [88] P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, M. Miró, A. S. Rathore, and S. Joshi, "Liquid Chromatography | Historical Development," *Encyclopedia of Analytical Science*. Academic Press, pp. 86–92, Jan. 2019.
- [89] A. T. James and A. J. P. Martin, "Gas-liquid partition chromatography; the 108 separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid.," *Biochem. J.*, vol. 50, no. 5, pp. 679–690, Mar. 1952.
- [90] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, "Principles of instrumental analysis: Cengage learning," 2017.
- [91] S. Bakırdere, "SARS-CoV-2 (COVID-19) Tedavisinde Kullanılan Klorokin ve Hidroksiklorokin Kimyasallarının Kan, İdrar ve Tükürük Örneklerinde Yüksek Doğruluk ve Duyarlılıkta Hızlı Tayinlerine Yönelik İzotop Seyreltme Esaslı Analitik Yöntem Geliştirilmesi," Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB), Proje Kodu: 2020CV01, Proje No: 8946, 2021.

- [92] Shimadzu, "What is Gas Chromatography | Shimadzu," 2021. <https://www.ssi.shimadzu.com/products/gaschromatography/fundamental-guide-to-gas-chromatography/what-is-gaschromatography.html> (accessed May 09, 2021).
- [93] H. M. McNair, J. M. Miller, and N. H. Snow, "Introduction, in Basic Gas Chromatography," Wiley, pp. 1–14, 2019.
- [94] E. S. Koçoğlu, "Sertralinin GC-MS Sisteminde Düşük Seviyelerde Tayinine Yönelik Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Yapay Mide Ortamındaki Kararlılığının Tespit Edilmesi," vol. Yüksek Lisans Tezi: Yıldız Teknik Üniversitesi, 2016.
- [95] R. P. Adams and O. D. Sparkman, "Review of Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry," J Am Soc Mass Spectrom, vol. 18, pp. 803-806, 2007.
- [96] F. W. Karasek and R. E. Clement, "Basic gas chromatography-mass spectrometry: principles and techniques," Elsevier, 2012.
- [97] L. Tutanç, "Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile Eroin, Kokain ve Amfetamin Grubu Maddelerin Birlikte Analizi İçin Yöntem Geliştirilmesi," Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, 2009.
- [98] R. L. Grob and E. F. Barry, "Modern practice of gas chromatography," John Wiley & Sons, 2004.
- [99] J. E. Lovelock, "A sensitive detector for gas chromatography,; Journal of Chromatography A, vol. 1, pp. 35-46, 1958.
- [100] J. G. Sevcik, "Detectors in gas chromatography" Elsevier, vol. 4, 2011.
- [101] C. Bryant, A. Adam, D. Taylor, and R. Rowe, "A review of expert systems for chromatography," Analytica Chimica Acta, vol. 297, pp. 317-347, 1994.
- [102] W. W. Christie, "Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids," Lipids, vol. 33, pp. 343-353, 1998.
- [103] U. Balçık, "Azo boyar maddelerin dağıtıcı sıvı sıvı mikroekstraksiyon sonrası gaz kromatografi kütle spektrometresi ile eser seviyelerde tayinleri," Yıldız Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 2019.
- [104] E. Stashenko, and J. R. Martínez, "Gas chromatography-mass spectrometry," Advances in Gas Chromatography, 1-38, 2014.
- [105] E. Stauffer, J. A. Dolan, and R. Newman, "Other Techniques of Analysis and the Future of Fire Debris Analysis," Fire Debris Analysis, Burlington, Academic Press, 495-527, 2008.
- [106] F. A. Mellon, "Mass Spectrometry- Principles and Instrumentation," Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), B. Caballero, (ed.), Oxford, Academic Press, 3739-3749, 2003.
- [107] D. S. Chormey and S. Bakırdere, "Chapter Seven- Principles and Recent Advancements in Microextraction Techniques," in Fundamentals of Quorum Sensing, Analytical Methods and Applications in Membrane Bioreactors, vol. 81, D. S. Chormey, S. Bakırdere, N. B. Turan, and G. Ö. Engin, Eds. Elsevier, pp. 257–294, 2018.

- [108] M. J. M. Wells, "Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids," in *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, pp. 37–138, 2003.
- [109] N. Lorenzo-Parodi, W. Kaziur, N. Stojanović, M. A. Jochmann, and T. C. Schmidt, "Solventless microextraction techniques for water analysis," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 113. Elsevier B.V., pp. 321–331, Apr. 01, 2019.
- [110] C. Dong, Y. Mei, and L. Chen, "Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in food dressing by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1117, no. 1, pp. 109–114, Jun. 2006.
- [111] C. Karadaş, ve D. Kara, "Dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for preconcentration and determination of trace amounts of copper by flame atomic absorption spectrometry," *Food Chemistry*, 220: 242-248, 2017.
- [112] C. Poole, Z. Mester, M. Miró, S. Pedersen-Bjergaard, and J. Pawliszyn, "Extraction for analytical scale sample preparation (IUPAC Technical Report)," *Pure and Applied Chemistry*, 88: 649-687, 2016.
- [113] F. Durmaz, "Akış enjeksiyon-katı faz ekstraksiyon sistemi ile bazı metal iyonlarının tayin edilmesi," Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
- [114] E. M. Thurman and M. S. Mills, "Solid-phase extraction: principles and practice," Wiley vol. 16, New York, 1998.
- [115] A. Żwir-Ferenc, ve M. Biziuk, "Solid Phase Extraction Technique-Trends, Opportunities and Applications," *Polish Journal of Environmental Studies*, 15: 677-690, 2006.
- [116] V. Camel, "Solid phase extraction of trace element," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58: 1177-1233, 2003.
- [117] J. R. Dean, "Extraction techniques in analytical sciences" John Wiley & Sons, vol. 34, 2010.
- [118] M. Moors, D. Massart, and R. McDowall, "Analyte isolation by solid phase extraction (SPE) on silica-bonded phases: classification and recommended practices (Technical Report)," *Pure and Applied Chemistry*, 66: 277-304, 1994.
- [119] D. Barcelo, "Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: techniques, applications and quality assurance," Elsevier, 2000.
- [120] M. H. Gao, N. Y. Gao, H. H. Xie, N. An, Y. Deng, and W. L. Rong, "Quantitative analysis of trace levels of β -ionone in water by liquid-liquid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry (LLE-GC-MS)," *Journal of Central South University*, 22: 472-477, 2015.
- [121] Wells, M.J., "Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids," *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, 162: 37-138, 2003.
- [122] Y. Yamini, M. Rezaee, A. Khanchi, M. Faraji, and A. Saleh, "Dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop followed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry as a fast technique for

- the simultaneous determination of heavy metals,” *Journal of Chromatography A*, 1217: 2358-2364, 2010
- [123] H. Kataoka, H. L. Lord, and J. Pawliszyn, “Applications of solid-phase microextraction in food analysis,” *Journal of Chromatography A*, 880: 35-62, 2000.
- [124] S. Armenta, S. Garrigues, and M. De la Guardia, “Green analytical chemistry,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27: 497-511, 2008.
- [125] Ö. Kenanoğlu, “Alevli atomik absorpsiyon spektrometresi kullanılarak su örneklerinde eser miktardaki Hg(ii) iyonlarının tayini için katılaştırılmış yüzen organik damla ile ultrason-destekli emülsifikasyon mikroekstraksiyonunun uygulanması,” Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 2014.
- [126] H. Kara, “Farklı hasat dönemlerinde ve günün belli saatlerinde toplanan zeytin çeşitlerinden elde edilen yağların uçucu aroma bileşenleri değişiminin araştırılması,” Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Doktora Tezi. vol. 218, 2011.
- [127] E. Alver, A. Demirci, and M. Özçimder, “Microextraction methods,” *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, vol. 30, pp. 75-90, 2012.
- [128] K. Pyrzynska, “The use of novel materials as solid-phase extractors for chromatographic analysis,” *Advances in chromatography*, vol. 49, pp. 365-399, 2011.
- [129] L. Xu, C. Basheer, and H. K. Lee, “Developments in single-drop microextraction,” *Journal of Chromatography A*, 1152: 184-192, 2007.
- [130] M. A. Jeannot, and F. F. Cantwell, “Solvent Microextraction into a Single Drop,” *Analytical chemistry*, 68: 2236-2240, 1996.
- [131] A. Jain ve and K. K. Verma, “Recent advances in applications of single- drop microextraction: a review,” *Analytica Chimica Acta*, 706: 37-65, 2011.
- [132] P. Biparva, and A. A. Matin, “Microextraction Techniques as a Sample Preparation Step for Metal Analysis;, Atomic Absorption Spectroscopy,” 61-88, 2012.
- [133] M. R. K. Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati, and J. Å. Jönsson, “A new liquid- phase microextraction method based on solidification of floating organic drop,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 585, pp. 286-293, 2007.
- [134] M. I. Leong and S. D. Huang, “Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1211, pp. 8-12, 2008.
- [135] X. Wang, Y. Wang, X. Zou, and Y. Cao, “Improved dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplet method with a binary mixed solvent applied for determination of nicotine and cotinine in urine,” *Analytical Methods*, vol. 6, pp. 2384-2389, 2014.
- [136] D. Han and K. H. Row, “Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples,” *Microchimica Acta*, vol. 176, pp. 1-22, 2012.

- [137] M. Rezaee, Y. Assadi, M. R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, and S. Berijani, "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction," *Journal of Chromatography A*, 1116: 1-9, 2006.
- [138] A. Sarafraz-Yazdi, and A. Amiri, "Liquid-phase microextraction", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29:1-14, 2010.
- [139] D. Afzali, A. Ghazizadeh, and H. Salari, "Ion pair-dispersive liquid-liquid microextraction of trace amount of rhodium ion in water and road dust samples prior to flame atomic absorption spectrometry determination," *Química Nova*, 34: 1124-1128, 2011.
- [140] S. Yousefi, F. Shemirani, and M. Jamali, "Determination of antimony (III) and total antimony in aqueous samples by electrothermal atomic absorption spectrometry after dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME)," *Analytical Letters*, 43: 2563-2571, 2010
- [141] R. Özcan, B. Cesur, E. Tezgit, T. Unutkan Gösterişli, ve S. Bakırdere, "Determination of pyridaphenthion in soybean sprout samples by gas chromatography mass spectrometry with matrix matching calibration strategy after metal sieve linked double syringe based liquid-phase microextraction," *Food Chemistry*, Volume 342, 2021.
- [142] T. U. Gösterişli, İ. Z. Kublay, S. Oflu, Y. Kılınç, E. S. Koçoğlu, B. T. Zaman, S. Keyf, and S. Bakırdere, "Development of a metal sieve-linked double syringe liquid phase microextraction method for the determination of copper in olive leaf extract samples by flame atomic absorption spectrometry," *Food Chemistry*, Volume 377, 2022.
- [143] T. U. Gösterişli, B. Cesur, E. Tezgit, E. Gülhan Bakırdere, S. Keyf and S. Bakırdere, "Determination of Palladium in Precious Metal Waste by Sieve Conducted Two Syringes Pressurized Liquid Phase Microextraction (SCTS-PLPME) and Slotted Quartz Tube Flame Atomic Absorption Spectrometry (SQT-FAAS)," *Analytical Letters*, 55:2, 175-185, 2022.
- [144] T. U. Gösterişli, S. Oflu, S. Keyf and S. Bakırdere, "Development of a double monitoring system for the determination of Cr(VI) in different water matrices by HPLC-UV and digital image-based colorimetric detection method with the help of a metal sieve-linked double syringe system in complexation," *Environ Monit Assess* 194, 691, 2022.
- [145] L. Huber, "Validation of analytical methods: review and strategy," *LC-GC International*, 11: 96, 1998.
- [146] M. Firat, S. Bakırdere, M. S. Findıkoğlu, E. B. Kafa, E. Yazıcı, M. Yolcu, Ç. Büyükpınar, D. S. Chormey, S. Sel, and F. Turak, "Determination of trace amount of cadmium using dispersive liquid-liquid microextraction-slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrometry," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 129: 37-41, 2017.
- [147] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, and S. Crouch, "Fundamentals of analytical chemistry," Nelson Education, 2013.
- [148] R. Höslı, S. König, F. S. Mühlebach, "Development and Validation of an LC-MS/MS Method and Comparison with a GC-MS Method to Measure Phenytoin in

Human Brain Dialysate, Blood, and Saliva,” *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1–8, 2018.

- [149] E. Pourbasheer, S. Sadafi, M. R. Ganjali, M. Abbasghorbani, “Dispersive liquid–liquid microextraction for preconcentration and determination of phenytoin in real samples using response surface methodology-high performance liquid chromatography,” *RSC Adv.*, 4(107), 62190–62196, 2014.
- [150] M. Asadi, S. Dadfarnia, A. M. Haji Shabani, B. Abbasi, “Simultaneous extraction and quantification of lamotrigine, phenobarbital, and phenytoin in human plasma and urine samples using solidified floating organic drop microextraction and high-performance liquid chromatography,” *Journal of Separation Science*, 38(14), 2510–2516, 2015.
- [151] Y. Sakaguchi, R. Arima, R. Maeda, “Development of a useful single-reference HPLC method for therapeutic drug monitoring of phenytoin and carbamazepine in human plasma,” *ANAL. SCI.*, 39, 447–454, 2023.
- [152] R. N. Prentice, M. Younus, S. B. Rizwan, “A sensitive LC-MS/MS method for quantification of phenytoin and its major metabolite with application to in vivo investigations of intravenous and intranasal phenytoin delivery,” *J Sep Sci*, 45:2529–2542, 2022.
- [153] P. B. Deroco, F. C. Vicentini, G. G. Oliveira, R. C. Rocha-Filho, O. Fatibello-Filho, “Square-wave voltammetric determination of hydroxychloroquine in pharmaceutical and synthetic urine samples using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 719, 19-23, 2014.
- [154] M. Soylak, F. Uzcan, “A novel ultrasonication-assisted deep eutectic solvent microextraction procedure for tartrazine at trace levels from environmental samples,” *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2019.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Gizem Nur Ayan, Sezin Erarpat, Kumsal Eroğlu, Ömer Tahir Günkara, Sezgin Bakırdere, “Synthesis, Purification of Isotopic Derivatives of Pharmaceutical Active Ingredient Phenytoin and Application in Analytical Determination Methods”, the 8th International BAU Drug Design Congress, Istanbul/Turkiye, 2022.

Projeler

1. Yıldız Teknik Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Çeşitli İlaç Etken Maddelerinin İzotopik Türevlerinin Sentezlenmesi, Saflaştırılması ve Analitik Tayin Yöntemlerinde Uygulanması, Yürütücü: Ömer Tahir GÜNKARA, Proje No: FYL-2022-4855, 03.03.2022- 03.06.2023, Araştırmacı (03.03.2022- 03.06.2023).