

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

**DEKSKETOPROFEN VE İBUPROFEN'İN İNSAN PLAZMASINDA
YENİ NESİL EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ İLE AYRILMASI
VE HPLC İLE TAYİNİ**

**Hazırlayan
Dönay YUVALI**

**Danışman
Prof. Dr. İbrahim NARİN**

Doktora Tezi

**Ekim 2019
KAYSERİ**

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

**DEKSKETOPROFEN VE İBUPROFEN'İN İNSAN PLAZMASINDA
YENİ NESİL EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ İLE AYRILMASI
VE HPLC İLE TAYİNİ**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Dönay YUVALI**

**Danışman
Prof. Dr. İbrahim NARİN**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2016-6823 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ekim 2019
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Dönay YUVALI

İmza:

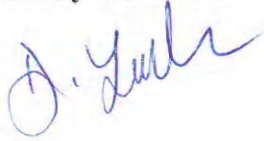
(Faint, stylized signature watermark)

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Deksketoprofen ve İbuprofen’in İnsan Plazmasında Yeni Nesil Ekstraksiyon Teknikleri ile Ayrılması ve HPLC ile Tayini” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Dönay YUVALI



Danışman

Prof. Dr. İbrahim NARİN



Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. İbrahim NARİN

Prof. Dr. İbrahim NARİN danışmanlığında **Dönay YUVALI** tarafından hazırlanan **“Deksketopfen ve İbuprofen’in İnsan Plazmasında Yeni Nesil Ekstraksiyon Teknikleri ile Ayrılması ve HPLC ile Tayini”** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Analitik Kimya** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

15/10/2019

JÜRİ

Danışman: Prof. Dr. İbrahim NARİN

(Analitik Kimya Anabilim Dalı)

Üye: Prof. Dr. Murat KANBUR

(Veteriner Farmakoloji- Toksikoloji Anabilim Dalı)

Üye: Doç. Dr. Vedat YILMAZ

(Analitik Kimya Anabilim Dalı)

Üye: Doç. Dr. Halil İbrahim ULUSOY

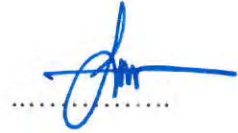
(Cumhuriyet Üniv. Analitik Kimya Anabilim Dalı)

Üye: Dr. Öğrt. Üyesi Ali DURAN

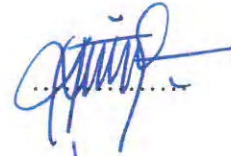
(Abdullah Gül Üniv. Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalı)

İMZA











ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve Sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim hayatım boyunca her konuda bana destek olup rehberlik eden Kıymetli Hocam ve Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. İbrahim NARİN 'e,

Tez izleme komitemde çok değerli katkıları olan; Prof. Dr. Murat KANBUR 'a ve Doç. Dr. Vedat YILMAZ' a

Doktora tezimin deneysel çalışmalarında verdiği destek ve katkıları için sonsuz minnettar olduğum Dr. Öğrt. Üyesi Erkan YILMAZ' a ve Prof. Dr. Mustafa SOYLAK'a

2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı bursiyeri olduğum TÜBİTAK'a

Tez çalışmamı TDK-2016-6823 kodlu proje ile finansal olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazım sürecindeki motive edici destekleri için Arş. Gör. Gökhan SARP' a, Arş. Gör. Aysun ÖKÇESİZ' e ve iş ortamında bana destek olan tüm Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma,

Doktora eğitimim boyunca beni motive ederek desteklerini esirgemeyen Aileme,

Ve bana gösterdiği anlayışı, karşılıksız ve sonsuz sevgisi için Oğlum Kadir Kağan YUVALI' ya çok teşekkür ederim.

Dönay YUVALI

Kayseri, Ekim 2019

DEKSKETOPROFEN VE İBUPROFEN'İN İNSAN PLAZMASINDA YENİ NESİL EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ İLE AYRILMASI VE HPLC İLE TAYİNİ

Dönay YUVALI

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Ekim 2019

Danışman: Prof. Dr. İbrahim NARİN

ÖZET

Bu çalışmada non steroidal antiinflamatuvar ilaçlardan sıklıkla kullanılan Deksketoprofen ve İbuprofen'in insan kan plazmasından ayırımına yönelik yeni ekstraksiyon yöntemlerinin geliştirilmesi ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile kantitatif tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Deksketoprofenin insan plazmasından ayırımı için, supramoleküler çözücü temelli sıvı faz ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemi için optimum pH, dekanolik asit, tetrahidrofuran ve ekstraksiyon süresi belirlendikten sonra plazma örneklerine deksetoprofen eklenerek kromatografik analizleri yapıldı. Yöntem gönüllü hastalardan alınan kan örneklerine başarı ile uygulandı. Geliştirilen sıvı faz ekstraksiyon yönteminin plazma ortamında gözlenebilme sınırı (GS) ve tayin sınırı (TS) sırasıyla 12,8 ve 38,8 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Yöntemin % bağıl standart sapması %3,7 dur.

İbuprofenin insan plazmasından ayırımı için, manyetik C-dot@grafen oksit nanokompoziti sentezlendi ve sentezlenen adsorbanın karakterizasyonu yapılmıştır. Manyetik C-Dot@grafen oksit ile katı faz ekstraksiyon yöntemi geliştirildi. Yöntem için optimum pH, adsorban miktarı, elüent türü, elüent hacmi ve ekstraksiyon süresi belirlendikten sonra plazma örneklerine ibuprofen eklenerek kromatografik analizleri yapıldı. Yöntem gönüllü hastalardan alınan kan örneklerine başarı ile uygulandı. Geliştirilen katı faz ekstraksiyon yönteminin plazma ortamında gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı sırasıyla 160,0 ve 510,0 ng/mL olarak hesaplandı. Yöntemin % bağıl standart sapması %3,9 olarak hesaplanmıştır.

Deksketoprofen için geliştirilen sıvı faz mikroekstraksiyon yönteminin ve ibuprofen için geliştirilen katı faz ekstraksiyon yönteminin insan plazmasından yapılacak kantitatif ilaç analizlerinde kullanılabilir yeni yöntemler olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Deksketoprofen, Ekstraksiyon, İbuprofen, HPLC-DAD, Plazma

**DETERMINATION OF DEXKETOPROFEN AND IBUPROFEN IN HUMAN
PLASMA WITH NEW GENERATION EXTRACTION TECHNIQUES AND
DETERMINATION BY HPLC**

Dönay YUVALI

Erciyes University, Institute of Health Sciences,

Analytical Chemistry Program,

PhD Thesis, October 2019

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim NARİN

ABSTRACT

The aim of this study was to develop new extraction methods for the separation of dexketoprofen and ibuprofen from non-steroidal antiinflammatory drugs from human blood plasma and to perform quantitative determination by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).

For the separation of dexketoprofen from human plasma, a supramolecular solvent based liquid phase extraction method was developed. After the determination of optimum pH, decanoic acid, tetrahydrofuran and extraction time for liquid phase microextraction method, dexketoprofen was added to plasma samples and chromatographic analyzes were performed. The method was successfully applied to blood samples taken from volunteer patients. The limit of detection and limit of quantification of the liquid phase extraction method in plasma were 12.8 and 38.8 ng/mL, respectively. The relative standard deviation of the method is 3.7 %.

For separation of ibuprofen from human plasma, magnetic C-dot graphene oxide nanocomposite was synthesized and characterization of the synthesized adsorbent was performed. Solid phase extraction method with magnetic C-Dot® graphene oxide was developed. After determination of optimum pH, adsorbent amount, eluent type, eluent volume and extraction time, ibuprofen was added to plasma samples and chromatographic analyzes were performed. The method was successfully applied to blood samples taken from volunteer patients. The limit of detection and limit of quantification of the developed solid phase extraction method in plasma were calculated as 160.0 and 510.0 ng/mL, respectively. The relative standard deviation of the method was calculated to be 3.9%.

It was concluded that liquid phase microextraction method developed for dexketoprofen and solid phase extraction method developed for ibuprofen are new methods that can be used in quantitative drug analysis from human plasma.

Keywords: Dexketoprofen, Extraction, Ibuprofen, HPLC-DAD, Plasma



İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	İİ
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	İİİ
ONAY	İV
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	Vİİ
İÇİNDEKİLER.....	İX
KISALTMALAR.....	XIV
TABLolar LİSTESİ.....	XVI
ŞEKİLLER LİSTESİ	XVII
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Non Steroidal Antiinflanmatuvar ilaçlar	3
2.1.1.NSAİİ'lerin Etki Mekanizmaları	5
2.1.2. NSAİİ'lerin Kullanım Alanları	6
2.1.3. NSAİİ'lerin Farmakokinetiği	6
2.1.4. NSAİİ'lerin Yan Etkileri.....	8
2.2. Deksketoprofen	9
2.2.1. Deksketoprofenin Kimyasal Özellikleri	9
2.2.2. Deksketoprofen Trometamolün Farmakokinetik Özellikleri.....	10
2.3. İbuprofen	10
2.3.1. İbuprofenin Kimyasal Özellikleri.....	10
2.3.2. İbuprofenin Farmokokinetik Özellikleri.....	11
2.4. Örnek Hazırlama Yöntemleri	11
2.4.1. Ekstraksiyon Yöntemleri.....	12
2.4.1.1. Sıvı Faz Ekstraksiyon Yöntemleri	13
2.4.1.2. Sıvı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemleri	13
2.4.1.2.1. Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon	14
2.4.1.2.2. Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu	15
2.5. Sıvı Faz Ekstraksiyonunda Yeni Nesil Solventler: Supramoleküler Çözücüler.....	15
2.5.1. Supramoleküler Çözücülerin Oluşumu.....	16
2.5.2. Kendiliğinden Birleşme İlkeleri	17

2.5.2.1. Sulu İyonik Olmayan Miseller	18
2.5.2.2. Sulu İyonik Miseller	19
2.5.2.3. Sulu Karışık Miseller.....	19
2.5.2.4. Ters Miseller	19
2.5.2.5. Veziküler Miseller.....	20
2.6. Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi	20
2.6.1. Kolon Tekniği.....	22
2.6.2. Yarı Geçirgen Disk ile Süzme Tekniği.....	24
2.6.3. Çalkalama tekniği	24
2.6.4. Katı Faz Ekstraksiyon Metodunun Avantajları.....	24
2.7. Yeni Nesil Adsorbanlar	25
2.7.1. Karbon Dot.....	25
2.7.2. Grafen ve Grafen Oksit	26
2.8. Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçların Ekstraksiyon Yöntemlerine Ait Literatür Taraması.....	28
2.9. Kromatografik Yöntemler	31
2.9.1. Adsorbsiyon Kromatografisi	32
2.9.2. Dağılma Kromatografisi	33
2.9.2.1. Normal Faz Sıvı Kromatografisi.....	33
2.9.2.2. Ters Faz Sıvı Kromatografisi.....	33
2.9.3. İyon Değişirme Kromatografisi.....	33
2.9.4. Eleme Kromatografisi.....	34
2.9.5. Afinite Kromatografisi.....	34
2.10. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi.....	34
2.10.1. HPLC Cihazının Bölümleri.....	35
2.10.1.1. Pompalar	35
2.10.1.2. Enjektörler	36
2.10.1.3. Kolonlar	36
2.10.1.4. Dedektörler	36
2.10.1.5. UV-Görünür Bölge ve Dizi Diyot Dedektör.....	37
2.11. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri.....	38
2.11.1. Analitik yöntem geçerlilik parametreleri	38
2.11.2. Doğrusallık ve Sınırlar	39
2.11.3. Doğruluk	39

2.11.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik	39
2.11.5. Gözlenebilme Sınırı	40
2.11.6. Tayin Sınırı.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler.....	41
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	41
3.1.2. Cihazlar	41
3.1.3. Kromatografik Tayinlerde Kullanılan Sarf Malzemeler.....	42
3.1.4. Çözeltilerin Hazırlanması	42
3.1.5. Kan Örneklerinin Toplanması ve Hazırlanması.....	44
3.2. Deksketoprofenin İnsan Plazmasından Analize Yönelik Supramoleküler Çözücü Temelli Sıvı Faz Mikro Ekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi.....	45
3.2.1. Deksketoprofen İçeren Plazma Örneklerinin Kromatografik Analizi.....	45
3.2.2. Supramoleküler Çözücüler İle Sıvı Faz Ekstraksiyon Yöntemi ve Optimizasyonu	45
3.2.2.1. pH Etkisi	45
3.2.2.2. Dekanoik Asit Miktarı.....	45
3.2.2.3. Tetrahidrofuran Miktarı.....	46
3.2.2.4. Sonikasyon Süresi	46
3.2.2.5. Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması	46
3.2.2.6. Geliştirilen Yöntemin Analitik Performansı.....	46
3.2.2.6.1. Doğrusallık Çalışmaları	46
3.2.2.6.2. Doğruluk ve Geri Kazanım Çalışmaları.....	47
3.2.2.6.3. Kesinlik Çalışmaları.....	47
3.2.2.6.4. Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırı	47
3.2.3. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması.....	47
3.3. İbuprofenin İnsan Plazmasından Ekstraksiyonuna ve Tayinine Yönelik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi.....	48
3.3.1. İbuprofenin İnsan Plazmasından Ekstraksiyonuna Yönelik Yeni Katı Faz Adsorban Sentezi	48
3.3.1.1. Grafen Oksit Sentezi	48
3.3.1.2. Karbon Dot Sentezi.....	48
3.3.1.3. Manyetik Özellikli Karbon Dot@Grafen Oksit Nanokompozitinin Sentezi Ve Karakterizasyonu.....	49

3.3.2. İbuprofen İçeren Plazma Örneklerinin Kromatografik Analizi	49
3.3.3. Sentezlenen Karbon Dot@Grafen Oksit Nanokompozit ile Geliştirilen KFE Yönteminin Optimizasyonu	49
3.3.3.1. Örnek Çözeltisinin pH'sının Etkisi	50
3.3.3.2. Adsorban Miktarının Etkisi	50
3.3.3.3. Adsorpsiyona Vorteks Süresinin Etkisi.....	50
3.3.3.4. Elüent Türü ve Hacminin Etkisi.....	50
3.3.3.5. Elüsyon İşlemine Vorteks Süresinin Etkisi	51
3.3.3.6. Katı Adsorbanın Tekrar Kullanılabilirliği	51
3.3.3.7. Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması	51
3.3.3.8. Geliştirilen Katı Faz Yönteminin Analitik Performansı.....	51
3.3.3.8.1. Doğrusallık Çalışmaları	51
3.3.3.8.2. Doğruluk ve Geri Kazanım Çalışmaları.....	52
3.3.3.8.3. Kesinlik Çalışmaları.....	52
3.3.3.8.4. Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırı	52
3.3.3.9. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması	52
4. BULGULAR	54
4.1. Deksketoprofenin İnsan Plazmasından Analize Yönelik Supramoleküler Çözücü Temelli Sıvı Faz Mikro Ekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi ve HPLC ile Tayini.....	54
4.1.1. Örnek Çözeltisinin pH'sının Etkisi.....	54
4.1.2. Dekanoik Asit Miktarı	55
4.1.3. Tetrahidrofuran Miktarı	55
4.1.4. Sonikasyon Süresi.....	56
4.1.5. Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması.....	57
4.1.6. Deksketoprofen İçeren Plazma Örneklerinin Kromatografik Analizi.....	58
4.1.7. Geliştirilen Yöntemin Analitik Performansı	59
4.1.8. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması.....	61
4.2. İbuprofenin İnsan Plazmasından Ekstraksiyonuna Yönelik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi ve HPLC-DAD ile tayini	62
4.2.1. Manyetik Özellikli Karbon Dot@Grafen Oksit Nanokompozitinin Karakterizasyonu.....	62
4.2.2. Sentezlenen Yeni Nesil Adsorban ile Yöntem Optimizasyonu	70
4.2.2.1. pH Etkisi	70
4.2.2.2. Adsorban Miktarının Etkisi	71

4.2.2.3. Adsorpsiyona Vorteks Süresinin Etkisi.....	72
4.2.2.4. Elüent Türü ve Hacminin Etkisi.....	73
4.2.2.5 Elüsyon İşlemine Vorteks Süresinin Etkisi	74
4.2.2.6. Katı Adsorbanın Tekrar Kullanılabilirliği	75
4.2.2.7. Kalibrasyon Doğruları.....	76
4.2.2.8. İbuprofen İçeren Plazma Örneklerinin Kromatografik Analizi.....	78
4.2.2.9. Geliştirilen Katı Faz Yönteminin Analitik Performansı.....	78
4.2.2.10. Gerçek Örneklerin Analiz Sonuçları	79
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	81
6. KAYNAKLAR.....	92
EK-1: ETİK KURUL RAPORU	106
ÖZGEÇMİŞ.....	108

KISALTMALAR

μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
ACN	: Asetonitril
BNE	: Bulutlanma noktası ekstraksiyonu
BSS	: Bağıl standart sapma
CD	: Karbon dot
CE	: Kapiler elektroforez
COX	: Siklooksijenaz
COX-1	: Siklooksijenaz-1
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DA	: Dekanoik asit
DAD	: Dizi diyot dedektör
dk	: Dakika
DKP	: Deksketoprofen
FDA	: Gıda ve ilaç idaresi
FT-IR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GC	: Gaz kromatografisi
GO	: Grafen oksit
GS	: Gözlenebilme sınırı
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HPLC-DAD	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-Diyot dizi dedektörü İnsan Kullanımına Yönelik Eczacılıkta Teknik
ICH	: Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Uluslararası Konseyi
İBU	: İbuprofen
i.d.	: İç çap
KFE	: Katı faz ekstraksiyonu
kg	: Kilogram
L	: Litre
LC	: Sıvı kromatografisi
LC/MS/MS	: Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin sınırı

M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nM	: Nanometre
NSAİİ	: Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar
PAH	: Poli aromatik hidrokarbon
PEG	: Poli etilen glikol
r^2	: Tanımlayıcılık katsayısı
s	: Saniye
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SEM-EDX	: Taramalı elektron mikroskobu- enerji yayımlı X- ışını analizi
SUPRAS	: Supramoleküler çözücüler
STEM	: Taramalı transmisyon elektron mikroskobu
ss	: Standart sapma
UV-VIS	: Ultraviyole-görünür bölge
USP	: Amerikan farmakopesi
XRD	: X- Işını difraktometresi

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. NSAİİ'lerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.....	4
Tablo 4.1. Supramoleküler çözücü temelli sıvı faz ekstraksiyon yönteminin model çözelti ve plazma ortamında analitik performansı.....	60
Tablo 4.3. Manyetik C-dot@grafen oksit ile geliştirilen katı faz ekstraksiyon yönteminin model çözelti ve plazma ortamında analitik performansı.....	79
Tablo 4.4. Geliştirilen yöntemin insan plazmasına uygulanması ve geri kazanım sonuçları (n=5)	79
Tablo 5.1. Supramoleküler çözücüler ile geliştirilen yöntemin optimum deneysel parametreleri.....	82
Tablo 5.2. Deksketoprofenin plazmadan analizi için geliştirilen supramoleküler çözücü temelli sıvı faz mikro ekstraksiyon yönteminin literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılması	83
Tablo 5.3. Manyetik grafen oksit@C-Dot nanokompoziti ile geliştirilen katı faz ekstraksiyon yönteminin optimum deneysel parametreleri	86
Tablo 5.4. İbuprofenin insan plazmasından analizi için geliştirilen manyetik@C-Dot@GO nanokompoziti ile katı faz ekstraksiyon yönteminin literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılması	88

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Deksketoprofenin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.2. İbuprofenin kimyasal yapısı	10
Şekil 2.3. Supramoleküler agregalarının amfifillerin şekillerine göre yapısı	17
Şekil 2.5. Kolon tekniğinin şematik gösterimi (Oğuzhan ve Aksoy, 2006).	24
Şekil 2.6. Literatürde sıklıkla belirtilen C-Dot yapılarının şematik gösterimi.....	26
Şekil 2.7. HPLC cihazı kısımlarının şematik gösterimi	35
Şekil 4.1. Deksketoprofenin geri kazanımına pH'nın etkisi(n=3).....	55
Şekil 4.2. Deksketoprofenin geri kazanımına dekanolik asit miktarının etkisi (n=3)	55
Şekil 4.4. Deksketoprofenin geri kazanımına sonikasyon süresinin etkisi (n=3).....	57
Şekil 4.5.Sulu model çözeltilerden geliştirilen ekstraksiyon yöntemi sonrası elde edilen kalibrasyon doğrusu.....	58
Şekil 4.6. İlaç içermeyen plazma örneklerine DKP ilavesiyle hazırlanan standart örneklerin geliştirilen ekstraksiyon yöntemi ile analizleri sonucu elde edilen kalibrasyon doğrusu.....	58
Şekil 4.7. Standart DKP ilave edilmiş plazma örneğinin direkt analizine ait kromatogram.....	59
Şekil 4.8. Standart DKP ilave edilmiş plazma örneğinin geliştirilen sıvı faz yöntemi ile ekstraksiyonuna ait kromatogram.....	59
Şekil 4.9. Gönüllü hastaların plazma deksketoprofen konsantrasyonu	61
Şekil 4.10. Sentezlenen C-Dot malzemesinin SEM görüntüsü	63
Şekil 4.11. Sentezlenen Grafen oksitin SEM görüntüsü.....	63
Şekil 4.12. Manyetik@ C-dot @grafen oksit nanokompozitinin SEM görüntü	64
Şekil 4.13. Sentezlenen C-Dot nanopartiküllerinin STEM görüntüsü.....	65
Şkil 4.14. Sentezlenen GO nanopartiküllerinin STEM görüntüsü	65
Şekil 4.15. Sentezlenen Manyetik C-Dot@GO nanokompozitinin STEM görüntüsü ...	66
Şekil 4.16. Fe ₃ O ₄ oluşumunun SEM-EDX ile karakterizasyon grafiği.....	66
Şekil 4.17. Fe ₃ O ₄ oluşumunun SEM- Mapping görünümü	67
Şekil 4. 18. C-Dot, GO ve Fe ₃ O ₄ @C-Dot@GO materyallerine ait XRD spektrumları.	68
Şekil 4.20. C-Dot, GO ve Fe ₃ O ₄ @C-Dot@GO materyallerine ait İnfrared spektrumları.	70

Şekil 4.21. Manyetik grafen oksit adsorbanı ile ibuprofenin geri kazanımına pH etkisi (n=3).....	71
Şekil 4.22. Manyetik C-Dot@grafen oksit nanokompoziti ile ibuprofenin geri kazanımına pH etkisi (n=3)	71
Şekil 4.23. Manyetik C-Dot@grafen oksit nanokompoziti ile İbuprofenin geri kazanımına adsorban miktarının etkisi (n=3).....	72
Şekil 4.24. İbuprofenin geri kazanımına adsorpsiyon süresinin etkisi (n=3).....	73
Şekil 4.25. İbuprofenin geri kazanımına elüent türünün etkisi (n=3).....	74
Şekil 4.26. İbuprofenin geri kazanımına elüent hacminin etkisi (n=3).....	74
Şekil 4.27. İbuprofenin geri kazanımına elüsyon vorteks süresinin etkisi(n=3)	75
Şekil 4.28. Manyetik CD@GO nanokompozitinin ibuprofenin katıfaz ekstarksiyonunda tekrar kullanılabilirliği (n=15).....	76
Şekil 4.29. Geliştirilen ekstraksiyon yöntemi sonrası sulu model çözülden elde edilen kalibrasyon doğrusu.....	77
Şekil 4.30. İlaç içermeyen plazma örneklerine standart ibuprofen ilave edildikten sonra geliştirilen ekstraksiyon yöntemi uygulandıktan sonra elde edilen kalibrasyon doğrusu	77
Şekil 4.31. Standart ibuprofen eklenmiş plazmanın direkt analizine ait kromatogram..	78
Şekil 4.32. Standart ibuprofen eklenmiş plazmanın geliştirilen katı faz yöntemi ile ekstraksiyon sonrası analizine ait kromatogram.....	78
Şekil 4.33. Gönüllü hastaların plazma ibuprofen konsantrasyonu	80

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yeni ilaçların keşfi ve artan insan nüfusu ve yaş ortalamasının yükselmesi ilaç tüketimini artırmaktadır. Bu durum ilaçların etkinliği, farmakokinetiği ve biyoeşdeğerlik çalışmalarının yapılması için yeni analitik teknikler geliştirmeyi zorunlu kılmıştır. Biyolojik örneklerdeki ilaçların analizi, oldukça hassas analitik cihazlar ile yapılmasına rağmen özellikle matriksin karmaşık olması nedeniyle numune hazırlama ve ekstraksiyon işlemlerinin yapılmasını gerektirmektedir. Bu nedenle farklı matrikslerden ilaç/kalıntı analizi yaparken uygulanan ekstraksiyon ve zenginleştirme işlemlerine yönelik yeni yaklaşımların geliştirilmesine sebep olmaktadır.

Non-steroidal antiinflatuvar (NSAİİ) ilaçlar, yumuşak dokularda travma ve ağrıya sebep olan inflamatuvar durumlarda, ateş yükselmesinde ve romatizmal rahatsızlıkların tedavisinde kullanılır. Türkiye’de Mart 2019 yılı verileri incelendiğinde; tedavi gruplarına göre en çok tüketilen ilaçların %7,1’ini analjezik ilaçlar, %11,1’ini antiromatizmal ilaçlar oluşturmaktadır.

(<http://www.ieis.org.tr/ieis/tr/indicators/33/turkiye-ilac-pazari>, Erişim tarihi: 22 Ağustos 2019). NSAİİ ve bunlarla birlikte kullanılan soğuk algınlığı ve alerji ilaçları çok sık kullanılmaktadır. Bu ilaçlara olan talep eşdeğer ilaçların üretimini gün geçtikçe artırmaktadır. İlaç üretiminin ve tüketiminin bu kadar yoğun olarak arttığı günümüz şartlarında bu bileşiklerin hem biyolojik örnekler hem de gıda, atık su gibi farklı örneklerde tayinleri için yeni yöntemler geliştirilmektedir.

Çevre örnekleri, gıda örnekleri ve biyolojik örnekler gibi karmaşık ve zor matrikslerdeki eser miktardaki ilaç etken maddelerinin analizlerinin hassas, doğru ve hızlı bir şekilde yapılması bütün analiz laboratuvarları için önemlidir. Karmaşık matrikslerdeki analitlerin teşhisi ve tayini için kullanılan analitik cihazlar, çoğu zaman analitin örnek ortamından ayrılması ve zenginleştirilmesine yönelik örnek hazırlama çalışmalarına ihtiyaç duyar. Örnek hazırlama işlemlerinde ayırma ve ekstraksiyon yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda örnek hazırlama yöntemlerinde, QuERChES olarak

adlandırılan basit, kolay, uygun maliyetli, çevre ve insan sağlığı için güvenli, sağlam metotların geliştirilmesi ve uygulanmasına yönelik çalışmalar sıkça kullanılmaya başlanmıştır.

Teknolojinin gelişmesi ve yeni kimyasal keşiflerle birlikte klasik tekniklerdeki toksik organik çözücüler yerlerini yeni nesil toksik olmayan ve daha az kimyasal kullanımı ile etkin geri kazanım sağlayan yöntemlere bırakmıştır. Bu özellikleri ile birlikte yeni yöntemler aynı zamanda birçok hassas cihazla uyumlu halde kullanılabilir. Örnek hazırlama işlemlerinin basitliği ve laboratuvarlarda otomasyonu analizcilerin işlerini kolaylaştırmanın yanında yapılan deneylerin doğruluğunu ve hassaslığını da artırmıştır.

Bu çalışmada temel amacımız; tedavide sık kullanılan deksketoprofen (DKP) ve ibuprofen'in (İBU) insan plazmasında analize yönelik yeni ekstraksiyon yöntemleri geliştirerek, biyolojik örnekte analizlerine yönelik daha etkili, çevre dostu analitik tayin metotları geliştirmektir. Bu yöntemlerdeki öncelikli hedeflerimiz analitik açıdan tayin sınırı düşük, doğruluğu ve tekrarlanabilirliğinin analitik kriterlere uygun olan, düşük maliyetli ve çevre dostu alternatif ekstraksiyon yöntemleri geliştirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Non Steroidal Antiinflammatuvar ilaçlar

NSAİİ'ler ağrı hissini azaltan, ateş dürücü etki gösteren ve inflamasyonu azaltan ilaç grubudur. Analjezik etkileri olmakla birlikte narkotik ilaç grubu değildirler. En sık kullanılan ve en eski NSAİİ'ler aspirin ve ibuprofendir (Rainsford, 2009).

NSAİİ'lerin keşfi ve sentezi ilk olarak 1860'da salisilik asitin ağrı kesici etkisinin ispatlanması ile birlikte başlamış ve 1898'de aspirin ticari olarak satışa sunulmuştur. 1949'da fenilbutazonun sentezi non-steroidal antiinflammatuvar ilaç grubunun belirlenmesine katkı sağlamıştır. NSAİİ'lerin etki mekanizmalarına yönelik çalışmalar siklooksijenaz enziminin keşfi ile başlamıştır. Etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar, yeni analjezik etkili ilaç türevlerinde sentezinin ve keşfini hızlandırmıştır ve bu grup ilaçların sayısını artırmıştır (Schellack ve ark., 2015; Rainsford, 2015).

Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar düşük dozlarda analjezik etki gösterirken yüksek dozlarda enflamasyonun tedavisinde yoğun bir şekilde kullanılır. Bu derece sık kullanılmasında bağımlılık potansiyeli taşımaması, sedasyon yapmaması veya solunumu baskılamaması etkin olmuştur. NSAİİ'ler önemli avantajlarıyla birlikte spesifik yan etkileri vardır. Başta ibuprofen ve aspirin olmak üzere bazı NSAİİ'ler, yan etki ve alerjik reaksiyon sıklığı bakımından güvenli olarak değerlendirilmesiyle tüm dünyada reçetesiz olarak satılmaya başlanmıştır (Bjarnason ve ark., 2018; Wong, 2019).

Plasebo ile karşılaştırıldığında, steroid olmayan antiinflammatuar ilaçlar, artrit, bel ağrısı ve yumuşak doku ağrısı olan hastalarda ağrıyı önemli ölçüde azaltır. Bununla birlikte, NSAİİ'lerin gastrointestinal kanama, peptik ülser, hipertansiyon, ödem ve böbrek yetmezlikleri dahil olmak üzere önemli olumsuz etkileri vardır. Daha yakın zamanlarda, bazı NSAİİ'ler ayrıca miyokard enfarktüsü riskini artmasıyla da ilişkilendirilmiştir

(Dionne ve ark.,1983; Wongrakpanich ve ark., 2018; <https://www.tga.gov.au/alert/non-steroidal-anti-inflammatory-drugs-nsaids-review>, Erişim tarihi: 11 Temmuz 2019).

Non steroidal antiinflatuvar ilaçlar, kimyasal yapılarına, etki mekanizmalarına ve yarı ömürlerine göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları Tablo 2.1.' de verilmiştir (Shellack ve ark., 2015).

Tablo 2.1. NSAİİ'lerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması

A- Karboksilik asit türevleri	
1. Salisilik asit ve esterleri	Aspirin, Diflunisal, Kolin salisilat,
2.Antranilik asit türevleri	Flufenamik asit, Metafenamik asit,
B- Asetik asit türevleri	
1. Fenilasetik Asit	Diklofenak, fenklofenak
2. Karbo ve heterosiklik asitler	İnfometazin, etodolak, sulindak,
C-Propronik asit türevleri	İbuprofen, ketoprofen, flurbiprofen, suprofen, naproksen
D- Fenamik Asit türevleri:	Flufenamik asit, mefenamik asit, meklofenamik asit
E-Enolik Asit türevleri	
I. Pirazolonlar:	Fenilbutazon, oksifenbutazon, azopropazon
II. Oksikamlar	Piroksikam, pesoksikam, sudoksikam, meloksikam, tenoksikam
F- Asidik olmayan türevler	Prokazon, Asetaminofen

2.1.1.NSAİİ'lerin Etki Mekanizmaları

NSAİİ'lerin terapötik etkilerinin ortaya çıkarıldığı ana mekanizma (antipiretik, analjezik ve anti-enflamatuar aktiviteler) prostaglandin (PG) sentezinin inhibisyonudur. Spesifik olarak NSAİİ'ler rekabetçi bir şekilde (çoğunlukla), prostaglandinler oluşturmak üzere siklik endoperoksitlerin arakidonik asitten sentezini katalize eden enzimler olan siklooksijenazları (COX) inhibe eder. COX-1 ve COX-2 olarak adlandırılan iki COX izoenzimi tanımlanmıştır. Yapısal olarak ifade edilen COX1 sürekli olarak sentezlenir ve tüm dokularda ve hücre tiplerinde, özellikle de trombositlerde, endotel hücrelerinde, gastrointestinal kanalda, böbrek mikrovaskülatüründe, glomerülde ve toplama kanallarında bulunur. Bu nedenle, COX-1, homeostatik prostaglandinlerin üretimi için önemlidir. Trombosit agregasyonu, böbrek ve midede kan akışının düzenlenmesi ve gastrik asit sekresyonunun düzenlenmesi gibi COX-1 aktivitesinin inhibisyonu dolayısıyla NSAİİ'ler gastrointestinal sistem toksisitesine neden olabilirler. COX-2, böbrek, beyin, kemik, dişi üreme sistemi, neoplaziler ve gastrointestinal kanalında bazı kurucu ifadeler olmasına rağmen, uyarılabilir bir izoenzim olarak kabul edilir. COX-2 izoenzimi ağrı ve iltihaplanma süreçlerinde önemli bir rol oynar. Genel olarak, NSAİİler hem COX-1 hem de COX-2'yi inhibe eder. Asetil salisilik asiti, ketoprofen, indometasin vb gibi çoğu NSAİİ, temel olarak COX-1 seçicidir. İbuprofen, naproksen, diklofenak, COX-1 için biraz seçici olarak kabul edilir ve etodolak, nabumeton ve meloksikam, COX-2 için biraz seçici olarak kabul edilebilir. Selekoksib ve rofekoksibin etki mekanizması temel olarak COX-2'nin seçici inhibisyonudur. Terapötik konsantrasyonlarda COX-1 izoenzimi inhibe edilmez, bu nedenle gastrointestinal sistem toksisitesi azaltılabilir. NSAİİ anti-enflamatuar aktivitesine katkıda bulunabilecek diğer mekanizmalar arasında süperoksit radikallerinin azaltılması, apoptoz indüksiyonu, yapışma molekülü ekspresyonunun inhibisyonu, nitrik oksit sentezinin azalması, proinflamatuar sitokin seviyelerinin azalması (tümör nekroz faktörü-a, interlökin-1), lenfosit aktivitesinin modifikasyonu ve hücresel membran fonksiyonlarının değiştirilmesi bulunur (Park ve ark., 2012; <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-fda-strengthens-warning-non-aspirin-nonsteroidal-anti-inflammatory>, Erişim Tarihi: 1 Temmuz 2019; <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/safety-review-nonsteroidal-anti-inflammatory->

drugs-nsaids-and-spontaneous-abortion-161018.pdf, Erişim Tarihi: 22 Ağustos 2019; Mazaleuskaya ve ark., 2015).

2.1.2. NSAİİ'lerin Kullanım Alanları

Akut ve kronik durumun ve inflamasyon tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlar olmaları ile birlikte kanser tedavisinde ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisindeki potansiyelleri araştırılmaktadır.

NSAİİ'lerin endike olduğu tıbbi durumlar;

- Romatoid artrit,
- Osteoartrit,
- İnflamatuvar artropatiler,
- Akut gut,
- Dismenore,
- Metaztatik kemik ağrısı,
- Baş ağrısı ve migren,
- Ameliyat sonrası ağrı,
- Hafiften orta dereceye kadar ağrılar,
- Ateş olarak sayılabilir (Park ve ark., 2012).

2.1.3. NSAİİ'lerin Farmakokinetiği

Kullanım dozuna bağlı olarak, NSAİİ'lerin terapötik aktivitesi ve yan etkileri emilimine, dağılımına ve eliminasyonuna bağlıdır. Bu farmakokinetik parametreler, farklı NSAİİ'ler arasında büyük ölçüde farklılık gösterebilir. Herhangi bir analjezik sınıfta olduğu gibi, absorpsiyon oranı bir NSAİİ seçiminde kilit bir faktördür. Hızlı emilimi olan NSAİİ'ler özellikle şiddetli veya akut ağrılı hastalar olmak üzere çoğu hasta için tercih edilir. Örneğin, nispeten yavaş bir emilim oranına sahip olan selekoksib, osteoartrit ağrısını etkin bir şekilde tedavi etmek için standart dozlarda uygulanabilir, ancak akut ağrının tedavisi, absorpsiyon için oldukça zaman alır ve klinik olarak anlamlı analjezi sağlamak için genellikle bir yükleme dozu gerektirir. Asidik fonksiyonel gruplara (örneğin diklofenak, ibuprofen, ketoprofen) ve yüksek derecede protein bağlanma özelliğine sahip NSAİİ'lerin, asidik olmayan NSAİİ'lere (örneğin, asetaminofen, selekoksib, rofecoxib) göre vücutta homojen olarak dağılıma eğilimindedir. Yüksek derecede protein bağlanmasına sahip olan asidik NSAİİ'ler,

iltihaplı dokularda veya sinovyal sıvıda, plazmadan daha uzun süre kalabilir. NSAİİ'lerin iltihaplanma bölgelerinde ve bunlara eşlik eden terapötik etkilerde birikmesi farmakokinetik özelliklerinden de etkilenir (genişletilmiş salınımlı veya hemen salınan formülasyonlar dahil). Kısa plazma yarı ömrüne sahip asidik NSAİİ'ler (örn., Diklofenak, ibuprofen, ketoprofen), plazma ve hedefli olmayan dokulardan hızlı bir şekilde temizlenme nedeniyle uzun plazma yarı ömrüne sahip ilaçlar ile karşılaştırıldığında tolere edilebilirlik faydaları ile ilişkilendirilebilir. İlaç, iltihaplanma bölgelerinde siklo-oksijenaz-2'yi aktif olarak inhibe etmeye devam ederken, diğer dokulardaki siklooksijenaz aktivitesi aşırı yüksek dozların kullanılması veya bu analjeziklerin yavaş salınan formülasyonlarının kullanılması bu yararları olumsuz etkileyebilir. Plazma yarı ömrü, gastrointestinal güvenlik ve NSAİİ'lerin tolere edilebilirliği açısından da anahtar bir faktördür (Göktürk,2017; Miranda ve ark., 2016; Eroğlu ve ark., 2014; Rençber ve ark., 2009; Kapıcıoğlu, 2007).

Absorpsiyonun hızlı olmasına rağmen, bazı NSAİİ'ler (örneğin diklofenak) düşük bir biyoyararlanıma sahiptir. Çünkü bunlar bağırsak duvarında ve karaciğerde meydana gelen önemli bir ilk geçiş etkisine maruz kalırlar. NSAİİ'lerin çoğu, oksidasyon, hidroksilasyon, demetilasyon, deasetilasyon, glukuronidasyon ve sülfatasyon gibi faz-2 metabolik reaksiyonları gibi faz-1 metabolik reaksiyonlar veya her ikisi de idrar veya safra içine atılır. NSAİİ'lerin molekülleri kana ulaştığında, plazma proteinlerine, özellikle de albümine, geniş ölçüde bağlanırlar. Dağılım hacmi (Vd) genellikle küçüktür, temel olarak plazma hacmine yaklaşan 0,1 ila 0,3 L/kg vücut ağırlığı arasındadır. Safraya atıldıktan sonra, birkaç NSAİİ enterohepatik resirkülasyona uğrar. Yani, bunlar, faz-2-konjugatlarının (yani, glukuronitler veya sülfatlar), intestinal insan veya bakteriyel glukuronidazlar veya sülfatazlar tarafından parçalanmasından sonra bağırsaktan yeniden emilir. Eliminasyon işlemine bağlı olarak böbrek veya safra yoluyla metabolizma ve atılım hızlarında farklılık gösterir, bunlar genellikle eleme yarı ömür değerleri ($t_{1/2}$) ile sayısal olarak karakterize edilir. NSAİİ'lerin yarı ömrü, organ hasarı (yani böbrek veya karaciğer yetmezliği) veya NSAİİ'lerin metabolizmasında yer alan enzimlerin genetik polimorfizmleri nedeniyle bireyler arasında değişebilir. Örneğin, bazı NSAİİ'ler sitokrom P450 2C9 (CYP2C9) aracılığıyla metabolize edilir, bunun için daha az işlevsel veya işlevsel olmayan bir enzime yol açan mutasyonlar tarif edilmiştir. Ayrıca, NSAİİ'lerin elimine edilmesinde yer alan enzimlerin veya taşıyıcıların inhibe edilmesine yol açan farmakokinetik ilaç-ilaç etkileşimleri meydana

gelebilir ve bu durum NSAİİ'lerin yarı ömürlerinin uzamasıyla sonuçlanır (Davie, 1998; Park ve ark., 2012; Göktürk, 2017).

2.1.4. NSAİİ'lerin Yan Etkileri

NSAİİ'lerin reçetesiz ve sık kullanımı ilaçların yan etkilerinin görülmesinde artışa yol açmıştır. En sık görülen yan etkiler gastrointestinal ve renal yan etkilerdir. Gastrointestinal komplikasyonlar, NSAİİ tedavisinin en yaygın ve iyi bilinen yan etkileri arasındadır ve genellikle COX-1'in inhibisyonundan kaynaklanır, COX-1, gastrointestinal sistem boyunca eksprese edilir ve bir dizi koruyucu etki sağlayan mukozal prostoglandinlerin üretimine aracılık eder mukozaya kan akışının arttırılması ve mukus ve bikarbonat salgılanmasının arttırılması dahil siklooksijenaz-1'in inhibe edilmesi, mukozal hasara karşı artan bir duyarlılığa neden olabilir. Ek olarak, COX-2, mide lezyonlarının iyileşmesini teşvik etmektedir. Bu nedenle, COX-2'nin inhibisyonu ülserlerin oluşumunda da rol oynayabilir (<https://www.medicalnewstoday.com/articles/179211.php>, Erişim tarihi:28 Temmuz 2019; Wong, 2019).

Bununla birlikte, NSAİİ'ler arasında gastrointestinal komplikasyon riskinde önemli farklılıklar vardır. Tek tek NSAİİ sonuçlarına uygun olarak, COX-2 için daha fazla seçiciliğe sahip olan ilaçlar genellikle COX-1'den daha düşük bir üst gastrointestinal riski ile ilişkilendirilmiştir. 220.000'den fazla hastadan gelen verilerin son meta-analizinde tahmin edilen mutlak yıllık üst gastrointestinal komplikasyon riski, seçici olmayan NSAİİ'lere kıyasla daha fazla COX-2 seçiciliği (coxibs ve diklofenak) olan NSAİİ'lerde daha düşüktür.

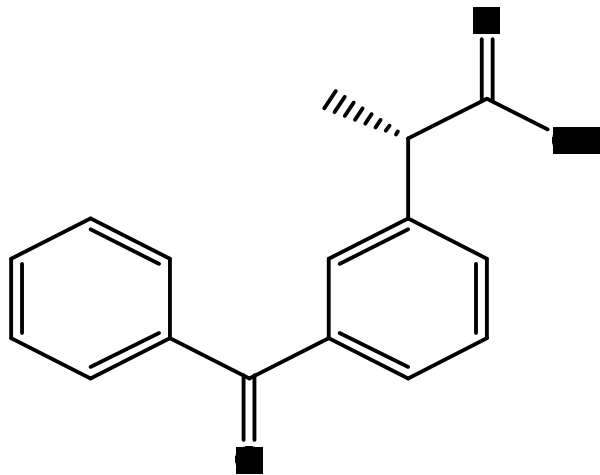
Her ne kadar aspirin kardiyoprotektif etkilere sahip olsa da, diğer NSAİİ'lerin çoğu hipertansiyon, miyokard enfarktüsü, felç ve kalp yetmezliği gibi artmış kardiyovasküler yan etki riski ile ilişkilidir. Düşük dozlarda, diklofenak ile artmış kardiyovasküler rahatsızlık riski olduğuna dair çok az kanıt vardır. Bu etkileri doza bağlıdır, hayati sorunlar ve ölüme sebep oldukları için kullanımları kısıtlanmıştır.

Bu grup ilaçlar gebelik döneminde özellikle 3. Trimestir'da önerilmez. Doğrudan teratojenik değildir. Fetusda fetal duktus arteriosusun erken kapanmasına ve renal yan etkilere neden olabilirler. Ayrıca prematür doğuma da neden olabilirler (Göktürk, 2017; Kapıcıoğlu, 2007).

2.2. Deksketoprofen

2.2.1. Deksketoprofenin Kimyasal Özellikleri

Deksketoprofen, ketoprofenin S (+) izomeri olup kapalı formülü $C_{16}H_{14}O_3$ dür. Molekül ağırlığı 245,285 g/mol'dür. Ticari ilaç formlarında deksetoprofen trometamol olarak bulunur. Kapalı formülü $C_{16}H_{14}O_3 \cdot C_4N_{11}NO_3$, molekül ağırlığı 375,418 g/mol olup beyaz kristal yapıdadır ve su ve alkolde çözünür. Şekil 2.1'de deksetoprofen trometamol'un kimyasal yapısı verilmiştir. Deksetoprofen trometamol S-(+)-2-(3-benzoilfenil) propiyonik asidin trometamin tuzudur. Zayıf asidik özellikte bir etken maddedir. Farklı çözücülerde asitlik sabiti (pKa) değeri değişmektedir. Herrador ve Gonzalez (2002) yaptıkları çalışmada DKP'nin saf sulu ortamdaki pKa değerini 4,41 olarak bildirmiştir. NSAİİ ilaç grubuna dahil analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik bir ilaçtır. Osteoartrit, romatoid artrit ve ankilozan spondilit belirti ve bulgularının tedavisi ile akut gut artrit, akut kas iskelet sistemi ağrıları, postoperatif ağrı ve dismenore tedavisinde endikedir. Türkiye'de deksetoprofen trometamolü etken madde olarak çok sayıda farklı farmasötik formülasyonları vardır (Tuncer ve ark, 2006; <https://www.drugs.com/international/dexketoprofen.html>, Erişim tarihi 2 Temmuz2019).



Şekil 2.1. Deksetoprofenin kimyasal yapısı

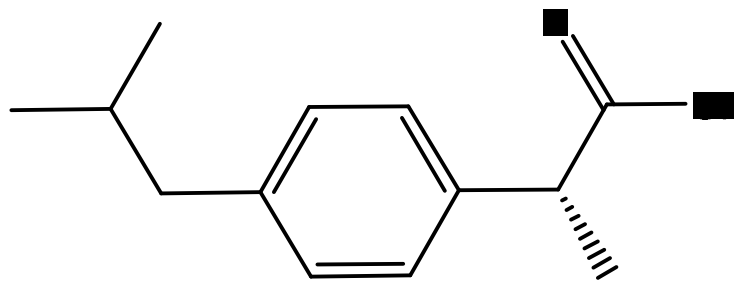
2.2.2. Deksketoprofen Trometamolün Farmakokinetik Özellikleri

Deksketoprofen gibi yüksek oranda lipofilik ilaçlar için, emilim işlemi esas olarak ilacın membranlar ve hidrofilik bölmelerden difüzyon hızı ile kontrol edilir. Deksketoprofen trometamolün oral uygulamasından sonra belirlenen belirgin dağılım hacmi yaklaşık olarak 0,243 L/kg dır. Bu hacim, plazma hacmine yaklaşır ve doku bağlanmasının önemli ölçüde plazma protein bağlanmasından daha az olduğunu gösterir. İnsanlarda deksetoprofen için, ilacın çoğu (uygulanan dozun %73,3 ila 81,9'u arasında), tedaviden sonraki ilk 12 saat boyunca idrar numunelerinde glukuronidin hidrolizinden sonra, hidroksilasyonun meydana geldiğini gösterir. Deksketoprofenin, tamamına yakını metabolize edilir. Eliminasyon o kadar hızlıdır ki, tekrar tekrar uygulandığında dahi plazmada çok az veya hiç birikme görülmez. Günde 3 kez 25 mg tekrarlanan deksetoprofenin dozları sağlıklı gönüllülerde ilaç birikimine neden olmadığı belirtilmiştir (Kapıcıoğlu,2007; Walzack,2011; Shohin, 2012).

2.3. İbuprofen

2.3.1. İbuprofenin Kimyasal Özellikleri

Molekül ağırlığı 206,3 g/mol, kapalı formülü $C_{13}H_{18}O_2$, kimyasal okunuşu (RS)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propiyonik asit olan beyaz kristal yapıda bir tozudur. Suda çözünürlüğü az, alkolde ise çok çözünen bir maddedir. Zayıf asidik özellikte bir ilaç etken maddesidir. McEvoy (1990)'in ilaç etken maddelerinin klinik kullanımlarına ait çalışmasında ibuprofenin sulu çözeltideki pKa değerini 5,2 olarak bildirilmiştir. Şekil 2.2' de ibuprofenin molekül şekli verilmiştir.



Şekil 2.2. İbuprofenin kimyasal yapısı

İbuprofen, propiyonik asit türevi bir non steroidal antiinflamatuvar ilaç etken maddesidir. Artrit, primer dismenore, grip semptomlarını azaltmak için ve analjezik etkisi için sıkça kullanılır. Farklı miktarda dozlar içeren ve farklı formülasyonlar halinde ülkemizde pek çok ticari müstahzarı vardır (Bushra ve Aslam, 2010; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01050>, Erişim tarihi: 5 Ağustos 2019).

2.3.2. İbuprofenin Farmokokinetik Özellikleri

İbuprofen en sık oral yoldan verilir, ancak aynı zamanda topikal, göz içi, intravenöz, intramüsküler ve rektal olarak da uygulamaları bulunmaktadır. Geleneksel hızlı salımlı tabletler ve sürekli salımlı preparatları ticari olarak temin edilebilir. İlaç rasemik bir karışımı olarak verilmektedir. Oral olarak dozlanan ibuprofen, yaygın olarak kullanılan dozlar için (200- 400mg) doz ile doğrusal bir ilişki gösteren plazma ilaç seviyeleri hızlı bir şekilde ve tamamen emilir. İbuprofen geniş ölçüde (> %98) terapötik konsantrasyonda plazma albüminine bağlanır. İbuprofenin primer metabolizması oksidatifdir ve sitokrom P450 enzimlerini içerir. İdrarda bulunan başlıca primer metabolitler karboksi ibuprofen ve hidroksi metabolitleri 2-OH İBU, 3-OH İBU; 1-OH İBU'dir. İBU'nun hidroksi ve karboksi metabolitlerinin görünür bir farmakolojik aktivitesi yoktur. İBU, idrarda değişmeyen ya da hiç değişmemiş ilaçla neredeyse tamamen metabolize olmaktadır. Farklı enantiyomerler tarafından alınan metabolik yollarda farklılıklar vardır; S-İBU metabolizması ağırlıklı olarak CYP2C9 ile gerçekleşirken, R-İBU CYP2C8 ile daha fazladır. İbuprofen böbrekler yoluyla hızla atılır ve atılımı tamdır. Eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık 2 saattir. İbuprofenin atılımı son dozdan sonra 24 saat içinde neredeyse tamamı vücuttan uzaklaştırılır (Davies, 1998; Davies ve ark., 2000).

2.4. Örnek Hazırlama Yöntemleri

Biyolojik, çevre, gıda örnekleri gibi farklı matriclerde bulunan organik ve anorganik türlerin hassas ve doğru tayini için gelişmiş ve teknolojik analitik cihazlar olmasına rağmen analizi yapılmak istenen analitin çok düşük miktarda bulunması ve örnek ortamının bozucu etkilerinden dolayı örnek hazırlama yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde sıklıkla başvuru alan örnek hazırlama yöntemleri genellikle ayırma ve zenginleştirme sağlayan ekstraksiyon yöntemleridir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyon yöntemleri yoğun olarak kullanılmaktadır. Birçok örnek

hazırlama yöntemi çeşitli zaman alıcı ve aşırı miktarda kimyasal kullanımı gerektiren aşamalara sahiptir. Son yirmi yılda örnek hazırlama yöntemleri, uygulanan işlemlerin kolaylığı, minimum kimyasal tüketimi, daha az zaman alması, çevre ve insan sağlığı için toksik atıklar üretilmemesi ve otomasyona imkan sağlaması yönünde bir gelişme göstermektedir (Kole ve ark., 2011; Mohammed, 2015; Vaghela ve ark.,2016; Demirci ve Özcimder, 2008).

2.4.1. Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon kısaca, bileşiklerin bir fazdan diğerine taşınması işlemidir. Ekstraksiyon işlemlerinin hızlı ve basit olması istenmekle birlikte klasik tekniklerde bu durum çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Ekstrakte edilen maddeler kayıp ve bozunmaya uğramadan elde edilmeli, ek bir saflaştırma gerektirmemeli ve artık çözücü içermemelidir. Literatürde mevcut ekstraksiyon yöntemleri;

- Çözücü ekstraksiyonu,
- Katı-sıvı ekstraksiyonu,
- Soxhlet ekstraksiyonu,
- Ultrason yardımıyla ekstraksiyon,
- Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon,
- Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu,
- Süperkritik akışkan ekstraksiyonu,
- Katı faz ekstraksiyonu (KFE),
- Bulutlanma noktası ekstraksiyonu (BNE),
- Sulu iki fazlı sistemlerde ekstraksiyon,
- Homojen sıvı-sıvı ekstraksiyonu,
- İyonik sıvılara ekstraksiyon,
- Sürekli akış sıvı-sıvı ekstraksiyonu,
- Desteklenmiş sıvı membran ekstraksiyonu,

- Mikro gözenekli membran sıvı-sıvı ekstraksiyonu,
- Mikroekstraksiyon,
- Katı faz mikroekstraksiyon,
- Sıvı faz mikroekstraksiyon,
- Asılı damla mikroekstraksiyon,
- Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon,
- Yüzen katı organik damla mikroekstraksiyon,
- Oyuk fiber sıvı faz mikroekstraksiyonu olarak bildirilmiştir (Majors, 2002; Armenta ve ark., 2008; Anastas ve Eghbali, 2010).

2.4.1.1. Sıvı Faz Ekstraksiyon Yöntemleri

Çözelti veya sıvı örneklerdeki analitler, karışmayan bir çözücüyle doğrudan dağılımla ekstrakte edilebilir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, karışmayan iki fazda bir analitin bağlı çözünürlüğüne dayanır ve denge dağılımı katsayısı tarafından yönetilir. Bir analitin ekstraksiyonu, karışmayan iki sıvı fazın çözme gücü (polarite) arasındaki farklar ile gerçekleşir (Armenta ve ark., 2008; Demirci ve Özcimder, 2008).

2.4.1.2. Sıvı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemleri

Karmaşık matrislerdeki analitlerin analizi için örnek hazırlama yöntemleri kullanılarak, analiz öncesi cihaz ile tayine uygun hale getirilir. Örnek hazırlama işlemlerinin kompleks ve zaman alıcı işlemler içermesi, fazla miktarda toksik kimyasal kullanımı, zararlı atık oluşması ve yüksek maliyete neden olur. İdeal örnek hazırlama yöntemleri basit, hızlı, maliyeti uygun ve analitik cihazlar ile uyumlu olmalıdır. Bu konudaki yapılan çalışmalar minimum organik çözücü tüketimi, örnek hazırlama işlemlerini basitleştirme ve hızlandırma şeklindedir (Dadfarnia ve Shabani, 2010). Mikroekstraksiyon yöntemlerinin avantajları; klasik sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve sıvı-katı ekstraksiyonlarında kullanılan solvent miktarının minimum düzeyde olması, buharlaştırma işlemlerine gerek duyulmaması, yüksek zenginleştirme oranı, zenginleştirmenin yanı sıra ayırma işleminin de yapılabilmesi, ekstraksiyon sonrasında alınan örneğin doğrudan gaz kromatografisi (GC) veya yüksek performanslı sıvı

kromatografisi (HPLC)'nde analiz edilebilmesi ve otomasyonun yapılabilmesi gibi özellikleri sayılabilir (Galuszka ve ar., 2013; Asadi ve ark., 2015; Hag ve ark., 2017).

2.4.1.2.1. Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon

Rezaee ve ark. tarafından geliştirilen yeni mikroekstraksiyon yöntemi dağıtıcı çözücü ile birlikte mikro litre düzeylerinde ekstraksiyon çözücüsünün kullanımına dayanmaktadır. Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi, homojen sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemlerine benzer bir üçlü çözücü sistemine dayanmaktadır. Bu yöntemde hem ön zenginleştirme hem de ayırma işlemi aynı anda gerçekleşmektedir. Kolay, hızlı, güvenilir ve geçerli bir yöntem olarak kabul edilir (Jouyban ve ark., 2015; Molaei ve ark.,2015).

Yöntemin temelini üçlü çözücü sistemi mevcuttur. Bunlar; sulu faz (analit, tampon çözelti, tuz çözeltisinden oluşan karışım), ekstraksiyon çözeltisi ve dağıtıcı (dispersif) fazdır. Yöntem hedef maddeleri içeren sulu örnek içersine dağıtıcı ve ekstraksiyon çözelti karışımının hızlı bir şekilde enjeksiyonuna dayanır. Toplam çözelti hacminin % 1–3'ünü kadar ekstraksiyon çözücüsü eklenmesiyle ekstraksiyon çözücüsünün küçük damla formlarının oluşması sağlanır. Bu adımda çözeltide bulut oluşur. Hidrofobik maddeler toplam sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilir Enjeksiyon işleminden sonra elde edilen bulutlu yapıdaki çözelti santrifüjlenir. Sonuçta yüksek yoğunlukta bir damlacık meydana gelir. Bu damlacığın içeriğinde ekstraksiyon çözeltisi içersine hapsolmuş analit bulunmaktadır. Bu şekilde ön zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmiş olur. Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak uygun enstrümantal yöntemler ile tayin edilir (Wang ve ark., 2014; Hwang ve ark., 2018).

Kullanılan ekstraksiyon çözeltisinin yoğunluğuna göre meydana gelen damlacık tüpün üst yüzeyinde veya alt kısmında toplanabilir. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin bir dalı olan, yüzen katı organik damla mikroekstraksiyonu ile organik fazın üst kısımda toplanması sağlanır. Yöntemde düşük erime noktasına sahip olan organik çözücüler kullanılmaktadır. Bu organik çözücünün küçük bir miktarı, örnek çözeltisinin yüzeyinde yüzdürülür ve çözelti belirli bir süre manyetik karıştırıcı ile karıştırılır dahasonra yüzeyde toplanan organik çözücünün donması için buz banyosunda bekletilir. Donan organik çözücünün erimesi için üst faz başka bir tüpe transfer edilir.

Daha sonra eriyen organik çözücü uygun bir çözelti ile seyreltilerek homojen bir çözelti halini alır ve analiz edilir. Bu yöntemde ekstraksiyon çözeltisi olarak güvenilir ve toksik olmayan sudan daha hafif 1–Undekanol ve 1–Dodekanol gibi hidrokarbonlarda kullanılmaktadır. Ekstraksiyon çözücüsü olarak yoğunluğu sudan ağır ve su ile karışmayan çözücüler kullanılır. Dağıtıcı çözücü olarak aseton, etanol, metanol, asetonitril, tetrahidrofuran gibi su ile karışan polar çözücüler kullanılır.

Yöntemin avantajları:

- Minimize edilmiş çözücülerle sıvı–sıvı ekstraksiyonundaki gibi yüksek hacimlerde çözücü kullanılmamış ve hem gereksiz çözücü israfından kaçınılmış hem de toksik etkiye sahip çözücülerin neden olduğu etkileri en aza indirmesi
- Yüksek zenginleştirme faktörleri sağlanması,
- Basit, pratik, hızlı ve düşük maliyetli olması olarak sayılabilir (Alshana ve ark., 2013; Saraji ve Boroujeni, 2013).

2.4.1.2.2. Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu

Bulutlanma noktası ekstraksiyon (BNE) yöntemi; uygulaması basit, çevreci, düşük maliyetli, yüksek zenginleştirme faktörü sağlayan, çoğu tayin yöntemine uyumlu bir yöntemdir. BNE yönteminde analitler surfaktan ortamına çekilir ve sonrasında bulutlama noktası sıcaklığı olarak adlandırılan bir sıcaklıkla ayrılan surfaktan faz analit içeriği bakımından uygun bir yöntemle tayin edilir (de Almeida Bezerra ve ark., 2005).

2.5. Sıvı Faz Ekstraksiyonunda Yeni Nesil Solventler: Supramoleküler Çözücüler

Supramoleküler çözücüler (SUPRAS), moleküler ve nano olmak üzere iki ölçekte meydana gelen sıralı, kendiliğinden oluşan bir işlemle amfifillerden üretilen nano yapıları ifade eden bir terimdir. Bu işlem, ilk önce, sürekli bir fazda, genellikle su içinde dağılan büyük supramoleküler agregalardan oluşan, suyla karışmayan sıvıları üreten üç boyutlu agregalar verir. Supramoleküler çözücüler iyonik olmayan yüzey aktif cisimlerin faz ayrılmaya başladığı sıcaklığı ifade etmek için farklı isimler altında ekstraksiyon işlemlerinde uzun yıllar boyunca kullanılmaktadır.




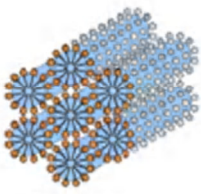



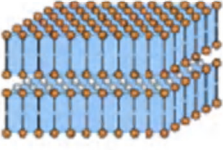

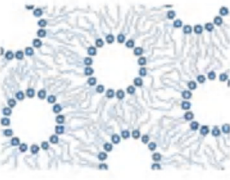
Supramoleküler çözücüler teriminin kullanılması, çözücü özelliklerine daha fazla önem verilmesi, moleküler ve iyonik çözücülerden ayırt edilmesi, moleküllerin çözücü içinde bir arada tutulduğu kovalent olmayan etkileşimleri göz önünde bulundurmaları ve

dikkate alınmaları için önem arz etmektedir. Kendiliğinden birleşim süreçleri oluşturuldukları için SUPRAS, analitik ekstraksiyonlarda organik çözücüler yerine çok çekici benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir (Ballesteros-Gómez ve Rubio, 2012; Feizi ve ark., 2017).

Supramoleküler çözücülerin ilgi çekici pek çok temel özellikleri vardır. Bu özellikleri içinde amfifillerin doğada ve kolaylıkla erişilebilir olmasını sağlayan sentetik olarak sentezi, sayılabilir. Bunun yanında çözücü özelliklerinin, amfil hidrofobik veya polar grubunu değiştirerek ayarlanabilmesi; çeşitli organik ve inorganik bileşikler için mükemmel solvasyon özellikleri sağlayan supramoleküler agregalarda farklı polarite bölgelerinin varlığı; ekstraksiyon işlemleri için ideal bir platform olan supramoleküler bir agrega içinde bulunan çoklu polar gruplar boyunca çoklu-bant yeteneğine sahip olması büyük öneme sahiptir. Ayrıca supramoleküler agregaların uçucu olmaması ve yanmama özellikleri nedeniyle daha güvenli işlemlerin uygulanmasına izin verir. Laboratuvarlarda organik çözücü kullanımını azaltılması için SUPRAS'lar birçok örnek hazırlama prosedüründe kullanılmak için mükemmel adaylar olarak görülmektedir (Lopez-Jim'enez ve ark., 2014).

2.5.1. Supramoleküler Çözücülerin Oluşumu

SUPRAS'ların amfifiller içeren homojen bir çözeltiden oluşması, sırasıyla moleküler ve nanometre seviyesinde meydana gelen iki ardışık, kendi kendine birleşme işlemi ile gerçekleşir. İlk olarak, amfipiller, kritik bir toplama konsantrasyonunun üzerinde, esas olarak sulu / ters miseller veya kesecikler olmak üzere üç boyutlu agregalar verir. Daha sonra, bu nano yapılar, kolloidal çözeltinin kütesinden yeni bir sıvı faz olarak ayrılan daha büyük agregalarda kendi kendine birleşir (yani supramoleküler çözücü) ve koaservasyon olarak bilinen bir işlem vasıtasıyla oluşur. SUPRAS amfil bakımından zengindir ve çözücünün, SUPRAS'ların ana bir bileşeni olmasına ve supramoleküler düzeneklerin dağıldığı sürekli fazı oluşturmasına rağmen, bunların kaynaklandığı çözücüyle (genellikle suyla) karışmaz. SUPRAS ile dengede olan çözücü, kritik toplama konsantrasyonunda amfil monomerlerini içerir (Ballesteros-Gómez ve ark., 2010). Şekil 2.3'te oluşan monomerlerin temsili yapıları görülmektedir. Supramoleküler monomerler; yuvarlak, silindirik, düzlemsel veziküler ve ters miseller şeklinde karşımıza çıkmaktadır.

Agregat Tipi	Sümfaktan Geometrisi	Agregat Yapısı
Yuvarlak miseller		
Silindirik miseller		
Veziküller		
Düzlemsel miseller		
Ters miseller		

Şekil 2.3. Supramoleküler agregalarının amfifillerin şekillerine göre yapısı (Ballesteros-Gómez ve ark., 2010).

2.5.2. Kendiliğinden Birleşme İlkeleri

Kendiliğinden birleşme, izole edilmiş bileşenlerin düzenli ve kendiliğinden işlevsel yapılarda organize olduğu süreçtir. Bileşenler birbirleriyle etkileyici ve itici etkileşimler dengesi yoluyla etkileşime girdiğinde oluşur. Bu etkileşimler genellikle zayıf ve kovalent bağlanma şeklide değildir (Coulomb ve hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları) ve nispeten zayıf kovalent bağlar (koordinasyon bağları) kendiliğinden

birleşme için uygun olarak kabul edilir. Birleştirilen bileşenler, uygun koşulların sağlanması koşuluyla molekülerden makroskopik ölçeklere kadar boyutlara sahip olabilir (Ballesteros-Gómez ve Rubio, 2012; Feizi ve ark., 2017).

SUPRAS'ların temel bileşenleri, sıralı yapılarda düzenlenmiş su ve amfibilerdir. İlave bileşenler, sıvı-sıvı faz ayrılmasına neden olan yardımcı ajanlardır (örn. Örnek olarak zıt iyonlar, elektrolitler, suyla karışabilen bir çözücü). SUPRAS'lerin ekstraksiyon işlemleri için olağanüstü özellikleri, onları oluşturan sıralı agregaların özel yapısından ve çözücü içinde büyük miktarda amfifil konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu iki özellik, çeşitli çözünen maddeler için SUPRAS'ların yüksek özütleme verimlerini belirler. Teorik konsantrasyon faktörleri, numune hacminin SUPRAS hacim oranı ile verilmiştir. Aynı şekilde, amfifilin yapısı ve faz ayrılmaya iten çevresel koşullar gibi diğer faktörler de ekstraksiyon verimini büyük ölçüde etkiler (Maria ve Rubio, 2017).

2.5.2.1. Sulu İyonik Olmayan Miseller

Sulu iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin sulu misellerinden oluşan SUPRAS'lar, son on yılda analitik ekstraksiyonlarda en çok kullanılanlardır. Bu liderliğin temel bir nedeni araştırmacılar tarafından alternatif uygun SUPRAS'ların geliştirilmesine yönelik çalışmalar olduğu görülmektedir. İyonik olmayan misel bazlı SUPRAS'lar geniş bir örnek ve analit yelpazesinin ekstraksiyonu için uygun oldukları görülmüştür. Uygulamalar temel olarak sırasıyla çevre, gıda ve biyolojik numunelerde poliaromatik hidrokarbonların (PAH), pestisitlerin ve biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonuna odaklanmıştır. Boyaların, endokrin bozucuların, fenollerin ve diğer organik bileşiklerin analizi için ilginç uygulamalar da geliştirilmiştir. Birçok iyonik olmayan yüzey aktif madde ticari olarak temin edilebilmesine rağmen, analitik ekstraksiyonlarda Triton X-114, Triton X-100 ve Genapol X-080 gibi kimyasallar daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik numunelerdeki biyoaktif bileşiklerin kantitatif olarak ekstraksiyonu çok daha yüksek yüzey aktif madde derişimleri (%3-10) kullanılmasına rağmen çoğu uygulamada %1 derişimdeki yüzey aktif madde kullanılmaktadır. Konsantrasyon faktörleri doğrudan numune/SUPRAS hacim oranları ve SUPRAS hacmi ile ilişkili olduğu için esas olarak numunedeki yüzey aktif madde yüzdesine bağlı olduğundan, sulu noniyonik misel bazlı SUPRAS'ları kullanarak yapılan ekstraksiyon işlemlerinde çok yüksek zenginleştirme faktörleri beklenmez (Lopez-Jiménez ve ark.,2014).

2.5.2.2. Sulu İyonik Miseller

Asit ortamında anyonik misellerin koaservasyonundan üretilen SUPRAS'lar iyonik miseller arasında en çok kullanılanlar olmuştur. Çevresel numunelerde PAH'lar, pestisitler ve yüzey aktif maddeler dahil olmak üzere çeşitli analitlerin ekstraksiyonunda başarıyla uygulanmıştır. Katyonik misellerin biyoaktif bileşiklerin ve klorofenollerin ekstraksiyonuna ilginç uygulamaları da geliştirilmiştir. Sulu misel bazlı SUPRAS'lerin rutin uygulaması için bir engel, toplam büyümenin gerçekleşmesi için 3- 4 M HCl gibi mineral asitlerin veya NaCl gibi tuzların eklendiği deneysel şartların gerekmesi olarak görülmektedir. Ancak, bu istenmeyen koşullar, toprak, çamur ve çökelti gibi çok karmaşık çevresel katı örneklerin başarılı bir şekilde çözülmesi için kullanıldığı için problem olmadığı kabul edilmiştir.

Düşük yüzey aktif madde konsantrasyonundaki sulu numunelerdeki analitler için yeterince yüksek zenginleştirme faktörlerine ulaşılabilir (Feizi ve ark., 2017).

2.5.2.3. Sulu Karışık Miseller

Sulu iyonik olmayan iyonik misellerin koagasyonu, yüklü bileşiklerin ekstraksiyonunu desteklemek için bir strateji olmuştur. Bileşenin faz ayrımı sıcaklık esas alınarak gerçekleştirilir. Tuzun varlığı ve yokluğunda Triton X-114, bu anyonik ve katyonik bileşiklerin ekstraksiyonu için sırasıyla setil trimetilamonyum bromür ve sodyum dodesil sülfat ile birlikte bu karışımlarda tercih edilen şekilde kullanılan iyonik olmayan yüzey aktif madde olmuştur. Pestisitler, biyoaktif bileşikler, boyalar, hümitik ve fulvik asitler ve patlayıcılar dahil olmak üzere çeşitli analitler çevresel ve biyolojik örneklerden ekstre edilmiştir. Düşük yüzey aktif madde konsantrasyonlarında yüksek geri kazanım ve zenginleştirme faktörü elde edilmektedir. Sulu karışık misellerin avantajları tek bir yüzey aktif cismine kıyasla daha yüksek yüzey aktiviteleri, birlikte dengeleyici ve birlikte hassaslaştırıcı özellikleri ve bazen analizde seçiciliği arttırmaları olarak sayılabilir. Dezavantaj olarak ayrılmanın gerçekleşmesi için gereken yüksek sıcaklık (yaklaşık 80 °C) sayılabilir (Ballesteros-Gómez ve ark., 2010; Lopez-Jiménez ve ark., 2014).

2.5.2.4. Ters Miseller

Ters misel bazlı SUPRAS'ların ana özellikleri, çözücü içinde solventte bulunan ve sıvı numunelere uygulanan yüksek konsantrasyon faktörlerini elde etmeyi sağlayan

yüksek amfifil konsantrasyonudur. Etkin kuvvetler, hidrojen bağları ve hidrofobiklik, ilki polar bileşikler için oldukça etkili bir çözünme mekanizmasıdır. Bu SUPRAS'ların yüksek çözünme kabiliyeti, ekstraksiyon sürelerini kısaltır. Şimdiye kadar incelenen analitler için bildirilen geri kazanımların çoğu %85'in üzerindedir (Maria ve Rubio, 2017).

2.5.2.5. Veziküler Miseller

Son zamanlarda karboksilik asit veziküllerinden meydana gelen veziküller SUPRAS'ları, meyve ve sebzelerde ve endokrin bozucularda, pestisitlerde ve fenollerde çevre su örneklerinde pestisitlerin ekstraksiyonunda başarıyla uygulanmıştır. Bu SUPRAS'ların avantajları, içerdikleri yüksek konsantrasyonlu amfifilerdir, analit çözünürlüğü için sundukları etkileşimlerin sayısı; ekstraksiyon için SUPRAS'ın kullanılmasına izin veren kinetik stabilite ve tek damla mikroekstraksiyonlarında kullanılmalarına izin veren moleküller arasındaki büyük etkileşim kuvvetleridir (Maria ve Rubio, 2017).

2.6. Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi

Katı faz ekstraksiyonu (KFE), seçici numune hazırlama için şu anda mevcut olan en popüler tekniklerden biridir. KFE 'nin çok yönlülüğü, bu tekniğin saflaştırma, eser zenginleştirme, tuzdan arındırma, türevlendirme ve sınıf fraksiyonlama gibi işlem için kullanılmasına izin verir. Son birkaç yıl bu tekniğe büyük bir ilgi göstererek karakteristik ve KFE yöntemlerini anlatan birçok çalışma yayınlanmıştır. Yeni birçok adsorban madde sentezi ve ticari olarak sunulması ile KFE metodolojisinin gelişimi hızlanmıştır. KFE'nin temel prensibi, iki faz arasında çözünen bileşenleri içeren sıvı-sıvı ekstraksiyonuna benzer. Bununla birlikte, iki karışmayan sıvı faz yerine, KFE bir sıvı (analit içeren numune matrisi veya çözücü) ve bir katı (sorbent) faz arasındaki ayrılmayı içerir (Buszewski ve Szultka, 2012).

Bu örnek hazırlama tekniği, analitlerin katı bir sorbent üzerinde adsorpsiyonla örnek çözeltilisinden uzaklaştırılması ve saflaştırılmasını sağlar. Genel prosedür katı faza bir çözelti yüklemek, istenmeyen bileşenleri yıkamak ve sonra istenen analitleri başka bir çözücü ile toplama tüpüne aktarmaktır. Uygun bir KFE ekstraksiyon sorbentinin seçimi, ilgili sorbent ve analit arasındaki etkileşimin mekanizmasını anlamaya bağlıdır. Bu anlama hem çözünen hem de sorbentin hidrofobik, kutupsal ve iyonojenik

özelliklerinin bilgisine bağlıdır. KFE'deki en yaygın tutma mekanizmaları Van der Waals kuvvetlerine, polar olmayan etkileşimlere, hidrojen bağına, dipol-dipol kuvvetlerine ve kation-anyon etkileşimlerine (iyonik etkileşimler) dayanmaktadır. Her sorbent, çok çeşitli ekstraksiyon problemlerine uygulanabilen bu özelliklerin eşsiz bir karışımını sunar (Asgharinezhad ve ark., 2015; Andrade-Eiroa ve ark., 2016).

Organik analitlerin örnek çözeltilerinden (örneğin sudan) bu KFE malzemeleri üzerine tutulması, temel olarak analit içindeki karbon-hidrojen bağları ve sorbent yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasındaki çekici kuvvetlerden kaynaklanmaktadır. Sorbent ve bileşik arasındaki kuvvetleri parçalayabilen polar olmayan çözücü, ters fazlı bir KFE tüpünden veya diskinden adsorbe edilmiş bir bileşiği çıkarmak için kullanılır. Ters faz olarak kullanılan malzemeler: karbon bazlı, polimer bazlı, polimer kaplı ve silika bazlı malzemelerdir. Karbon bazlı adsorban hem polar hem de polar olmayan matrislerden organik polar ve polar olmayan bileşikler için yüksek çekiciliğe sahiptir. Arthur ve Pawliszyn, 1990; Demirci ve Özçimder, 2008; Sarafraz-Yazdi ve Amiri 2010).

Polimer bazlı sorbentler stiren/divivinilbenzen gibi malzemelerdir. Bazı hidrofilik fonksiyonellik içeren hidrofobik bileşikler, özellikle aromatik yapıdaki analitler için kullanılır. Polimerik malzemeler neredeyse tüm matrislerde stabil olduğundan, orta düzey polaritedeki çözücülerle elüsyon adımları yapılabilir. Polimer kaplı ve bağlanmış silika adsorbanı, hidrofilik bir polimer ile kaplanmış bir hidrofobik bağlanmış silikadır. Polimer içindeki gözenekler, ilgi çeken küçük, hidrofobik organik bileşiklerin (örneğin ilaçlar), bağlanmış silika yüzeyine ulaşmalarına izin verirken, büyük bileşikler (örneğin proteinler), bağlanmış silikadan polimer tarafından tutunmaz.

Normal katı faz ekstraksiyon işlemi bir polar analit, polar olmayan bir matris (örneğin aseton, klorlanmış çözücüler ve heksan) ve bir polar sabit fazı içerir (Arthur ve Pawliszyn, 1990; Żwir-Ferenc ve Biziuk, 2006). Bir analitin normal faz koşulları altında tutunması, öncelikle analitin polar fonksiyonel grupları ile sorbent yüzeyi üzerindeki polar gruplar arasındaki etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, hidrojen bağları da, diğerlerinin yanı sıra etkileşim de etkilidir. Bu mekanizmalar ile adsorbe edilen bir bileşik, genellikle numunenin matrisinden daha polar olan bir çözücü olan bağlayıcı mekanizmayı bozan bir çözücü geçirilerek sabit fazdan ayrılır. Sabit fazdaki silisler, yüzeye bağlı polar fonksiyonel gruplara sahip kısa alkil zincirlerinden oluşur. Bu

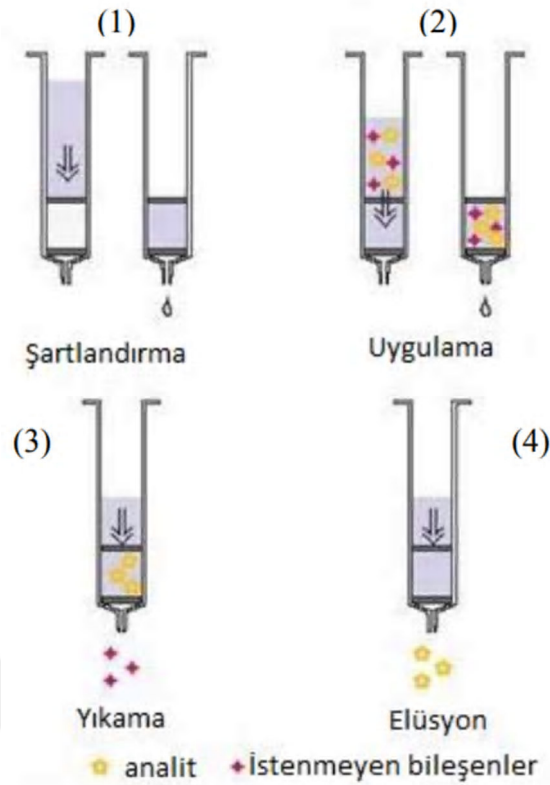
silisler, polar fonksiyonel grupları nedeniyle, bağlanmış ters faz silikalarına nispeten hidrofildir. Tipik normal faz silikalarında olduğu gibi, bu adsorban maddeler polar olmayan bileşiklerin polar olmayan matrislerden adsorbe edilmesi için kullanılabilir. Polar adsorpsiyon materyali, genellikle yaygın şekilde kullanılan modifiye silika jeldir. Bileşiklerin polar olmayan matrislerden adsorpsiyonunda yer alan fonksiyonel gruplar silika parçacıklarının yüzeyindeki serbest hidroksil grubudur. Polar olmayan bileşiklerin, orijinal numune matrisinden daha polar bir organik çözücü içinde daha sonraki elüsyonları ile polarize olmayan matrislerden adsorbe edilmesi için kullanılabilir. KFE ile bir çözeltide bulunan iyonik bileşiklerde ayrılabilir. Anyonik (negatif yüklü) bileşikler, silika yüzeyine bağlanan bir alifatik kuaterner amin grubu ile etkileşerek ayrılır. Katyonik (pozitif yüklü) bileşikler, yüzeye bağlı alifatik sülfonik asit gruplarıyla silis kullanılarak ayrılır. Bileşiğin birincil tutma mekanizması; esas olarak bileşikteki yüklü fonksiyonel grubun silika yüzeyine bağlı yüklü gruba elektrostatik etki ile bağlanmasına dayanır (Buszewski ve Szultka, 2012; Andrade-Eiroa ve ark., 2016; <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>, Erişim Tarihi: 29 Haziran 2019).

KFE'da çözelti pH'ın etkisi çok önemlidir. KFE prosedürlerinde kullanılan çözeltiler çok geniş bir pH aralığına sahiptir. Silika bazlı kolonlar genellikle 2 ila 7,5 arasında değişen bir pH aralığında çalışma koşullarına sahiptir. Bu aralığın üzerindeki ve altındaki pH değerlerinde, bağlanmış faz hidrolize olarak silika yüzeyinden ayrılabilir veya silisin kendisi çözülebilir. Bununla birlikte, KFE'de çözeltiler genellikle sorbent ile kısa bir süre için temas halindedir. KFE kartuşlarının tek kullanımlık olması ve sadece bir kez kullanılması, yöntemin bir dezavantajıdır (Arthur ve Pawliszyn, 1990; Rosenfeld, 1999; Oğuzhan ve Aksoy, 2006).

KFE'nin uygulanabilirliği esas olarak ekstraksiyon kolonunda kullanılan sorbent tarafından belirlenir. Hidrofobik ve hidrojen bağlanma enerjileri, elektrostatik etkileşim enerjileri ile karşılaştırıldığında oldukça küçüktür. Bununla birlikte, daha yüksek enerji etkileşimleri kullanılarak daha seçici bir özütlemenin yapılabileceği belirtilebilir. Günümüzde çok sayıda sorbent mevcuttur ve en sık kullanılan sorbent grubu, kimyasal olarak değiştirilmiş silika jel, polimer sorbentler, grafitlenmiş veya gözenekli karbon olarak sayılabilir (Arthur ve Pawliszyn, 1990; Pole ve ark., 2000).

2.6.1. Kolon Tekniği

Kolon tekniği ile ayrılmalarda ilk işlem olarak adsorban örnek ile uyumlu bozucu etki göstermeyen çözelti ve çözelti karışımı ile şartlandırılır. Şartlandırma işlemi adsorbanın aktive olması açısından çok önemli bir basamaktır. Şartlandırma işlemi adsorban üzerindeki kirliliklerin uzaklaştırılması ve kolon içindeki hava kabarcıklarının uzaklaştırılmasını sağlar. Bu işlem sırasında adsorbanın kurummasına izin verilmemelidir. Adsorbanın kuruması, analitlerin yeterince adsorbe olmamasına neden olur ve analitlerin geri kazanma değerlerinin düşmesi ile sonuçlanır. İkinci aşama, adsorban üzerinden analiti içeren örnek çözeltisinin geçirilmesidir. Örnek miktarları 1 mL'den 1 L'ye kadar değişebilmektedir. Örnek, kolona yerçekimi, pompalama, vakum yardımıyla ya da bir otomatik sistem ile verilebilir. Örneğin akış hızı adsorban üzerinde analitlerin yeterli tutunmasına imkân sağlayacak hızda olmalıdır. Bu aşamada analitler adsorban üzerinde tutulur. Üçüncü aşama analitleri kolondan uzaklaştırmaksızın, adsorban yüzeyinde tutulmuş olan matriks bileşenlerini uzaklaştırma için katı adsorban düşük hızda uygun bir çözücü ile yıkama işlemidir. Bu işlemde genellikle deiyonize su kullanılır. Son aşama olarak uygun bir çözücü ile analitlerin elüsyonundan oluşur. Çözücü (elüent) ile analitlerin kantitatif geri kazanılmasını sağlar. Elüent akış hızı elüsyonun sağlanması için optimum bir hıza ayarlanmalıdır. Şekil. 2.4'te kolon tekniğinin aşamaları uygulama sırasına göre verilmiştir (Macherey-Nagel Catalogue, 2004).



Şekil 2.4. Kolon tekniğinin şematik gösterimi (Oğuzhan ve Aksoy, 2006).

2.6.2. Yarı Geçirgen Disk ile Süzme Tekniği

Yarı geçirgen tutucu disk ile süzme tekniğinde örne, analit adsorbe edici özelliğe sahip bir diskten geçirilir. Diskte adsorbe olan analitler uygun bir elüent çözeltisi ile geri kazanılır ve tayin edilir (Hennion,1999; Andrade-Eiroa ve ark., 2016).

2.6.3. Çalkalama tekniği

Analizi yapılacak örnek çözeltisine, katı faz maddesi adsorban katılarak belirli süre çalkalama veya vorteksleme işlemine tabi tutulur. Çalkalama işlemi mekanik veya ultrasonik olarak yapılabilir. Adsorpsiyon dengesi sağlandıktan sonra, katı faz, süzme veya dekantasyon ile çözelti ortamından ayrılır. Katı fazdaki analitlerin uygun çözücü ile elüsyonu yapılarak geri kazanıldıktan sonra tayin edilir (Hennion,1999; Andrade-Eiroa ve ark., 2016).

2.6.4. Katı Faz Ekstraksiyon Metodunun Avantajları

KFE metodunun diğer örnek hazırlama yöntemlerine, özellikle sıvı-sıvı ekstraksiyona göre daha fazla tercih edilmesinin sebepleri ve önemli avantajları aşağıda verilmiştir.

- KFE metodu klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemine göre daha hızlı sonuç verir ve örnek hazırlama süresinin kısaltır.
- KFE, pratik ve bütün laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir bir yöntemdir. Daha az çözücü ve kimyasal madde kullanıldığından maliyeti daha düşük olabilir.
- Geri kazanım oranı genellikle daha yüksektir.
- Örnek, adsorban madde ve çözücüler arasında çapraz bulaşma riski düşük olduğundan hassas ölçümler alınabilir.
- KFE metodunda en az düzeyde evaporasyona ihtiyaç duyulur.
- Çözücü ve örneklerin az miktarlarda kullanılmasından dolayı toksik kimyasallar ile temas daha azdır ve çevreyi kirletme riski düşük düzeydedir.
- Fazla sayıda örneğin eş zamanlı ve tekrarlanabilir şekilde ekstraksiyonunun yapılabilmesine imkan sağlar ve analitik cihazlar ile otomasyonu sağlanabilir.
- Aynı zamanda adsorban maddeler sayesinde ekstraksiyon, yoğunlaştırma ve izolasyon tek uygulama ile yapılabilir (Liljegren,2005; Vasconcelos ve Fernandes, 2017; Hemmati ve ark.,2018).

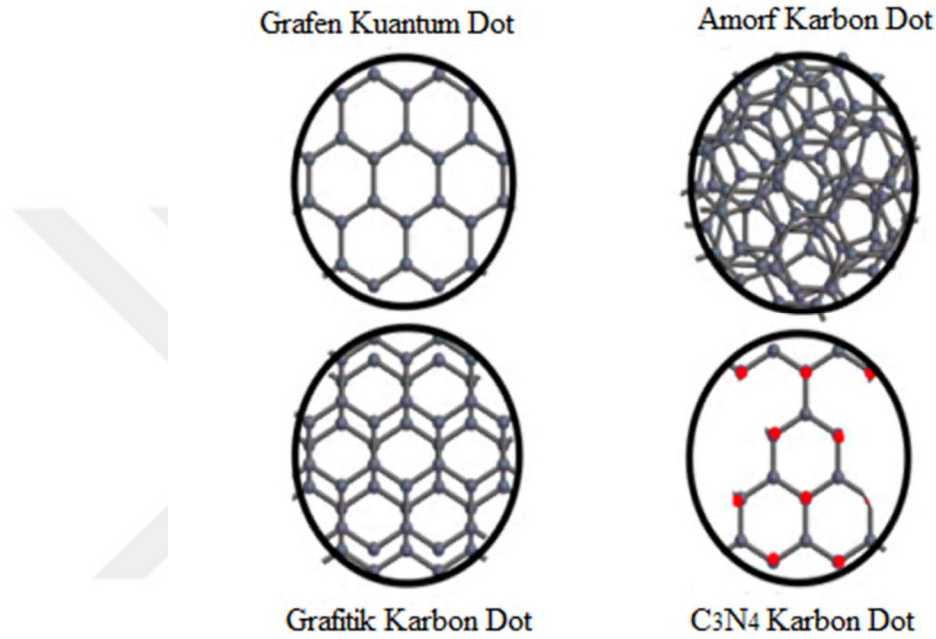
2.7. Yeni Nesil Adsorbanlar

2.7.1. Karbon Dot

2000'li yılların ortalarında keşfedilen karbon nanodotları (CD), karbon nanobiliminin en önemli ürünlerinden biridir. CD' lar, tipik olarak karbon, oksijen, azot ve hidrojenle oluşan, yaklaşık 10 nm'den daha küçük nanopartiküllerdir. Karbon dotların en önemli özellikleri olarak; ışığa kabiliyetine sahip olmaları, ucuzluğu, sentez kolaylığı, suda yüksek çözünürlük, biyouyumluluk, toksik olmaması, dış çevreye karşı yüksek sitabilite ve işaretlenmiş elektronların ayrıştırılması sayılabilir. Bu özelliklerin bir arada sunulması, optoelektronikten algılamaya kadar birçok farklı alanda CD'lerin çok geniş bir uygulama aralığında kullanılmasına izin verir. Aslında, CD'ların potansiyeli nedeniyle şu anda yılda binlerce çalışma yapılmaktadır (Wang ve ark., 2011; Sahu ve ark., 2012; Dinç ve Kara, 2018).

Karbon dotların genel yapısı çekirdek, yüzey yapıları ve sentez yöntemlerine bağlıdır. Bu durum farklı CD türlerini tasarlamak için çok çeşitli olanaklar sunar. Kristal veya amorf yapıda, çekirdeği saran yüzey kabuğu, küçük fonksiyonel gruplardan uzun atomik zincirlere kadar değişen farklı polar veya kutupsal grupları barındırabilir. Bu

değişkenliği rasyonalize etmeye çalışırken, bazı araştırmacılar mevcut CD'leri çeşitli alt tiplerde sınıflandırmaya çalışılmıştır. Her ne kadar evrensel bir sınıflama yoksa da farklı çekirdek yapılarına ve morfolojilerine dayanarak, CD tiplerinin sınıflandırılmaları yapılmaktadır. Bunlara bir örnek Şekil 2. 5'de görülmektedir (Zhang ve ark., 2014; Xiang ve ark., 2018).



Şekil 2.5. Literatürde sıklıkla belirtilen C-Dot yapılarının şematik gösterimi (Sciortino ve ark., 2018)

Eşsiz özellikleri nedeniyle, CD'lar birçok uygulama için umut vericidir. Optik olarak aktif kuantum noktalarının (QDs) C-esaslı bir eşdeğerine ek olarak, C- temelli ek bileşenlerin, özellikle de biyolojik olarak QD'lerin kullanımını sınırlayan toksik elementlerin (tipik olarak termal metal atomlar) yokluğu ile geniş bir kullanım alanı sunar.

2.7.2. Grafen ve Grafen Oksit

Grafen, altıgen bir bal peteği kafesine sıkıca bağlı, tek tabakalı tek bir karbon atomu tabakasıdır. Grafen, 0,142 nanometre moleküler bağ uzunluğuna sahip sp^2 hibritleşmesi yapmış atomların bir düzlemi şeklinde bir karbon allotropudur. Grafen katmanları, birbirlerinin üzerine istiflenmiş, 0,335 nanometrelik bir aralıklı grafit oluştururlar.

Grafit içindeki ayrı grafen katmanları, grafitten dökülmesi sırasında aşılabilecek olan van der Waals kuvvetleri tarafından bir arada tutulmaktadır (Liu ve ark., 2011).

Grafen, bir atom kalınlığında insan tarafından bilinen en ince bileşiktir ve bilinen en hafif malzemedir (1 metrekaare yaklaşık 0,77 miligramdır). Grafen, 130 GPa'lık bir çekme dayanımı ile çelikten 100-300 kat daha güçlü bir malzemedir. Oda sıcaklığında en iyi ısı iletkeni ve ayrıca bilinen en iyi elektrik iletkeni olduğu ile ilgili çalışmalar, elektron hareketliliğini 200.000 cm^2 'den daha yüksek değerlerde göstermiştir. Grafenin diğer önemli özellikleri, spektrumun görünür ve yakın kızılötesi bölümleri boyunca düzgün bir şekilde absorbe etmesidir. Karbonun insan vücudunda en bol bulunan ikinci, evrendeki dördüncü element olması nedeniyle, grafeni neredeyse sınırsız sayıda uygulama için potansiyel olarak çevre dostu, sürdürülebilir bir malzeme haline getirmektedir. Grafenin keşfedilmesinden, daha doğrusu mekanik olarak elde edilmesinden beri, farklı bilimsel disiplinlerdeki uygulamalar, özellikle yüksek frekanslı elektronik, biyolojik, kimyasal ve manyetik sensörler, ultra geniş bant genişliği fotodetektörlerinde ve enerjide büyük kazanımlar elde ederek depolama ve üretim alanlarında gelişmesine neden olmuştur (Ding ve ark.,2014; Khan ve ark.,2016).

Günümüzde grafen normalde mekanik veya termal pul pul dökülme, kimyasal buhar biriktirme ve epitaksiyel büyüme teknikleri kullanılarak üretilir. Büyük ölçekte grafenin sentezlenmesindeki en etkili yollarından biri, grafen oksidin kimyasal olarak indirgenmesidir. 2004 yılında tek katmanlı grafenin mekanik ekfoliyasyonuna ilişkin ilk rapordan bu yana, daha ucuz, daha basit, daha verimli ve daha iyi verimli bir grafen üretme yöntemi araştırılmaya başlanmıştır (Zhang ve ark., 2012; Bhaisare ve ark., 2015).

Grafit, milyonlarca grafen katmanından oluşan 3 boyutlu bir karbon bazlı malzeme olmasına rağmen, grafit oksit biraz farklıdır. Grafitin güçlü oksitleyici ajanlar kullanılarak yükseltgenmesiyle, grafit yapıda, sadece tabaka ayrılmasını genişletmekle kalmayıp aynı zamanda malzemeyi su içinde dağılabilecek şekilde hidrofilik hale getiren, oksijenli fonksiyonel grup eklenmektedir. Bu özellik, grafit oksidin, sonikasyon kullanılarak su içinde dökülmesini sağlar, sonuçta grafen oksit (GO) olarak bilinen tek veya birkaç katmanlı grafen üretir. Grafit oksit ve grafen oksit arasındaki temel fark, bu nedenle katman sayısıdır. Grafit oksit, bir grafen oksit dispersiyonunda çok katmanlı bir sistem olsada, birkaç katmanlı ve tek katmanlı pullar şeklinde bulunabilir. Grafen

oksidin avantajlarından biri, oksijen fonksiyonelliğinin varlığından dolayı su ve diğer organik çözücülerde ve ayrıca farklı matrislerde kolay dağılılabirli olmasıdır. Bu, elektriksel ve mekanik özelliklerini geliştirmeye çalışırken kullanılan malzemeye katılan seramik veya polimer matrislerle karıştırırken kolaylık sağlar. Diğer taraftan, elektriksel iletkenlik açısından, grafen oksit, sp^2 yapıştırma ağlarının bozulması nedeniyle, genellikle elektriksel bir yalıtkan olarak tanımlanmaktadır. Hegzonal altıgen yapı ve bununla birlikte elektriksel iletkenliğin geri kazanılması için, grafen oksidin azaltılması sağlanmalıdır. Oksijen gruplarının çoğunun bir kez çıkarılmasından sonra, elde edilen indirgenmiş grafen oksidin, topak oluşturma eğilimi nedeniyle dağılması daha zor olur (Abdelrahman ve ark., 2018).

Grafen oksidin işlenmesi, grafen oksidin özelliklerini temelde değiştirebilir. Elde edilen kimyasal olarak modifiye edilmiş grafenler daha sonra birçok uygulama için potansiyel olarak daha uyarlanabilir hale gelebilir. İstenilen uygulamaya bağlı olarak grafen oksidin işlevselleştirilmesinin birçok yolu vardır. Örneğin, kimyasal olarak modifiye edilmiş grafenlerin organik çözücülerde dağılılabirliğini arttırmak için grafenin organik kovalent işlevselleştirilmesi artıracak aminler eklenebilir. Ayrıca porfirin-işlevselleştirilmiş primer aminlerin ve fulleren-fonksiyonelleştirilmiş sekonder aminlerin grafen oksitlere bağlanabileceği ve sonuçta doğrusal olmayan optik performansı arttıracacağı kanıtlanmıştır. Bilim insanlarının tek katmanlı veya az katmanlı grafen oluşturmalarının en yaygın yolu, kimyasal buhar biriktirme olarak bilinen bir yöntemdir. Bu, karbon atomlarını indirgenerek karbon bakımından zengin bir kaynaktan özütleyen bir yöntemdir. Bu yöntemle ilgili asıl sorun, grafen katmanlarını büyütme için en uygun substratı bulmak ve ayrıca grafenin atomik yapısına zarar vermeden veya değiştirmeden, grafen katmanlarını substrattan çıkarmanın etkili bir yolunu geliştirmektir. Katı bir karbon kaynağından (termo-mühendislik kullanarak) büyüme, sonikasyon, açık karbon nanotüplerin kesilmesi, karbon dioksit azaltma ve ayrıca grafit oksit azaltma gibi yöntemler grafen oluşturmak için kullanılan diğer yöntemlerdir (Wu ve ark., 2011; Gaddam ve ark., 2014).

2.8. Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçların Ekstraksiyon Yöntemlerine Ait Literatür Taraması

NSAİİ'lerin ayrılması ve tayini ile ilgili literatürde; HPLC (Pawliszyn, 1995; Dietz ve ark., 2006; Yazdi ve Razavi, 2011; Breadmore, 2011; Rao ve ark., 2012), GC (Wu ve

ark., 2011, 2014) sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) (Lea ve ark., 2014; Miroshnichenko ve Baymeeva, 2018) ve kapiler elektroforez (CE) (Toasaksari ve ark., 2000; Khazeli ve ark., 2015) sıklıkla kullanılmaktadır. Bu hassas analitik ölçüm cihazlarına rağmen örnek matrisinin etkisinden dolayı numunelere örnek hazırlama işlemlerinin yapılması neredeyse zorunlu hale gelmiştir. Tablo 2.2’de son on yılda NSAİİ’lerin farklı matrislerde analizi için geliştirilen yöntemlerin kısa bir özeti verilmiştir.

Tablo 2.2. NSAİİ’lerin farklı matrislerde analiz yöntemleri ve gözlenebilme sınırları (GS)

İlaç Etken Maddeleri	Matriks	Analitik Metotlar	GS	Rf.
Asetilsalisilik Asit, Ketoprofen, Diklofenak, Naproksen, Ibuprofen	İdrar	Katı faz mikroekstraksiyon/ HPLC-UV	1,07–16,2 ng/mL	Dietz ve ark., 2011
Naproksen, Nabumeton	İdrar, Atık Su, Süt	Vorteks destekli sıvı faz mikroekstraksiyon/ HPLC-FLD	0,9-2,1 ng/L	Pawliszyn, 1995
İbuprofen, Naproksen, Diklofenak	Plazma, İdrar	Sıvıfaz mikroekstraksiyon/ GC-FID	0,24–13 ng/mL 0,06–3,30 ng/mL	Wu ve ark., 2014
Diklofenak, Ibuprofen, Ketoprofen, Naproksen, Flurbiprofen And Parasetamol	AtıkSu, Deniz Suyu	Katı faz ekstraksiyon/ GC-MS	2-5 ng/L	Wu ve ark., 2011
Ketoprofen, Ibuprofen, Diklofenac, Flurbiprofen	Serum	HPLC-UV	2,1-16,8 ng/mL	Yazdi ve Razavi, 2011
Furprofen, Indoprofen, Ketoprofen, Fenbufen, Flurbiprofen,	İdrar, Plazma	Katı faz mikroekstraksiyon- HPLC-DAD	0,03 µg/mL	Breadmore, 2011

Indometazin, Ibuprofen				
Etodolak, Naproksen, Ketoprofen, Diklofenak, Flurbiprofen	Süt, Peynir, Yoğurt,	Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon/ CE	3,0 – 13,1 g/kg	Rao ve ark., 2012
Sulindak, Indoprofen, Ketoprofen Naproksen, Flurbiprofen, Ibuprofen, Indometazin Diklofenak	Nehir Suları	Katıfaz ekstraksiyon/ CE-UV/MS	3,4–10 g/L uv, ve 0.01–0,19g/l ms	Rao ve ark., 2013
İbuprofen, Ketoprofen Naproksen	Serum	GC-FID	<10 µg/mL	Ahmadi-Jouibari ve ark., 2014
Flurbiprofen	Plazma	LC/MS/MS	0,01 µg/mL	Zhao ve ark., 2014
Valdekoksisib, Parekoksisib, Etorikoksisib, Selekoksisib, 2,5-Dimetilselekoksisib	Çevresel Su Örnekleri	Katı faz ekstraksiyon/ LC/TOF-MS	0,001-0,076 ng/mL	Wang ve ark., 2015
Ketoprofen, Fenbufen Ibuprofen	Su ve İdrar	Katı faz mikroekstraksiyon/ HPLC-DAD	0,12–0,24 ng/L	Ebrahimzad -eh ve ark., 2011
Asetilsalisilik Asit, Naproxen, Piroksikam, Diklofenak, Indometazin Mefenamik Asit	İnsan Saçı	Oyuk fiber- katı faz mikroekstraksiyon/ HPLC-DAD	0,01–0,10 g/mL	Jia ve ark., 2013

2.9. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, karışımdaki moleküllerin yüzeye veya katıya uygulandığı ve akışkanın durağan fazının (kararlı faz) bir mobil fazın yardımıyla hareket ederken birbirlerinden ayrıldığı prensibine dayanmaktadır. Bu ayırma işleminde etkili olan faktörler, adsorpsiyon (sıvı-katı), ayrılma (sıvı-katı) ve moleküler ağırlıkları arasındaki afinite veya farklılıklar ile ilgili moleküler karakteristikleri içerir. Bu farklılıklar nedeniyle, karışımın bazı bileşenleri sabit fazda daha uzun süre kalır ve diğerleri hızlı bir şekilde mobil faza geçerken ve sistemi daha hızlı bırakırken kromatografi sisteminde yavaş hareket eder.

Bu yaklaşıma dayanarak, üç bileşen kromatografi tekniğinin temelini oluşturur. Sabit faz daima katı bir fazdan veya yüzeyde katı bir destek adsorbe edilmiş bir sıvı katmanından oluşur. Hareketli faz daima sıvı veya gazlı bir bileşenden oluşur. Ayrımı yapılacak olan analit veya analitlerden oluşur (Skoog ve ark.,1992; Orbey ve ark., 2012).

Sabit faz, hareketli faz ve karışımdaki maddeler arasındaki etkileşimin türü, moleküllerin birbirlerinden ayrılmasında etkili olan temel bileşendir. Partisyona dayalı kromatografi yöntemleri, ayırma ve küçük moleküllerin amino asitler, karbonhidratlar ve yağ asitleri olarak tanımlanmasında çok etkilidir. Bununla birlikte, afinite kromatografileri (yani, iyon değişimi kromatografisi), makromoleküllerin nükleik asitler ve proteinler olarak ayrılmasında daha etkilidir. Kağıt kromatografisi, proteinlerin ayrılmasında ve protein sentezi ile ilgili çalışmalarda kullanılır; gaz-sıvı kromatografisi alkol, esther, lipid ve amino gruplarının ayrılmasında ve enzimatik etkileşimlerin gözlemlenmesinde kullanılır. Moleküler elek kromatografisi özellikle proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi için kullanılır. Agaroz-jel kromatografisi, RNA, DNA parçacıkları ve virüslerin saflaştırılması için kullanılır. Kromatografideki sabit faz, katı bir faz veya katı bir fazın yüzeyi üzerine kaplanmış bir sıvı fazdır. Sabit faz üzerinden akan mobil faz, gaz halinde veya sıvı bir fazdır. Mobil faz sıvı ise sıvı kromatografi olarak adlandırılır ve eğer gaz ise gaz kromatografisi olarak adlandırılır. Gaz kromatografisi gazlar ve uçucu sıvıların ve katı maddelerin karışımları için uygulanır. Sıvı kromatografi özellikle ısıl kararsız ve uçucu olmayan numuneler için kullanılır. Ayırma işleminden ayrı bir kantitatif analiz yöntemi olarak kullanılan kromatografi uygulamasının amacı, uygun bir zaman aralığı içinde tatmin edici bir ayrımı

sağlamaktır. Bu amaçla çeşitli kromatografi yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi (TLC), kağıt kromatografisi, gaz kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, jel geçirgenlik kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve afinite kromatografisini içerir (Bidleme, 1992; Skoog ve ark.,1992; Yardımcı, 2006).

Kromatografik yöntemler uygulama şekline göre kolon ve düzlemsel kromatografi olarak ayrılır. Kolon kromatografisinde, sabit faz kolona yerleştirilir. Hareketli faz yer çekim veya basınç altında bu sabit fazın arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografisinde ise, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur. Hareketli faz sabit faz arasından kapiler etkisiyle veya madde aktarımını sağlayan yer çekimi etkisiyle hareket eder. Her iki kromatografinin de dayandığı ilkeler aynıdır. Kromatografik yöntemleri kullanılan hareketli fazın tipine göre sınıflandıracak olursak; sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve süper kritik akışkan kromatografisi teknikleri olarak karşımıza çıkar. Kullanılan hareketli fazlar sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır. Ayrılma mekanizmalarına göre kromatografik yöntemler; adsorpsiyon, dağılma, iyon çifti, iyon değiştirme, moleküler eleme ve afinite kromatografisi şeklinde sınıflandırılır (Skoog ve ark.,1992; Meyer, 2004).

2.9.1. Adsorpsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisi, adsorpsiyon prensibine dayanan bir kromatografisi türüdür. Burada, ayırma, adsorbe edilenin adsorban ile etkileşimi üzerine kuruludur. Adsorban, adsorbe edilenin ile etkileşiminin meydana geldiği belirli gruplara sahiptir. Adsorban ve adsorbe edilen arasındaki etkileşimin gücü, yüzeydeki etkileşimin ve etkileşime giren alanların sayısına bağlıdır. Ayrımın etkinliği; molekülün mobil fazdaki çözünürlüğü ve sabit faza bağlanma kuvvetine bağlıdır. Bağlanma mukavemeti arttıkça, adsorbe edilenin adsorban tarafından geciktirir, yani moleküller yavaş hareket eder. Matris veya sabit faz alümina veya silikadan oluşabilir. Alümina asitli, bazik veya nötr olabilir, oysa silika (SiO₂) doğada asidiktir. Çözünürlük/ayrılmayı arttırmak için, yüzey ebatı aynı, yüzey alanı ise büyük olmalıdır. Yüzey alanındaki artış adsorpsiyonu artırır. Adsorban boncuklarının homojen büyüklüğü uygun bir salmastra sağlar ve daha hızlı elüsyonunu önler. Alümina boncuklarının yüzey alanı 150 elek büyüklüğündedir (155 m²/gram). Analitlerin yüzey alanının adsorbana oranı da uygun olmalıdır. Kullanılan normal

oranlar 1:10 veya 1:20'dir. Karmaşık moleküllerin daha iyi ayrılması için numunenin adsorbana oranı 1: 500 olmalıdır (Meyer, 2004).

2.9.2. Dağılma Kromatografisi

Dağılma kromatografisi inert destek malzemesine tutturulmuş veya destek katıya kimyasal olarak bağlanmış sıvı bir sabit faz ile sıvı hareketli faz arasında maddelerin dağılması esasına dayanır. Ayrılacak analitler sabit ve hareketli faz arasında dağılma katsayılarına göre dağılırlar. Bu dağılma sonucunda farklı hızlarda göçerler ve ayırma gerçekleşir. Dağılma kromatografisi sabit faz ile hareketli fazın polaritelerine göre normal faz ve ters faz sıvı kromatografisi olmak üzere iki farklı uygulaması vardır (Krstulovic ve Brown, 1982; Synder ve ark., 1997; Meyer, 2004).

2.9.2.1. Normal Faz Sıvı Kromatografisi

Sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha yüksek olduğu durumda sıvı kromatografisi normal faz olarak tanımlanır. Normal faz kromatografide kullanılan kolon dolgu maddeleri silika veya alümina, kullanılan hareketli fazlar, ise daha düşük polariteli hekzan, izo-propil, metilen klorür, metil bütil eter, kloroform ve bunların karışımları olabilir (Synder ve ark., 1997; Meyer, 2004).

2.9.2.2. Ters Faz Sıvı Kromatografisi

Sabit faz polaritesinin, hareketli fazın polaritesinden düşük olduğu kromatografik yöntemdir. Alkil zincirlerinin kimyasal olarak bağlanmasıyla oluşturulan sabit fazlardan en sık kullanılanı oktil veya oktadesil silan bağlı dolgu maddeleridir. Hareketli faz polar özellikte metanol, asetonitril veya terahidrofuran gibi çözücülerini içeren sulu çözeltilerdir (Synder ve ark., 1997; Meyer, 2004).

2.9.3. İyon Değişirme Kromatografisi

İyon değişimi kromatografisi, yüklü protein grupları ve katı destek materyali arasındaki elektrostatik etkileşimlere dayanır. Matriks, ayrılacak proteininkine zıt bir iyon yüküne sahiptir ve proteinin kolona afinitesi iyonik bağlarla elde edilir. Proteinler kolondan pH değiştirilerek, iyon tuzlarının konsantrasyonuyla veya tampon çözeltinin iyonik kuvvetiyle ayrılır. Pozitif yüklü iyon değişimi matrislerine anyon değişim matrisi adı verilir ve negatif yüklü proteinleri adsorbe eder. Olumsuz yüklü gruplarla bağlı olan matrisler katyon değişim matrisi olarak bilinir ve pozitif yüklü proteinleri adsorbe eder.

Ayrılacak madde ile sabit faz arasında ne kadar kuvvetli bağ ve elektrostatik çekim oluşursa alıkonma o kadar güçlüdür (Horvarth ve ark., 1977; Skoog ve ark., 1992 Meyer, 2004).

2.9.4. Eleme Kromatografisi

Jel-geçirgenlik (moleküler elek) kromatografisi yönteminin temel prensibi, molekül boyutlarındaki farklılıklarına bağlı olarak makromoleküllerin ayrılması için dekstran içeren materyallerin kullanılmasıdır. Bu prosedür temel olarak proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek ve protein çözeltilerinin tuz konsantrasyonlarını azaltmak için kullanılır. Jel geçirgenlik kolonunda durağan faz küçük gözenekli inert moleküllerden oluşur. Farklı boyutlardaki molekülleri içeren çözelti kolon boyunca sabit bir akış hızı ile sürekli olarak geçirilir. Gözeneklerden daha büyük olan moleküller jel partiküllerine nüfuz edemez ve sınırlı bir alanda partiküller arasında tutulurlar. Daha büyük moleküller gözenekli parçacıklar arasındaki boşluklardan geçer ve hızlı bir şekilde kolonun içinde hareket eder. Gözeneklerden daha küçük olan moleküller gözeneklere yayılır, moleküller küçüldükçe kolonu orantılı olarak daha uzun tutma süreleri ile bırakırlar. Sephadex G tipi en sık kullanılan sütun malzemesidir. Ayrıca dekstran, agoroz, poliakrilamid de kolon dolgu malzemesi olarak kullanılır (Krstulovic ve Brown, 1982; Meyer, 2004).

2.9.5. Afinite Kromatografisi

Bu kromatografi tekniği, enzimlerin, hormonların, antikorların, nükleik asitlerin ve spesifik proteinlerin saflaştırılması için kullanılır. Spesifik bir proteinle (dekstran, poliakrilamid, selüloz vb.) kompleks oluşturabilen bir ligand, kolonun dolgu malzemesini bağlar. Ligand ile kompleks yapan spesifik protein, katı desteğe (matris) tutturulur ve serbest proteinler kolondan ayrılırken kolonda tutulur. Daha sonra bağlı protein, pH'ı değiştirerek veya bir tuz çözeltisi ilavesiyle iyonik kuvvetini değiştirerek kolondan ayrılır (Krstulovic ve Brown, 1982; Meyer, 2004).

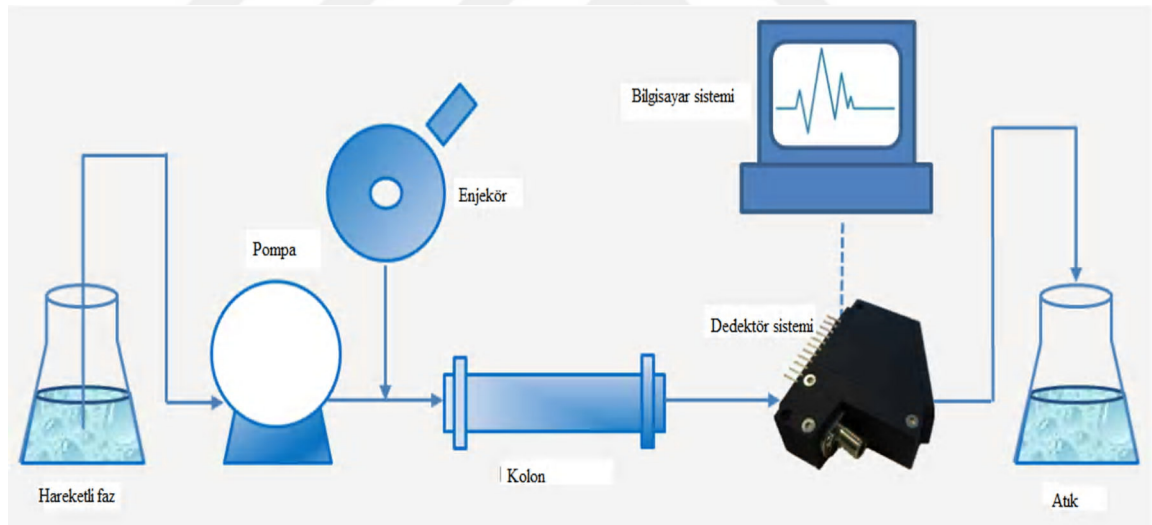
2.10. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Bu kromatografi tekniğini kullanarak, kısa sürede birçok molekülün yapısal ve fonksiyonel analizini ve saflaştırılmasını gerçekleştirilmesi mümkündür. Bu teknik, amino asitlerden ilaçlara kadar birçok bileşiğin ayrılmasında ve tanımlanmasında mükemmel sonuçlar verir. HPLC'de, mobil faz belirli bir akış hızında kolonlardan

geçer. Bu teknikte, küçük partiküllerin kullanımı ve çözücü akış hızının sabit olması nedeniyle iyi bir ayrılma gerçekleşir. Küçük partiküllerin kullanılması HPLC'nin ayrılma gücünü artırır ve analiz kısa bir süre içinde tamamlanır. Bir HPLC aygıtının esas bileşenleri, solvent deposu, yüksek basınç pompası, ayırma işleminin gerçekleştiği kolon, dedektör ve kayıt cihazından oluşur. Ayrılma süresine karşılık analit konsantrasyonuna bağlı elde edilen sinyal grafiği çizilir. Kromatogram olarak adlandırılan bu grafik yardımıyla kalitatif ve kantitatif tayin yapılabilir (Yıldız ve ark., 1997).

2.10.1. HPLC Cihazının Bölümleri

HPLC cihazının kısımları enjektör, pompa, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşur ve Şekil 2.6.'da şematik olarak gösterilmiştir. Organik çözücü ve tampondan etkilenmemesi için bütün materyal korozyona dayanıklı malzemelerden yapılır (Malviya ve ark., 2014).



Şekil 2.6. HPLC cihazı kısımlarının şematik gösterimi (<https://ibsen.com/applications/spectroscopy/high-pressure-liquid-chromatography/>, Erişim tarihi: 20 Temmuz 2019).

2.10.1.1. Pompalar

Pompalar, HPLC sisteminde sıkıca doldurulmuş kolon içinden hareketli fazın akışını sağlayan aletlerdir. Her birinin kendine göre üstünlük ve sakıncaları bulunan pistonlu, sürgülü ve pnömatik olmak üzere üç tip pompa vardır. İyi bir ayırım sağlayabilmek için pompalar bazı önemli özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Bunlar; 6000 psi'ye

kadar basınç üretmek, basıncın stabil olması, akış hızının kontrolünün iyi sağlanması, ve tekrarlanabilirliğinin iyi olmasıdır (Skoog ve ark., 1992; Thammana, 2016).

2.10.1.2. Enjektörler

İlk ve en basit numune verme sistemi şırınga ile enjeksiyondur. Bu amaçla 100 atm basınca kadar dayanıklı mikro şırıngalar kullanılır. Bu tekniğin avantajı basitliğidir. Ancak tekrarlanabilirliği nadiren %2-3'den daha iyidir. Genellikle tekrarlanabilirlik kötüdür. Günümüzde birçok sıvı kromatografisi cihazı otomatik enjeksiyon sistemine sahiptir. Otomatik enjeksiyon sistemleri 5 µL- 500 µL arasında değişen hacimlerde numune enjeksiyonu yapabilir ve tekrarlanabilirlikleri oldukça iyidir (Skoog ve ark., 1992; Thammana, 2016).

2.10.1.3. Kolonlar

Kolon, sistemin en önemli kısımlarından biri olup ayrılmanın gerçekleştiği kısımdır ve normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan imal edilir. Analitik amaçlar için kullanılan kolonlar 5-250 cm uzunluğunda ve iç çapları 4-10 mm arasında değişmektedir. Dolgu maddesinin taneciklerinin çapı ise 5-10 µm ile 35-125 µm arasında değişmektedir (Skoog ve ark., 1992; Thammana, 2016).

Sıvı kromatografisinde kullanılan en yaygın kolon dolgu maddeleri silisyum dioksit yada silisyum dioksitin modifikasyonu ile elde edilen dolgu maddeleridir. Mikrondan daha küçük boyutlardaki silisyum dioksit parçacıklarının aglomerasyonu ile, daha büyük ve yaklaşık aynı boyutlarda parçacıklar elde edilir. Hazırlanan parçacıkların yüzeyi, genellikle bu yüzeye fiziksel veya kimyasal bağlarla bağlanmış ince bir organik filmle kaplanır. Alümina parçacıkları, gözenekli polimer parçacıkları ve iyon değiştirici reçinelerde kolon dolgu maddesi olarak kullanılabilir (Skoog ve ark., 1992; Thammana, 2016).

2.10.1.4. Dedektörler

Basınç, sıcaklık, elektriksel yük, elektromanyetik ışık, gibi sinyallerin birinin değişmelerini algılayan, kaydeden veya gösteren cihazlara dedektör denir. HPLC sistemlerinde kolondan gelen maddenin tespiti ve tayininde analitin ve çözücü ortamının çeşitli özelliklerine göre cevap veren dedektörler kullanılmaktadır. Bu dedektörler;

- UV-Görünür Bölge Dedektörü (UV-VİS),
- Dizi Diyot Dedektör (DAD),
- Floresans Dedektör,
- Elektrokimyasal Dedektör,
- Refraktif İndeks Dedektörü,
- Amperometrik Dedektör ve
- Kütle Dedektörü

olarak sıralanabilir (Skoog ve ark., 1992; Thammana, 2016).

2.10.1.5. UV-Görünür Bölge ve Dizi Diyot Dedektör

Ultraviyole ve görünür bölge (UV-VIS) dedektörleri, numunedeki analitleri tespit etmek ve tanımlamak için HPLC ile kullanılan en yaygın detektörlerdir. Numunenin farklı dalga boylarında ışık absorpsiyonunu ölçerek, analit tanımlanabilir ve tayin edilebilir. UV-VIS dedektörler, nükleik asitler, proteinler, toksik ve terapötik ilaç düzeylerini tayin etmek için kullanılabilir. HPLC UV-VIS dedektörü, tek ve değişken dalga boyu olmak üzere iki türdür. Tek dalga boyu detektörleri, numunelerin tek bir dalga boyundaki absorpsiyonunu ölçerken, değişken dalga boyu detektörler, birden çok dalga boylarındaki absorpsiyonu ölçer ve bu nedenle daha seçicidir. Bir HPLC UV-VIS dedektörüne karar verirken, tek bir dalga boyunun yeterli olup olmayacağını veya değişken bir dalga boyu algılayıcısının gerekli olup olmadığını düşünülmesi gereken en önemli parametredir. Kullanılabilecek dalga boyu aralığı ve dedektörün hassasiyeti de analizin sonuçlarını oldukça etkiler (Yıldız ve ark.,1997). Diyot dizi dedektörle tayin yapılırken örnek hücre sine 190-1100 nm aralığındaki ışınlar gönderilir. Numuneden geçen ışınlar bir prizma tarafından dağıtılır. Böylece farklı dalga boylarındaki ışın farklı diyotlara düşer. Diziden elde edilen çıktı, tanımlama amacıyla standart spektrumlarla karşılaştırılabilir bir absorpsiyon spektrumu oluşturmak için kullanılır. Diyot dizisi HPLC dedektörleri, kolondan ayrılarak çıkan numunelerin UV-VİS absorpsiyon spektrumlarını kaydetmek için kullanılır. Bu spektrumlar, numuneler hakkında nitel bilgilerin toplanmasını ve standart maddelerin kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi ile kantitatif tayin sağlar. Diyot dizisi HPLC dedektörlerine ait en önemli avantaj, analiz için en iyi dalga boyunu veya dalga boylarının seçilebilme imkanıdır. Bir diyot dizisi HPLC dedektörü seçerken göz önünde bulundurulması gereken bazı özellikler arasında;

çözünürlük, dalga boyu aralığı, düşük gürültü, zemin çizgisi kararlılığı ve değiştirilebilir bir akış hücresi tasarımı bulunur. (Skoog ve ark., 1992; Thammana, 2016).

2.11. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri

Analiz metotlarının geçerliliği için yapılan testler, yöntemin istenen amaca uygun olmasını sağlayan işlemlerdir. Diğer bir tanım olarak yöntem geçerliliği; bir yöntemde deneylerin, kullanılan materyalin ve analiz cihazlarının beklenen ve doğru kabul edilen deney sonuçları elde edilmesinin ispatlanmasıdır. Analiz yöntemlerinin geçerlilik çalışmaları belirlenmiş kriterlere göre yapılmalıdır. Amerikan farmakopesine göre geçerlilik (validasyon), bir analiz yönteminin etkinliğinin çalışılan analitik yöntemde, belirlenen şartlarda sağladığını ispatlamak için yapılan işlemlerin bütünüdür (Söğüt ve Kayalı, 2005).

Bir metotla yapılan ölçümün sonuçları birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörler; laboratuvarın fiziki şartları, analitik cihazlar, kullanılan sarf malzemeler ve analizi yapan kişinin deneyimi olarak sıralanabilir. Bu nedenle yöntem sonuçlarına etki eden parametrelerin test edilerek deney sonuçlarına etkileri belirlenmelidir (Söğüt ve Kayalı, 2005; Ahuja ve Rasmussen, 2007).

Yöntem geçerlilik testlerine aşağıda sıralanan durumlarda ihtiyaç duyulur.

- Analiz yöntemi laboratuvarında ilk kez uygulandığında,
- Yeni bir yöntem ilk kez geliştirildiğinde,
- Mevcut yöntemde değişiklikler yapıldığında,
- Valide bir yöntem farklı bir laboratuvarında, farklı bir kişi veya farklı bir analitik aletle uygulandığında,
- Farklı yöntemleri kıyaslamak için, geçerlilik testleri uygulanır (Ahuja ve Rasmussen, 2007).

2.11.1. Analitik yöntem geçerlilik parametreleri

Yöntem geçerlilik parametreleri, uluslararası uyumlaştırma konferansının (ICH) insanların kullanımında kullanılan farmasötiklerin kayıtları için gerekli teknik gereksinimler, birleşik devletler farmakopesi (USP) ve Amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA) gibi ilaç üretimi ve analizinin bilimsel verileri konusunda dünyaca otorite olarak

kabul edilen kuruluşlar ve bilgi kaynaklarınca belirlenmiştir. Yeni bir analiz yönteminin geliştirilmesi aşamasında ispatlanması gereken parametreler küçük farklılıklar gösterebilir. Temel hedef ve ihtiyaçları aynıdır. Analitik yöntemin geçerliliği için kullanılan analitik parametreler;

- Doğrusallık ve sınırlar,
- Doğruluk,
- Kesinlik,
- Spesifiklik,
- Gözlenebilirlik Sınırı (Limit of Detection, LOD),
- Tayin Sınırı (Limit of Quantification, LOQ),
- Sağlamlık olarak sıralanabilir (Shabir, 2003)

2.11.2. Doğrusallık ve Sınırlar

Analitik yöntemin lineer dinamik aralığı yani doğrusallığı, örnek içindeki analitin derişimiyle doğrudan orantılı deney sonuçlarının belli bir derişim aralığında elde edilebilmesidir. Analitik yöntemin sınırları; yöntemin doğruluğu, doğrusallığı ve kesinliği kullanılarak belirlenmiş, en düşük ve en yüksek değerler arasındaki konsantrasyon farkıdır (Thompson ve ark., 2002; Shabir, 2003).

2.11.3. Doğruluk

Doğruluk bilinen derişimlerde standart maddenin analiz edilmesi ve analiz sonucunda elde edilen değerin, gerçek değere veya gerçek kabul edilen değere olan yakınlığıdır. Doğruluk sonuçları bağıl ve mutlak hata ile verilir. Bazı durumlarda örnek matrisine benzer sertifikalı standart maddeler bulunamaması nedeniyle doğruluk çalışmaları, ekleme geri kazanma çalışmaları ile yapılır ve sonuçlar % geri kazanım üzerinden hesaplanır (Thompson ve ark., 2002; Shabir, 2003).

2.11.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Kesinlik, deney sonuçlarının tekrarlanabilirlik kabiliyeti veya deney sonuçlarının birbirine yakınlığının bir ölçütüdür. Bir analitik yöntemin kesinliği genellikle bir seri ölçüm sonucunun varyansı, bağıl standart sapması veya varyasyon katsayısı olarak ifade edilir.

Tekrarlanabilirlik: Aynı çalışma şartlarında kısa bir zaman aralığından sonra kesinlik değerinin ifadesidir.

Ara Kesinlik: Laboratuvar, cihaz ve analizci gibi etkenlerin değişmesinin yönteme etki derecesini gösteren kesinlik değeridir (Thompson ve ark., 2002; Shabir, 2003).

2.11.5. Gözlenebilme Sınırı

Gözlenebilme sınırı; analitin analitik bir işleme örnekte olup olmadığının belirlenebileceği en düşük konsantrasyonudur. Gözlenebilme sınırının belirlenmesi aletli ve aletsiz olmak üzere yönteme göre değişir. ICH'a göre gözlenebilme sınırı; sinyal/gürültü oranına göre veya kalibrasyon doğrusunundan elde edilen verilere göre hesaplanır (Thompson ve ark., 2002; Shabir, 2003).

2.11.6. Tayin Sınırı

Analitik bir yöntemle analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur. Pek çok durumda tayin sınırı, gözlenebilme sınırının iki veya  katıdır (Thompson ve ark., 2002; Shabir, 2003).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, NSAİİ olan Deksketoprofen ve İbuprofenin insan kan plazmasından ekstraksiyonuna ve tayinine yönelik yeni ekstraksiyon yöntemleri geliştirmek ve Diyot sıralı dedektörlü HPLC (HPLC-DAD) cihazı ile kantitatif tayininin yapılması amaçlanmıştır. Etik kurul izni için, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'una başvuru yapılarak, ilaç dışı klinik araştırmaları için gerekli Etik Kurul Kararı; Kurulun 04. 03. 2016 tarih ve 2016/154 sayılı izni ile alınmıştır (EK-1).

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Doktora tez çalışmalarımızda kullanılan standart maddeler; deksketoprofen (\geq % 99,5 saflıkta) Deva İlaç firmasından ve İbuprofen (\geq % 99,4 saflıkta) Menarini İlaç Şirket'inden temin edildi. Kullanılan diğer kimyasal madde sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) Merck'ten, % 85'lik fosforik asit çözeltisi (H_3PO_4) ve % 28'lik NH_3 Sigma'dan, HPLC saflıktaki metanol ve HPLC saflıktaki asetonitril Carlo Erba'dan temin edildi. Dekanoik asit ve oTetrahidrofuran Merck'ten temin edildi. Grafit tozu ($<20\mu\text{m}$) ve H_2O_2 (%30 w/w) Sigma Aldirch ve KMnO_4 (%99-100,5) Merck'ten temin edildi.

Çalışmada kullanılan deiyonize su Millipore marka Elix UV 5 ve Elga Purelab Option DV 25 marka ters osmoz su sistemlerinden elde edilmiştir. Kullanılan deiyonize suyun iletkenlik değeri $20 \text{ M}\Omega$ 'dan küçüktür.

3.1.2. Cihazlar

Yapılan çalışmalarda kromatografik ayırmalar ve tayinler Agilent marka HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Sistem Agilent 1200 series /1260 infinity, pompa, degazer, oto örnekleyici (Agilent Technologies) ve DAD dedektörden oluşmaktadır. Tartımlar 0,1

mg duyarlıklı Ohaus Explorer Pro Model: EP214C analitik terazi ile yapıldı. pH ölçümleri İmolab WTW series pH 720 model pH'metre ile gerçekleştirildi. Isıtma ve manyetik karıştırma işlemlerinde Heidolph marka MR 3001 model manyetik ısıtıcı ve Bandelin Sonorex RK 52 H ultrasonik su banyosu kullanıldı. Karıştırma işlemlerinde Velp Scientifica Zx3 marka vorteks cihazı, santrifüleme işlemlerinde ise Nüve marka NF 800 santrifüj cihazı kullanıldı. Çalışmalar sırasında Nichipet marka otomatik pipetler (10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL) kullanıldı. Katı faz ayrımlarında manyetik malzemenin çözültiden ayrılması için neodimyum mıknatıs kullanıldı.

Katı faz adsorbanın karakterizasyonu için gerekli olan analizler, Erciyes Üniversitesi TAUM ve ERNAM'dan hizmet alımı ile yapıldı. Raman spektrumları Raman spektroskopisi WITec Alpha 300 M (+ micro-Raman system with 532 nm laser source) cihazı, X-ışınları difraksiyon spektrumları Bruker AXS D8 cihazı ile SEM görüntüleri ise LEO 440 SEM cihazı ile, infrared spektrumları ise Perkin Elmer 400 FT-IR cihazı kullanılarak alındı.

3.1.3. Kromatografik Tayinlerde Kullanılan Sarf Malzemeler

Kromatografik ayrımlarda Hi Chroma Ace C18, 5 µm, 150x4.6 mm i.d ve 250 mmx4,6 mm i.d. kolon kullanıldı. Oto örnekleyici vial kitleri Agilent, 1,5 mL'lik siyah renklidir.

3.1.4. Çözültülerin Hazırlanması

1000 µg/mL'lik deksketoprofen stok çözültisi için 100 mg (± 0.1 mg duyarlılıkta terazi ile) deksketopropene eşit olacak şekilde 148,5 mg standart deksketoprofen trometamol tartıldı ve 100 mL'lik balon jøjeye aktarıldı, az miktarda % 100'lük metanol eklendi. Ultrasonik banyoda 15 dakika tamamen çözünmesi sağlanıp son hacim 100 mL'ye metanol ile tamamlandı.

1000 µg/mL'lik ibuprofen stok çözültisinin hazırlanması için 100 mg ibuprofen içerecek şekilde 100,6 mg standart madde tartıldı ve 100 mL'lik balon jøjeye aktarıldı. Az miktarda % 100 'lük metanol eklendikten sonra ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edilerek tamamen çözünmesi sağlandı. Çözültinin son hacmi 100 mL'ye metanol ile tamamlandı.

Hareketli faz ve çözültülerin pH'sını ayarlamak için kullanılacak tampon çözültüler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

pH 2,0 fosfat tampon çözeltisi için 6,42 g sodyum dihidrojen fosfat tartıldı. 1000 mL balona aktarıldı ve bir miktar deiyonize suda çözüldü. 3,94 mL derişik fosforik asit çözeltisi (HPLC saflıkta) ilave edildi. Çözelti 1000 ml'lik balon jøjeye aktarıldı ve deiyonize su ile seyreltildi. Kalibre edilmiş pH metre ile tampon çözeltinin pH'ı ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandı.

pH 3,0 fosfat tampon çözeltisi için 13.68 g sodyum dihidrojen fosfat tartıldı. 1000 mL balona aktarıldı ve bir miktar deiyonize suda çözüldü. 0,830 mL derişik fosforik asit çözeltisi ilave edildi. Çözelti 1000 ml'lik balon jøjeye aktarıldı ve deiyonize su ile seyreltildi. Kalibre edilmiş pH metre ile tampon çözeltinin pH'ı ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandı.

pH 4,0 asetat tampon çözeltisi için 2,02 g sodyum asetat tartıldı. 1000 mL balon jøjeye aktarıldı ve bir miktar deiyonize suda çözüldü. 4,86 mL glasiyel asetik asit çözeltisi ilave edilip, çözelti 1000 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve deiyonize su ile seyreltildi. Kalibre edilmiş pH metre ile tampon çözeltinin pH'ı ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandı.

pH 5,0 asetat tampon çözeltisi için 8,66 sodyum asetat tartıldı. 1000 mL balon jøjeye aktarıldı ve bir miktar deiyonize suda çözüldü. 2,08 mL glasiyel asetik asit çözeltisi ilave edilip, çözelti 1000 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve deiyonize su ile seyreltildi. Kalibre edilmiş pH metre ile tampon çözeltinin pH'ı ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandı.

pH 6,0 NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 tampon çözeltisi için 12,98 g sodyum dihidrojen fosfat tartıldı. 1000 mL balona aktarıldı ve bir miktar deiyonize suda çözüldü. 2,1 g sodyum mono hidrojen fosfat eklenip, çözelti 1000 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve deiyonize su ile seyreltildi. Kalibre edilmiş pH metre ile tampon çözeltinin pH'ı ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandı.

pH 7,0 NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 tampon çözeltisi için 10,4 g sodyum dihidrojen fosfat tartıldı. 1000 mL balona aktarıldı ve bir miktar deiyonize suda çözüldü. 8,46 g sodyum mono hidrojen fosfat eklenip, çözelti 1000 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve deiyonize su ile seyreltildi. Kalibre edilmiş pH metre ile tampon çözeltinin pH'ı ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandı.

pH 8,0 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ tampon çözeltisi için 1,88 g sodyum dihidrojen fosfat tartıldı. 1000 mL balona aktarıldı ve bir miktar deiyonize suda çözüldü. 23,14 g sodyum mono hidrojen fosfat eklenip, çözelti 1000 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve deiyonize su ile seyreltildi. Kalibre edilmiş pH metre ile tampon çözeltinin pH'ı ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandı.

pH 9,0 $\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$ tampon çözeltisi için 1,7037 g amonyum klorür tartıldı. 1000 mL balon jöjeye aktarıldı ve bir miktar deiyonize suda çözüldü. 2.6 mL derişik amonyak çözeltisi ilave edilip, çözelti 1000 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve deiyonize su ile seyreltildi. Kalibre edilmiş pH metre ile tampon çözeltinin pH'ı ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandı.

pH 10,0 $\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$ tampon çözeltisi için 0,80 g amonyum klorür tartıldı. 1000 mL balon jöjeye aktarıldı ve bir miktar deiyonize suda çözüldü. 5,8 mL derişik amonyak çözeltisi ilave edilip, çözelti 1000 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve deiyonize su ile seyreltildi. Kalibre edilmiş pH metre ile tampon çözeltinin pH'ı ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandı.

3.1.5. Kan Örneklerinin Toplanması ve Hazırlanması

Deksketoprofenin insan plazmadan analizine yönelik yeni yöntem geliştirildikten sonra 25 mg dozda deksketoprofen reçete edilmiş bir kadın ve bir erkek hastadan ilaç kullanmadan hemen önce ve ilaç kullanımını takiben 0,5-1-2-4. saatlerde 3 mL kan K3 EDTA'lı kan alma tüplerine hastalardan alındı. Kan örnekleri analiz öncesinde uygun hale getirilip saklandı.

İbuprofenin insan plazmadan analizine yönelik yeni yöntem geliştirildikten sonra 400 mg dozda ibuprofen reçete edilmiş bir kadın ve bir erkek hastadan ilaç kullanmadan hemen önce ve ilaç kullanımını takiben 0,5-1-2-4. saatlerde 3 mL kan, K3 EDTA'lı kan alma tüplerine hastalardan alındı. Kan örnekleri 4000 rpm de 25 dakika santrifüj edilerek plazma ve şekilli elemanlardan oluşan kısmı ayrıldı. Ekstraksiyon öncesi plazma örnekleri -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2. Deksketoprofenin İnsan Plazmasından Analize Yönelik Supramoleküler Çözücü Temelli Sıvı Faz Mikro Ekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi

3.2.1. Deksketoprofen İçeren Plazma Örneklerinin Kromatografik Analizi

Deksketoprofenin kantitatif analizi için Barbanoj ve ark., (1998) plazmadan DKP analizi için geliştirdikleri HPLC yöntemi kısmı valide edilerek kullanıldı. Sabit faz olarak 250 mm x 4,5 mm, 5 µm lik C18 ters faz kolonu kullanıldı. Ayırmalar, 0,7 ml/dk akış hızında asetonitril: pH 3,0 (50 mM) (70: 30 v/v) karışımında izokritik elusyonla yapıldı. Örnek enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. DKP'nin analizi DAD dedektör ile 256 nm'de yapıldı.

3.2.2. SupraMoleküler Çözücüler İle Sıvı Faz Ekstraksiyon Yöntemi ve Optimizasyonu

0,5 µg/mL Derişimde deksetoprofen içeren 10 mL model çözeltisinin pH'sı, fosfat tamponu ile 3,0'e ayarlandı. 200 mg dekanolik asit (DA) ve 600 µL tetrahidrofuran (THF) eklenip 7 dk ultrasonik banyoda sonike edildi. 10 dk 4000 rpm'de santrifüjlenerek ekstraktca zengin faz ile sulu faz birbirinden ayrıldı. Santrifüj sonrası üste olan ekstraksiyon fazından altta olan sulu faz, sulu fazın enjektörle uzaklaştırılması ile birbirlerinden ayrıldı. Kalan faz mikropipetle çekilerek son hacim 500 µL olacak şekilde asetonitril ile seyreltildi. Daha sonra 0,45 µm'lik mikrofilterlerden süzülerek viallere aktarılıp HPLC cihazında ölçümleri yapıldı. Geliştirilen supramoleküler çözücü temelli sıvı sıvı mikro ekstraksiyonun optimizasyonu için pH, DA miktarı, THF miktarı, ve ultrasonik banyo süresi gibi parametreler optimize edildi.

3.2.2.1. pH Etkisi

Deksketoprofenin kantitatif olarak ekstrakte edildiği pH'nın belirlenmesi için hazırlanan model çözelti ile pH 2,0 ile 9,0 arasında pH taraması yapıldı. Her bir çalışmada çözelti pH'sı çalışılması istenilen pH'ya uygun tampon çözelti eklenerek ayarlandı.

3.2.2.2. Dekanoik Asit Miktarı

Ekstraksiyon veriminin kantitatif olarak en iyi sağlandığı DA miktarının belirlenmesi için 50-300 mg arasında DA miktarının etkisi araştırıldı. Bu amaçla taraması yapılan miktar dekanolik asit model çözeltilere eklendi ve ekstraksiyonun optimum şartları uygulandı.

3.2.2.3. Tetrahidrofuran Miktarı

En uygun dispersiyon ortamının sağlanması için THF miktarı 300-1000 µL arasında hacimlerde eklenerek ekstraksiyon için optimum THF miktarı belirlendi. Bu amaçla taraması yapılan miktar THF model çözeltilere eklendi ve ekstraksiyonun optimum koşullarında ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi.

3.2.2.4. Sonikasyon Süresi

Ekstraksiyon için yeterli sonikasyon süresinin saptanması için; optimum ekstraksiyon şartlarında model çözeltiler çalışılan sürelerde sonike edilerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi.

3.2.2.5. Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması

Optimum deneysel koşullar altında farklı konsantrasyonlarda standart deksketoprofen içeren model çözeltilerinin ekstraksiyonu yapıldıktan sonra deksketoprofen derişimleri HPLC’de yapılarak kalibrasyon doğruları elde edilmiştir.

Plazma ortamında kalibrasyon doğrusunu elde etmek için deksketoprofen içermeyen boş plazma örneklerinin 1 mL’sine, farklı konsantrasyonlarda DKP eklendi. İlaç eklenmiş plazma örnekleri, asetonitril ile plazma proteinleri çöktürülerek santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant deney tüpüne aktarılıp optimum koşullarda geliştirilen ekstraksiyon yöntemi uygulandıktan sonra DKP derişimleri HPLC ile belirlenerek kalibrasyon doğrusu elde edildi.

3.2.2.6. Geliştirilen Yöntemin Analitik Performansı

Optimum koşullar altında, geliştirilen supramoleküler çözücü temelli sıvı faz mikroekstraksiyon–HPLC yöntemi validasyon çalışmaları yapıldı. Validasyon parametreleri olarak yöntemin doğrusallık, doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası) gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı değerleri model çözelti ve plazma ortamı için ICH tarafından önerilen şekilde hesaplandı (https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf).

3.2.2.6.1. Doğrusallık Çalışmaları

Model çözelti ve plazma ortamında farklı konsantrasyonlardaki deksketoprofen içeren çözeltilerin analizi yapılarak kalibrasyon doğrularının lineer aralığı belirlenmiştir.

3.2.2.6.2. Doğruluk ve Geri Kazanım Çalışmaları

Analiz sonrasında elde edilen değerlerin gerçek değerlere yakınlığını gösteren doğruluk çalışmaları için geri kazanım yöntemi uygulandı. Geri kazanım çalışmaları ICH'ın da önerdiği gibi analizi yapılan örnekteki etkin maddelerin farklı konsantrasyonlarında standart maddeler ilave edilerek üç farklı derişimde plazma örnek çözelti hazırlandı ve aynı gün içinde geliştirilen ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak analizleri gerçekleştirildi.

3.2.2.6.3. Kesinlik Çalışmaları

Analiz sonuçlarının birbirine yakınlığını gösteren kesinlik değerleri % bağıl standart sapma (BSS) ile verildi. Gün içi kesinlik çalışmaları için; 1 µg/mL derişimde DKP içeren sulu çözeltiler ve plazma örneklerine geliştirilen yöntem uygulandı ve aynı gün içinde analizleri gerçekleştirildi ve % bağıl standart sapma değerleri hesaplandı (n=6). Günler arası kesinlik değerleri ise çözeltilerin ard arda 5 gün hazırlanması ile elde edilen çözeltilerin cevaplarının (n=5) % bağıl standart sapma değerleri ile ifade edildi.

3.2.2.6.4. Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırı

Geliştirilen ekstraksiyon ve analiz yönteminin duyarlılığının kanıtlanması amacıyla yöntemin gözlenebilme sınırı (GS) ve tayin sınırı (TS) saptandı. Geliştirilen yöntemin gözlenebilme sınırı; farklı konsantrasyonlardaki standart madde çözeltilerine ekstraksiyon işlemi uygulandıktan sonra HPLC analizleri ile kalibrasyon doğruları çizildi. Kalibrasyon doğrusunun en küçük derişimine ait sinyalin standart sapmasının, çizilen kalibrasyon doğrusunun eğimine oranının 3,3 katına eşdeğer olan derişimler DKP için gözlenebilme sınırı olarak belirlendi. Tayin sınırı ise yine aynı şekilde kalibrasyon doğrusuna ait en küçük derişim sinyaline ait standart sapmanın, kalibrasyon doğrusunun eğimine oranının 10 katına eşdeğer olan derişimler için niceleme sınırı olarak belirlendi. Gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı model çözelti ortamı ve plazma ortamı için ayrı ayrı deneyler yapılarak hesaplandı.

3.2.3. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

Gönüllü hastalardan deksketoprofen içeren farmasötik formulasyon kullanılmadan ve ilaç uygulmasını takiben 0,5-1-2 ve 4. saatlerde 3 ml kan örnekleri toplandı. Toplanan kan örnekleri 4000 rpmde 25 dk sanrifüj edilerek açık sarı plazma kısımlarının

ayrılması sağlandı. Plazma örnekleri analiz işlemleri öncesinde -20 °C'de muhafaza edildi.

Çözdürülen plazma örneklerinden 1 mL alınarak proteinleri çöktürmek amaçlı 2 mL asetronitril eklenip, santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta geliştirilen sıvı faz ekstraksiyon yöntemi uygulandı. Daha sonra örnekler HPLC-DAD ile analiz edildi.

3.3. İbuprofenin İnsan Plazmasından Ekstraksiyonuna ve Tayinine Yönelik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi

3.3.1. İbuprofenin İnsan Plazmasından Ekstraksiyonuna Yönelik Yeni Katı Faz Adsorban Sentezi

3.3.1.1. Grafen Oksit Sentezi

Grafen oksit katı işlenmemiş grafenden, Khan ve ark., (2015) tarafından önerilen sentez yöntemi ile elde edilmiştir. Bu amaçla yaklaşık 3 g ham grafit üzerine 70 ml derişik H₂SO₄ eklenip soğutularak karıştırılmaya bırakıldı. Daha sonra çözeltiye 9 g KMnO₄ yavaşça ilave edilerek 30 dk ısıtılmadan karıştırmaya devam edildi. Karışım yağ banyosunda 40° C' de kuvvetli bir manyetik karıştırıcıda karıştırmaya bırakıldı. Üzerine 150 ml deiyonize su ilave edilerek 95° C'de 15 dk karıştırıldı ve karışım üzerine 15 mL % 30'luk H₂O₂ eklendi. Reaksiyonun tamamlanması için 10 dk beklenildi. Kahve renkli ürün süzülüp asidik hale getirilmiş su ve etanol ile birkaç kez yıkandı. Elde edilen ürün 50 °C' de etüvde kurumaya bırakıldı. Sentezlenen katının Raman, FT-IR, STEM, SEM, SEM-EDX, SEM-Mapping ve XRD analizleri ERÜ TAUM ve ERNAM'dan hizmet alımı şeklinde yapıldı.

3.3.1.2. Karbon Dot Sentezi

Çalışmada kullanılan C-Dot'lar süttten elde edilmiştir. Bunun için Kayseri marketlerinden temin edilen UHT inek sütünün 25 mL alınarak üzerine 20 mL deiyonize su ilave edilmiş ve elde edilen karışım hidrotermal sentez ünitesinne aktarıldı. Sentez ortamı, teflon bir kabın, ölçülerine uygun olarak içine yerleştirildiği hidrotermal sentez reaktörü olarak adlandırılan metal bir ünitedir. Karışım 180 °C'de 12 saat reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen C-Dot'lar santrifüj işlemi ile sıvı fazdan ayrıldı, iki defa saf su ve bir defa etanol ile yıkandı ve kurutuldu. Sentezlenen katının

Raman, FT-IR, FESEM, SEM, SEM-Mapping ve XRD analizleri ERÜ TAUM ve ERNAM'da hizmet alımı şeklinde yapıldı.

3.3.1.3. Manyetik Özellikli Karbon Dot@Grafen Oksit Nanokompozitinin Sentezi Ve Karakterizasyonu

Manyetik katı faz ekstraksiyonu yönteminde adsorban olarak kullanılacak olan $Fe_3O_4@GO@C-Dot$ hibrit materyalinin sentezi için hidrotermal sentez yöntemi kullanıldı. 50 mL etilen glikol içerisinde 1 g $FeCl_3$ ve 4 g sodyum asetat çözülmüş ve elde edilen çözeltinin içerisine 0,5 g GO ve 0,5 g C-Dot ilave edildi. GO ve C-Dot partiküllerinin tüm çözelti içerisinde homojen dağıtılması için elde edilen karışım 15 dakika boyunca ultrasonik titreşime maruz bırakıldı. Elde edilen karışım hidrotermal sentez reaktörüne alınmış ve 180 °C sıcaklığa ayarlanan etüvde 8 saat boyunca reaksiyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda elde edilen $Fe_3O_4@GO@C-Dot$ partiküllerini sıvı fazdan ayırmak için mıknatıs kullanıldı. Katı fazdan ayrılmış olan su fazı atıldı. Daha sonra katı fazın üzerine 2 defa distile su eklenerek yıkama işlemi yapıldı. Ardından 1 defa da aseton ile yıkama işlemi yapılarak elde edilen manyetik $Fe_3O_4@GO@C-Dot$ hibrit materyali etüv içerisinde 75 °C'de kurutuldu. Sentezlenen katının Raman, FT-IR, STEM, SEM, SEM-EDX, SEM-Mapping ve XRD analizleri ERÜ TAUM ve ERNAM'da hizmet alımı şeklinde yapıldı.

3.3.2. İbuprofen İçeren Plazma Örneklerinin Kromatografik Analizi

İbuprofenin kantitatif analizi Bazregar ve ark.'nın (2016), İBU'nun plazmadan tayini için geliştirdikleri kromatografik yöntem kısmi valide edilerek yapıldı. Sabit faz olarak 150x4,5 mm, 5 µm lik C18 kolon, hareketli faz olarak asetonitril: pH 3,0 (50 mM) (67:33 v/v) karışımı izokritik olarak kullanıldı. Hareketli fazın akış hızı 1,0 ml/dk'dır. Enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Ölçüm 220 nm dalga boyunda yapıldı.

3.3.3. Sentezlenen Karbon Dot@Grafen Oksit Nanokompozit ile Geliştirilen KFE Yönteminin Optimizasyonu

Örnek çözeltisinde 1 µg/mL ibuprofen içerecek şekilde 10 mL sulu model çözeltiler hazırlandı. Bu çözelti kapaklı santrifüj tüpüne aktarıldı. Sentezlenen manyetik hibrid adsorban eklenerek çözelti pH'sı pH 3 tampon çözeltisi ile pH 3.0'e ayarlandı. Ekstraksiyon işleminin gerçekleşmesi için karışım 2 dk 3000 rpm'de vortekslendi. Manyetik hibrit adsorban güçlü neomidyum mıknatıs yardımı ile kolayca sıvı fazdan

ayrıldı. Adsorban üzerinde tutunan analit 2 ml etanol eklenerek 2 dakika 3000 rpm de vortekslenerek, ibuprofenin katı adsorban yüzeyinden elüent çözeltisine geçmesi sağlandı. Elüent çözeltisi 0,45 µm lik mikro şırınga filtrelerinden süzülerek HPLC cihazında ibuprofenin kantitatif analizi yapıldı. Katı faz ekstraksiyonunu optimize etmek için örnek çözeltisinin pH'sı, adsorban miktarı, elüent çözeltisi ve hacmi gibi analitik parametrelerin ekstraksiyona etkisi araştırıldı.

3.3.3.1. Örnek Çözeltisinin pH'sının Etkisi

İlaç etken maddesi ibuprofenin yeni sentezlenen manyetik grafen oksit ve manyetik hibrid nano malzemenin üzerinde tutunması ortamın pH değerine de bağlı olduğundan, maksimum adsorpsiyon için geçerli olan optimum pH aralıklarını saptamak amacıyla tampon çözelti yardımı ile farklı pH değerlerinde model çözeltiler hazırlandı. Daha sonra geliştirilen KFE yöntemine tabi tutulan örneklerin İBU derişimleri HPLC ile tayin edildi.

3.3.3.2. Adsorban Miktarının Etkisi

Maksimum analit adsorpsiyonun sağlandığı adsorban miktarını belirlemek, yöntemin sağlanmılığı ve maliyeti açısından önemli bir parametredir. Bunun için aynı şartlarda hazırlanan sulu model çözeltilere 20,0-100,0 mg aralığında farklı miktarlarda adsorban eklenerek geliştirilen KFE yöntemine tabi tutulan örneklerin İBU derişimleri HPLC ile tayin edildi.

3.3.3.3. Adsorpsiyona Vorteks Süresinin Etkisi

Çalkalama tekniği ile geliştirilen katı faz ekstraksiyon yönteminde; İbuprofenin katı malzeme yüzeyine adsorpsiyonu için gereken süre eşit derişimde İBU içeren model çözeltiler 2-10 dk arasında vortekslenerek, vortex süresinin adsorpsiyona etkisi incelendi.

3.3.3.4. Elüent Türü ve Hacminin Etkisi

Manyetik özellikli Karbon dot- grafen oksit yapıdaki hibrit nano kompozidin yüzeyine tutunan analit moleküllerinin kantitatif olarak geri kazanılması için uygun bir elüent kullanılması gerekmektedir. Elüsyon işlemini gerçekleştirmek amacıyla geliştirilen KFE metodunun optimum şartları uygulandıktan sonra elüent olarak etanol, metanol, asetonitril, hareketli faz karışımı, deiyonize su, aseton, etilen glikol ve pH 10.0 tamponu (10 mM) ayrı ayrı denenerek en uygun elüent çözeltisinin hangisi olduğu araştırıldı.

3.3.3.5. Elüsyon İşlemine Vorteks Süresinin Etkisi

İBU'nu adsorban yüzeyinden kantitatif elüsyonu için gereken süre eşit derişimde İBU içeren model çözeltilerin adsorpsiyonu tamamlandıktan sonra aynı hacimlerdeki elüsyon çözeltilisinin 2-10 dk arasındaki farklı sürelerde vortekslenerek, en uygun vorteks süresi belirlendi.

3.3.3.6. Katı Adsorbanın Tekrar Kullanılabilirliği

Geliştirilen hibrit malzemenin tekrar kullanılabilirliği ve adsorbanın geri kazanım değerleri, arıtma işlemini ekonomik hale getirecektir. Yeni geliştirilen manyetik malzemenin tekrar kullanılabilirliği ve stabilitesi, model çözeltiler hazırlanıp en az 15 defa olacak adette tekrar tekrar kullanılarak kontrol edildi.

3.3.3.7. Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması

Optimum deneysel koşullar altında farklı konsantrasyonlarda standart İbuprofen içeren model çözeltilerinin ekstraksiyonu yapılarak İBU derişimleri HPLC ile tayin edilerek kalibrasyon doğrusu elde edildi. Plazma ortamında kalibrasyon doğrusunu elde etmek için İbuprofen içermeyen boş plazma örneklerinin 0,5 mL'sine, farklı konsantrasyonlarda İBU eklendikten sonra plazma örneklerinin proteinleri, asetonitril ile çöktürülerek santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant deney tüpüne aktarılıp optimum koşulları belirlenen ekstraksiyon yöntemi uygulanıp, HPLC ile kantitatif analizleri yapılarak kalibrasyon doğrusu elde edildi.

3.3.3.8. Geliştirilen Katı Faz Yönteminin Analitik Performansı

Optimum koşullar altında, geliştirilen supramoleküler çözücü temelli sıvı faz mikroekstraksiyon-HPLC yöntemi validasyon çalışmaları yapıldı. Validasyon parametreleri olarak yöntemin doğrusallık, doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası) gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı değerleri model çözeltili ve plazma ortamı için The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) tarafından önerilen şekilde hesaplandı (https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf).

3.3.3.8.1. Doğrusallık Çalışmaları

Model çözeltili ve plazma ortamında farklı konsantrasyonlardaki ibuprofen içeren çözeltilerin analizi yapılarak kalibrasyon doğrularının lineer aralığı belirlendi

3.3.3.8.2. Doğruluk ve Geri Kazanım Çalışmaları

Analiz sonrasında elde edilen değerlerin gerçek değerlere yakınlığını gösteren doğruluk çalışmaları için geri kazanım yöntemi uygulandı. Geri kazanım çalışmaları ICH'ında önerdiği gibi analizi yapılan örnekteki etkin maddelerin farklı konsantrasyonlarında standart maddeler ilave edilerek üç farklı derişimde plazma örnek çözelti hazırlandı ve aynı gün içinde geliştirilen ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak analizleri gerçekleştirildi.

3.3.3.8.3. Kesinlik Çalışmaları

Analiz sonuçlarının birbirine yakınlığını gösteren kesinlik değerleri % bağıl standart sapma (BSS) ile verildi.

Gün içi kesinlik çalışmaları için; 1 µg/mL derişimde İBU içeren sulu çözeltiler ve plazma örneklerine geliştirilen yöntem uygulandı ve aynı gün içinde analizleri gerçekleştirildi ve % bağıl standart sapma değerleri hesaplandı (n=6). Günler arası kesinlik değerleri ise çözeltilerin ard arda 5 gün hazırlanması ile elde edilen çözeltilerin cevaplarının (n=5) % bağıl standart sapma değerleri ile ifade edildi.

3.3.3.8.4. Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırı

Geliştirilen ekstraksiyon ve analiz yönteminin duyarlılığının kanıtlanması amacıyla yöntemin GS ve TS hesaplandı. Geliştirilen yöntemin gözlenebilme sınırı; farklı konsantrasyonlardaki standart madde çözeltilerine ekstraksiyon işlemi uygulandıktan sonra HPLC analizleri ile kalibrasyon doğruları çizildi. Kalibrasyon doğrusunun en küçük derişimine ait sinyalin standart sapmasının, çizilen kalibrasyon doğrusunun eğimine oranının 3,3 katına eşdeğer olan derişimler İBU için gözlenebilme sınırı olarak belirlendi. Tayin sınırı ise yine aynı şekilde kalibrasyon doğrusuna ait en küçük derişim sinyaline ait standart sapmanın, kalibrasyon doğrusunun eğimine oranının 10 katına eşdeğer olan derişimler için niceleme sınırı olarak belirlendi. Gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı model çözelti ortamı ve plazma ortamı için ayrı ayrı deneyler yapılarak hesaplandı.

3.3.3.9. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

Gönüllü hastalardan İbuprofen içeren farmasötik formulasyon kullanılmadan ve ilaç uygulamasını takiben 0,5-1-2 ve 4. saatlerde 3 ml kan örnekleri toplandı. Toplanan kan

örnekleri 4000 rpmde 25 dk sanrifüj edilerek açık sarı plazma kısımlarının ayrılması sağlandı. Plazma örnekleri analiz işlemleri öncesinde -20 °C' de muhafaza edildi.

Çözdürülen plazma örneklerinden 0,5 ml alınarak proteinleri çöktürmek amaçlı 1 mL asetonitril eklenip, santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta geliştirilen sıvı faz ekstraksiyon yöntemi uygulandı. Daha sonra örnekler HPLC-DAD ile analiz edildi.

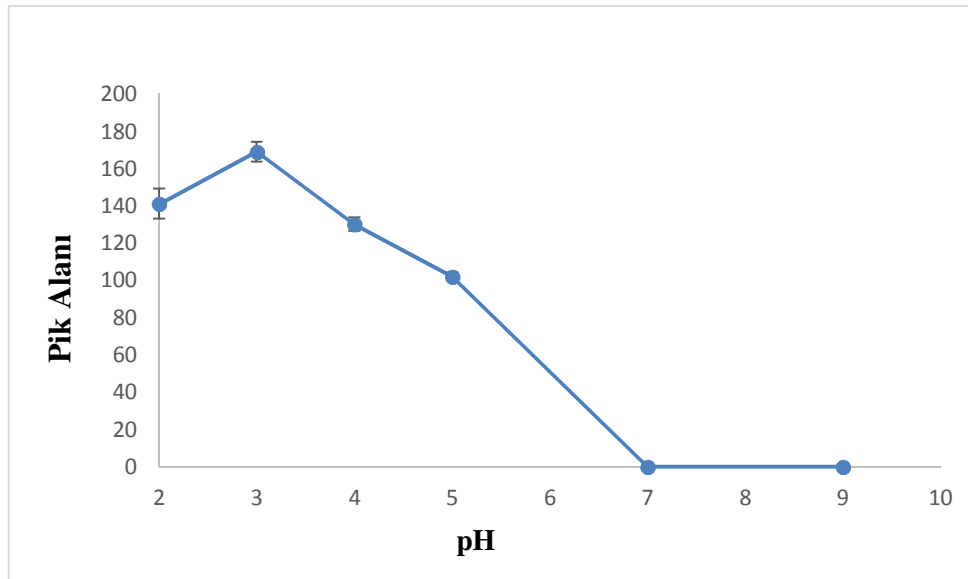


4. BULGULAR

4.1. Deksketoprofenin İnsan Plazmasından Analize Yönelik Supramoleküler Çözücü Temelli Sıvı Faz Mikro Ekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi ve HPLC ile tayini

4.1.1. Örnek Çözeltilisinin pH'sının Etkisi

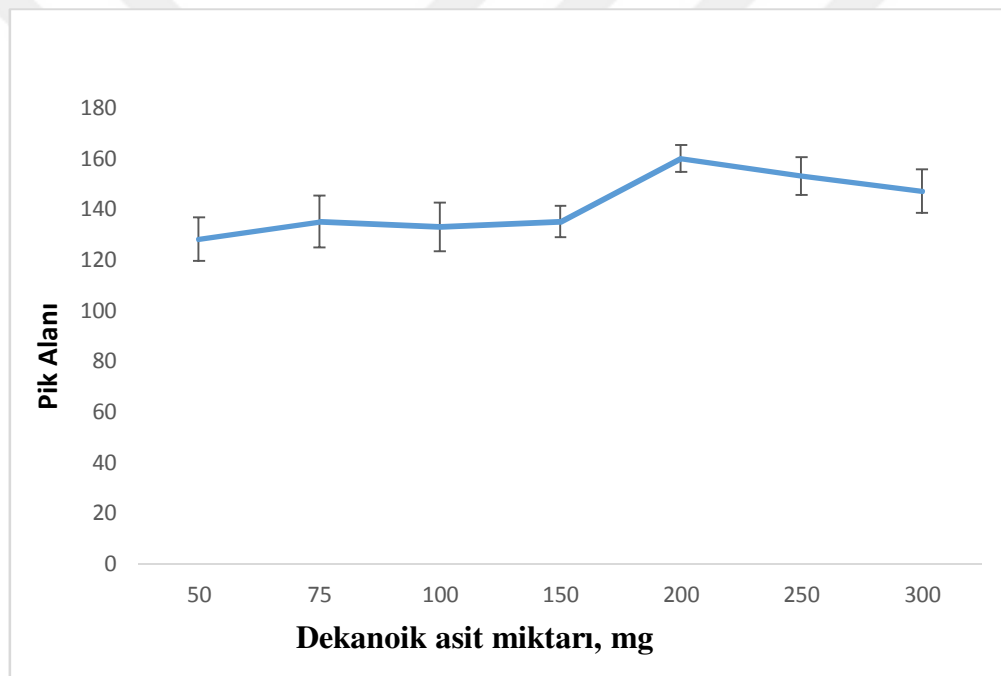
DKP'nin geri kazanma verimine örnek pH'sının etkisi pH 2,0-9,0 aralığında incelendi. Elde edilen sonuçlar pH değişimine karşılık pik alanı olarak Şekil 4.1.'de verildi. DKT sulu ortamda 4,41 pKa değerine sahip zayıf asidik özellikte bir etken madde olmasından dolayı pH 2,0-4,0 arasında noniyonik formunun etkin olmasından sebeple kromatogramda DKT'ye ait pik sinyalinin en yüksek değere sahip olması beklenmektedir. pH 4,0'ten sonra pik alanları hızla düşmektedir. pH 7,0 ve 9,0 'da yapılan deneylerde ekstraksiyon fazları gözlenmesine rağmen kromatogramda DKP'ye ait pik sinyali elde edilemedi. Pik alanının en yüksek olduğu ve standart sapma değerinin yüksek olmadığı pH 3,0 optimum çalışma pH'sı olarak seçildi.



Şekil 4.1. Deksketoprofenin geri kazanımına pH'nın etkisi(n=3)

4.1.2. Dekanoik Asit Miktarı

Supramoleküler çözücü olarak kullanılan dekanoik asit miktarı ekstraksiyon verimini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Optimum DA miktarını belirlemek amacıyla 100-300 g arasında DA ilavesiyle ekstraksiyon çalışmaları yapıldı. Elde edilen sonuçlar dekanoik asit miktarına karşılık ekstraksiyon sonrası deksketoprofen'in pik alanına karşılık olarak Şekil.4.2.'de gösterildi. En uygun kantitatif geri kazanımın 200 mg DA miktarında yapıldığı belirlenmiştir. Bu nedenle optimum DA miktarı 200 mg olarak belirlendi.

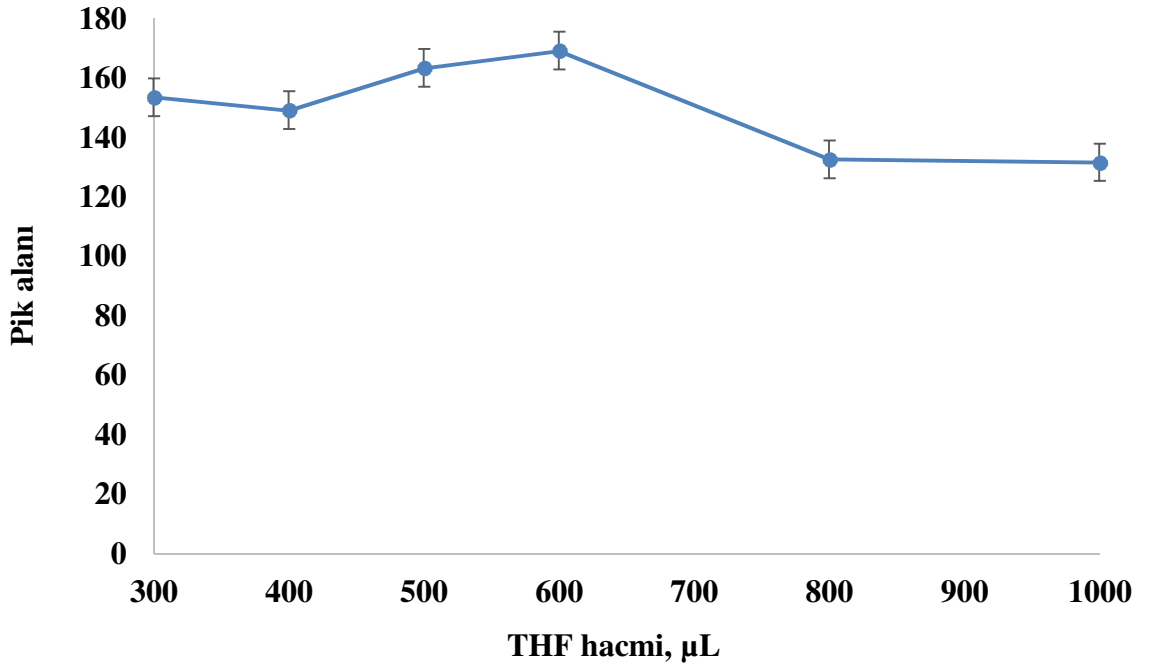


Şekil 4.2. Deksketoprofenin geri kazanımına dekanoik asit miktarının etkisi (n=3)

4.1.3. Tetrahidrofuran Miktarı

Supramoleküler çözücü çiftinde dekanoik asit için en uygun dispersiyon sağlayan ve ters misel oluşumunu en hızlı sağlayan kimyasal literatürde tetrahidrofuran olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle DKP'nin geri kazanımına THF hacminin etkisini incelemek amacıyla 300-1000 µL hacimlerde THF eklenerek deneyler yapıldı. THF miktarının geri kazanıma etkisi; THF miktarına karşılık ekstraksiyon sonrası

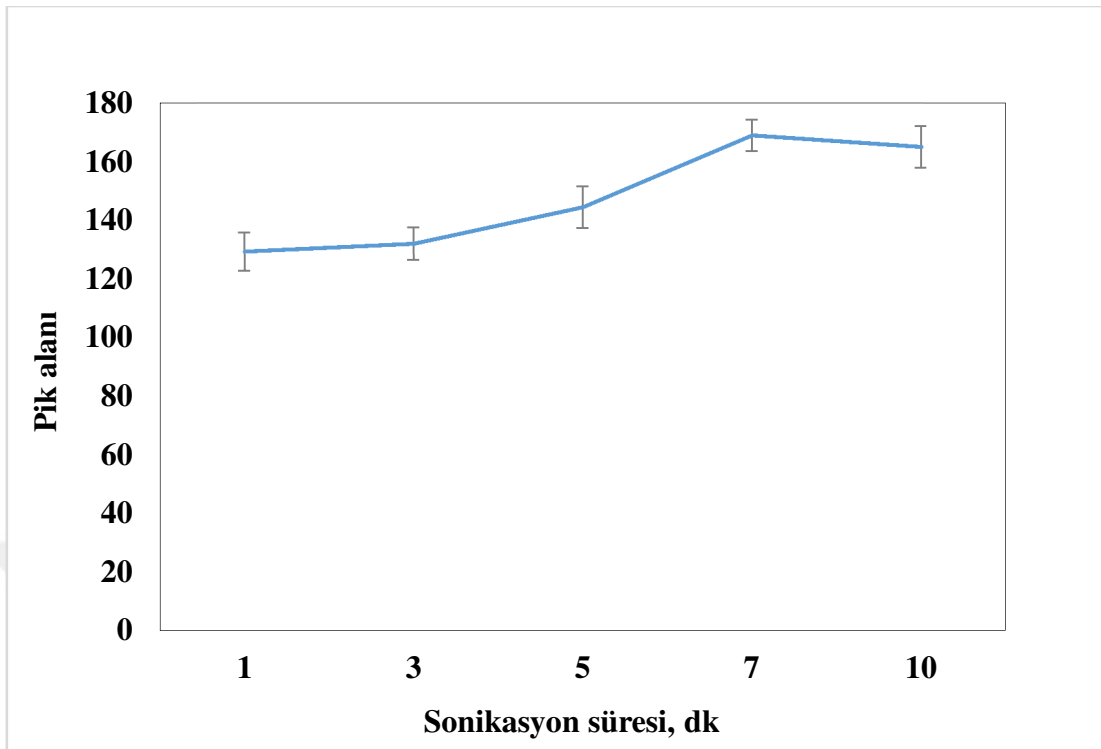
deksketoprofen'in pik alanı olarak Şekil. 4.3.'de gösterilmektedir. Optimum THF miktarı 600 μ L olarak belirlendi.



Şekil 4.3. Deksketoprofenin geri kazanımına THF hacminin etkisi (n=3)

4.1.4. Sonikasyon Süresi

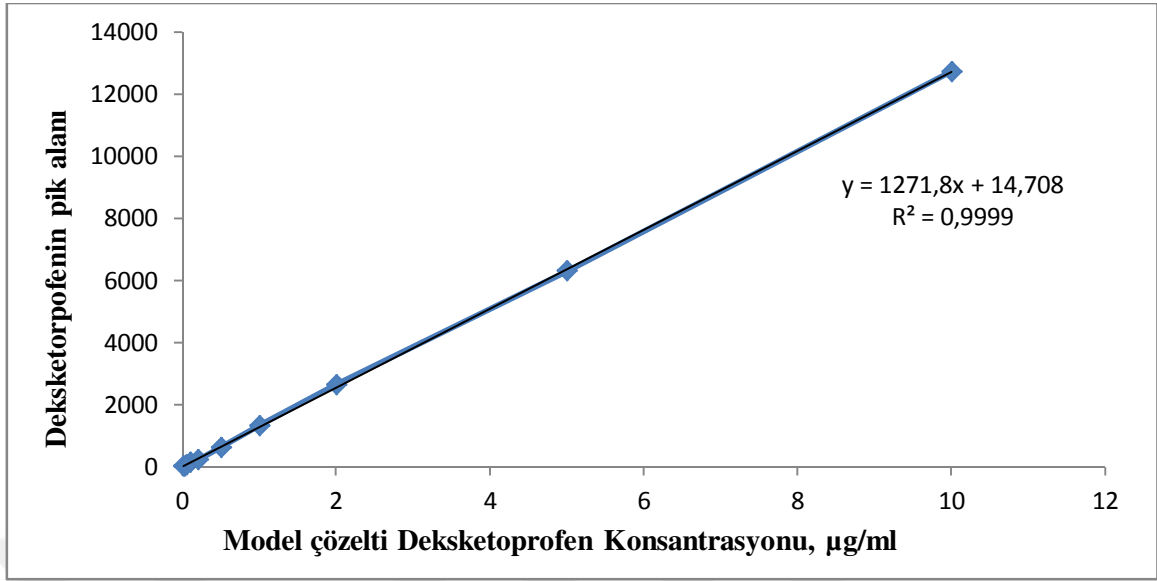
Geliştirilen yöntemde örnek ortamıyla ekstraksiyon fazının kantitatif olarak yeterince etkileşmesi ve DKP'nin ekstraksiyon fazına hızlı bir şekilde geçmesi için sonikasyon işlemi yapıldı. Sonuçlar Şekil 4.4'de verildi. En yüksek pik alanlarının 5 dakika ve üstünde sonikasyon süresi ile yapılan ekstraksiyon işleminde sağlandığı görüldü. Bu nedenle optimum sonikasyon süresi 7 dk olarak belirlendi.



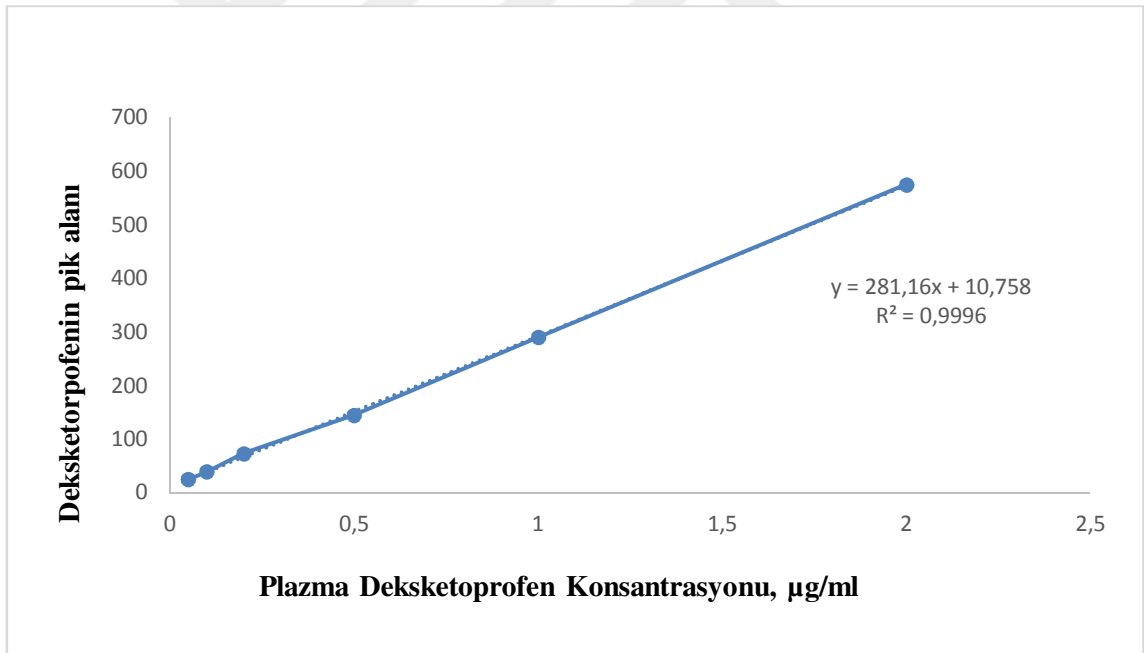
Şekil 4.4. Deksketoprofenin geri kazanımına sonikasyon süresinin etkisi (n=3)

4.1.5. Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması

Optimum deneysel koşullar altında farklı konsantrasyonlarda standart deksetoprofen içeren sulu model çözeltilerinin ve ilaç içermeyen plazma örneklerine yine farklı konsantrasyonlarda standart deksetoprofen eklenerek hazırlanan model plazma örneklerinin ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraksiyon sonrası deksetoprofen miktar tayinleri HPLC ile yapılarak kalibrasyon doğrularını elde edildi. Sulu ortam ve plazma ortamına ait kalibrasyon doğruları Şekil 4.5. ve 4.6.'da verildi. Supramoleküler çözücü temelli ekstraksiyon yönteminin analitik validasyonu ve gerçek örnek analizleri bu şekilde türetilen kalibrasyon doğruları kullanılarak yapıldı.



Şekil 4. 5. Sulu model çözeltilerden geliştirilen ekstraksiyon yöntemi sonrası elde edilen kalibrasyon doğrusu

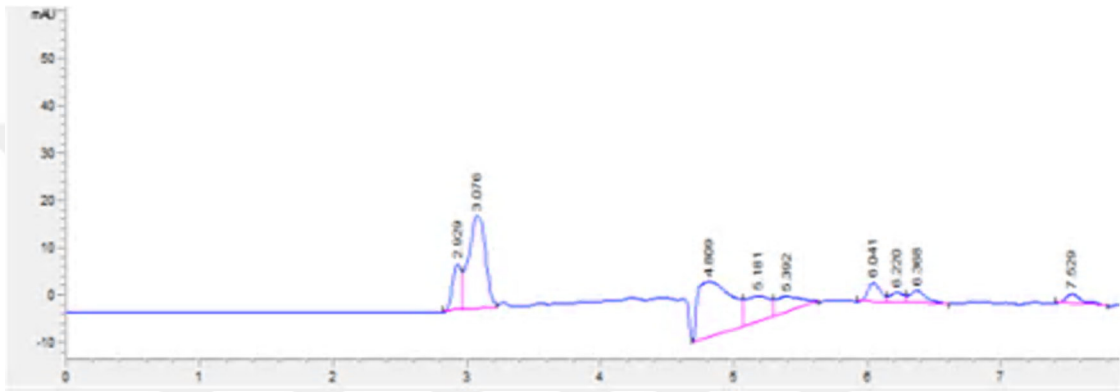


Şekil 4.6. İlaç içermeyen plazma örneklerine DKP ilavesiyle hazırlanan standart örneklerin geliştirilen ekstraksiyon yöntemi ile analizleri sonucu elde edilen kalibrasyon doğrusu

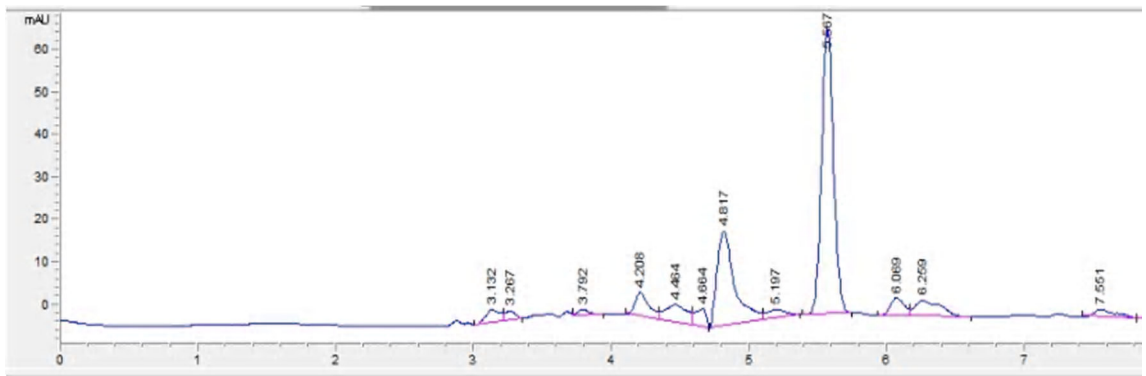
4.1.6. Deksketorprofen İçeren Plazma Örneklerinin Kromatografik Analizi

Deksketorprofenin model çözeltileri için litertürden Barbanoj ve ark., (1998) tarafından geliştirilen ve DKP'in plazmadaki analizi için kullandıkları yöntem seçildi. Geliştirdiğimiz yöntemin plazma örneklerinin kromatografik analizler için uygunluğu

ve verimliliği ilaç içeren plazma örnekleri proteinleri çöktürüldükten sonra HPLC ile analizi yapılarak incelendi. Şekil 4.7’ de standart DKP ilave edilmiş plazma örneğinin direkt analizine ait kromatogram görülmektedir. Herhangi bir ekstraksiyon işlemi yapılmadan DKP’ye ait pik gözlenememiştir. Şekil 4.8’de standart DKP ilave edilmiş plazma örneğinin geliştirilen sıvı faz yöntemi ile ekstraksiyonuna ait kromatogram görülmektedir. Geliştirilen yöntem ile DKP’nin pik sinyali 5,6. dakikada görülmektedir.



Şekil 4.7. Standart DKP ilave edilmiş plazma örneğinin direkt analizine ait kromatogram



Şekil 4.8. Standart DKP ilave edilmiş plazma örneğinin geliştirilen sıvı faz yöntemi ile ekstraksiyonuna ait kromatogram

4.1.7. Geliştirilen Yöntemin Analitik Performansı

Optimum koşullar altında, geliştirilen supramoleküler çözücü temelli sıvı faz mikroekstraksiyon HPLC yöntemi için doğrusallık, kesinlik (gün içi ve günler arası), korelasyon katsayısı, gözlenebilirlik sınırı ve tayin sınırı değerleri Tablo. 4.1.’de verildi

Tablo 4.1. Supramoleküler çözücü temelli sıvı faz ekstraksiyon yönteminin model çözelti ve plazma ortamında analitik performansı

Model Çözelti Ortamı		Plazma Ortamı	
Analitik performans	Değerler	Analitik performans	Değerler
Doğrusallık, µg/mL	0,01-10,00	Doğrusallık, µg/mL	0,05-2,00
Gün içi kesinlik, % BSS (n=6)	1,2	Gün içi kesinlik, % BSS (n=6)	1,7
Günler arası kesinlik, % BSS (n=6)	2,6	Günler arası kesinlik, % BSS (n=6)	3,7
Tayin katsayısı	0,9999	Tayin katsayısı	0,9996
Gözlenebilme sınırı, ng/mL	0,8	Gözlenebilme sınırı, ng/mL	12,8
Tayin sınırı, ng/mL	2,4	Tayin sınırı, ng/mL	38,8

Bu yöntemin doğruluk çalışmaları için daha önce deksketoprofen kullanılmayan gönüllü hastalardan alınan plazma numuneleri üzerinde ekleme/geri kazanma çalışmaları yapıldı. Plazma örneklerine farklı miktarlarda deksketoprofen eklenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.2.'de verilmiştir.

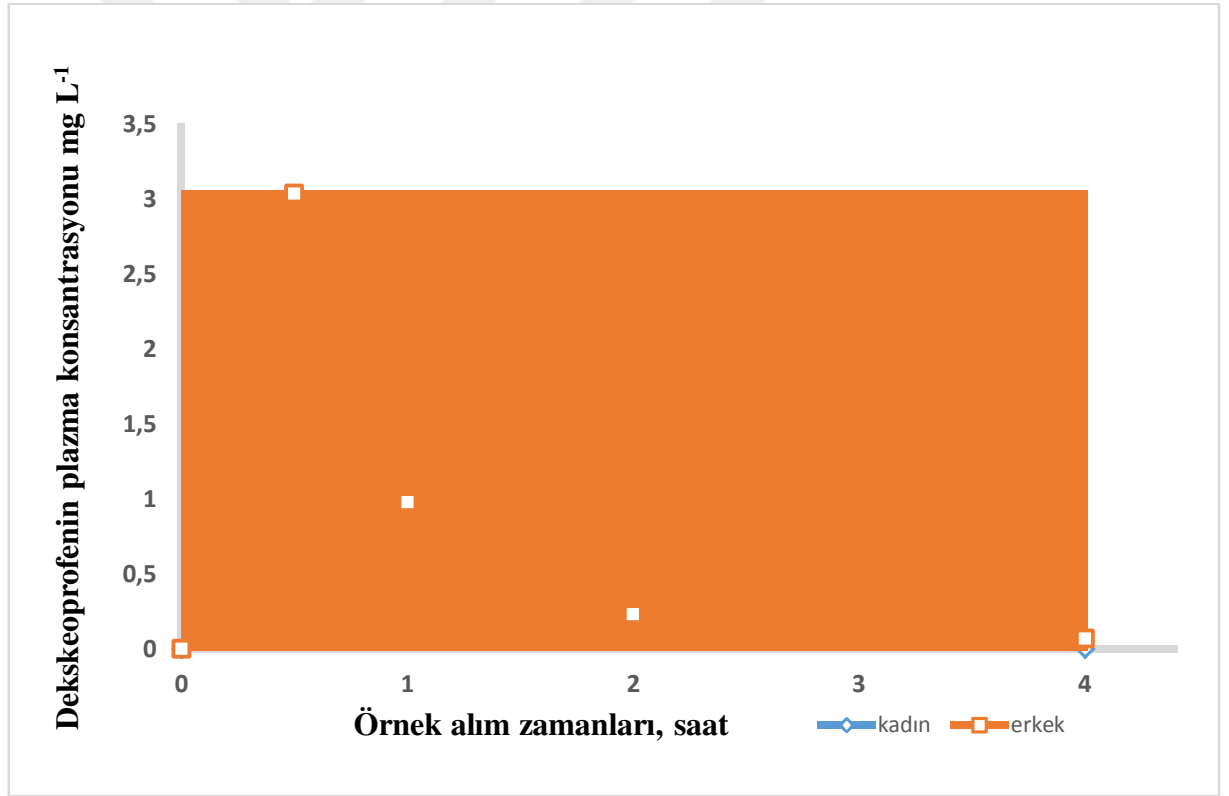
Tablo 4.2. Geliştirilen yöntemin insan plazmasına uygulanması ve geri kazanım sonuçları (n=5).

Örnek	Eklenen miktar µg/mL	Bulunan miktar µg/mL	% Geri kazanım
Plazma	0,0	0,0	TSA*
	0.75	0.73±0.02	97±3
	1.00	0.98±0.03	98±3
	1.50	1.50±0.06	100±4

TSA: Tayin Sınırının Altında

4.1.8. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

Bu amaçla, gönüllü hastalardan (23 yaşında bir erkek ve 29 yaşında bir kadın) 25 mg DKP kullanan ve farklı ilaçlar kullanan ve koaservatif mikro-ekstraksiyon yöntemine tabi tutulan farklı zaman aralıklarında alınan kan örnekleri. Daha sonra örnekler HPLC-DAD ile analiz edildi. Plazma numunelerindeki DKP konsantrasyonundaki değişiklikler, Şekil 4.9'da verildi. Sonuçlar, plazma numunelerindeki DKP konsantrasyonunun 30 dakika içinde maksimuma ulaştığını, ardından hızlı bir şekilde düştüğünü ve günlük aktivitelerle 4 saat sonra tükenme noktasına geldiğini gösterdi. Elde edilen kan plazma profilleri literatürdeki DKT plazma konsantrasyonları ile uyumludur (Barbanoj ve ark., 2001).



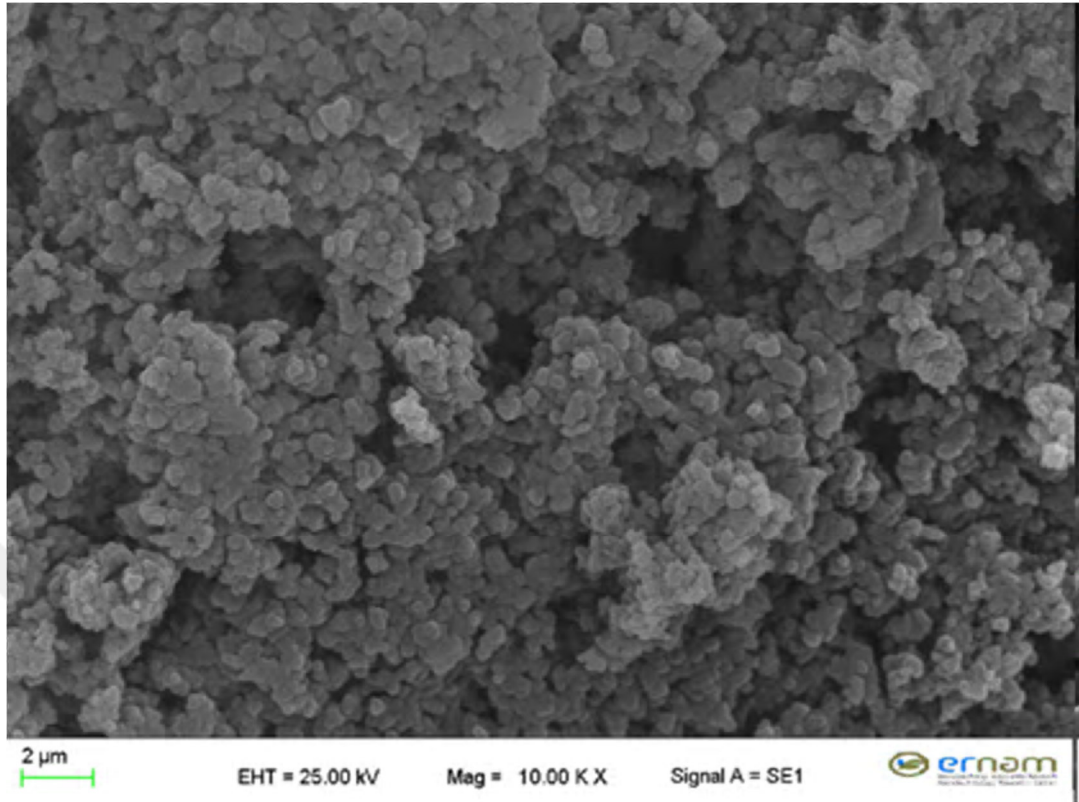
Şekil 4.9. Gönüllü hastaların plazma deksketoprofen konsantrasyonu

4.2. İbuprofenin İnsan Plazmasından Ekstraksiyonuna Yönelik Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi ve HPLC-DAD ile tayini

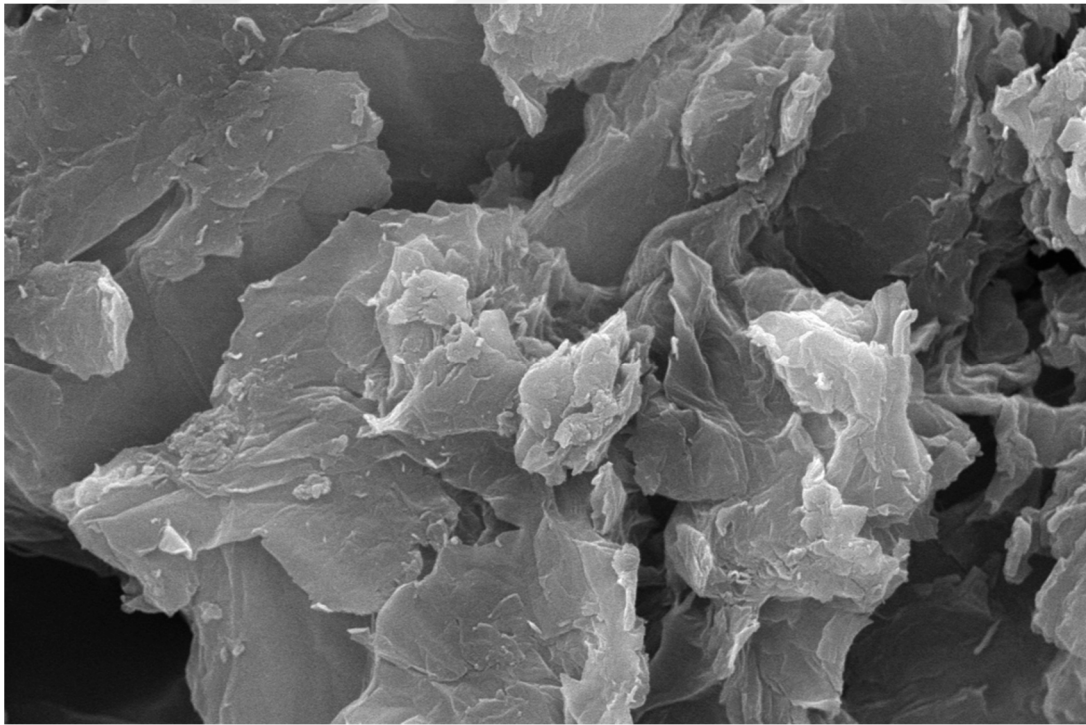
4.2.1. Manyetik Özellikli Karbon Dot@Grafen Oksit Nanokompozitinin Karakterizasyonu

Hidrotermal yöntem ile üretilen $Fe_3O_4@C-Dot@GO$ hibrit materyali SEM, STEM, SEM-EDX, SEM-Mapping, XRD, Raman spektrometresi ve FT-IR teknikleri kullanılarak karakterize edildi.

C-Dot, GO ve $Fe_3O_4@C-Dot@GO$ hibrit materyallerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.10. Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.' de gösterildi. Üretilen C-Dot partiküllerinin ortalama tanecik boyutunun ortalama 100-150 nm aralığında olduğu görülmektedir. Üretilen $Fe_3O_4@GO@C-Dot$ hibrit materyaline ait SEM görüntüleri incelendiğinde GO yapısının farklı bölgelerinde C-Dot' ların oluştuğu ve küresel yapıda Fe_3O_4 partiküllerinin oluştuğu görülmektedir. Fe_3O_4 oluşumu SEM-EDX ve SEM-Mapping analizleri ile de ispatlandı. Manyetik yapının karakterizasyon sonuçları Şekil 4.16. ve Şekil 4.17'de verildi.

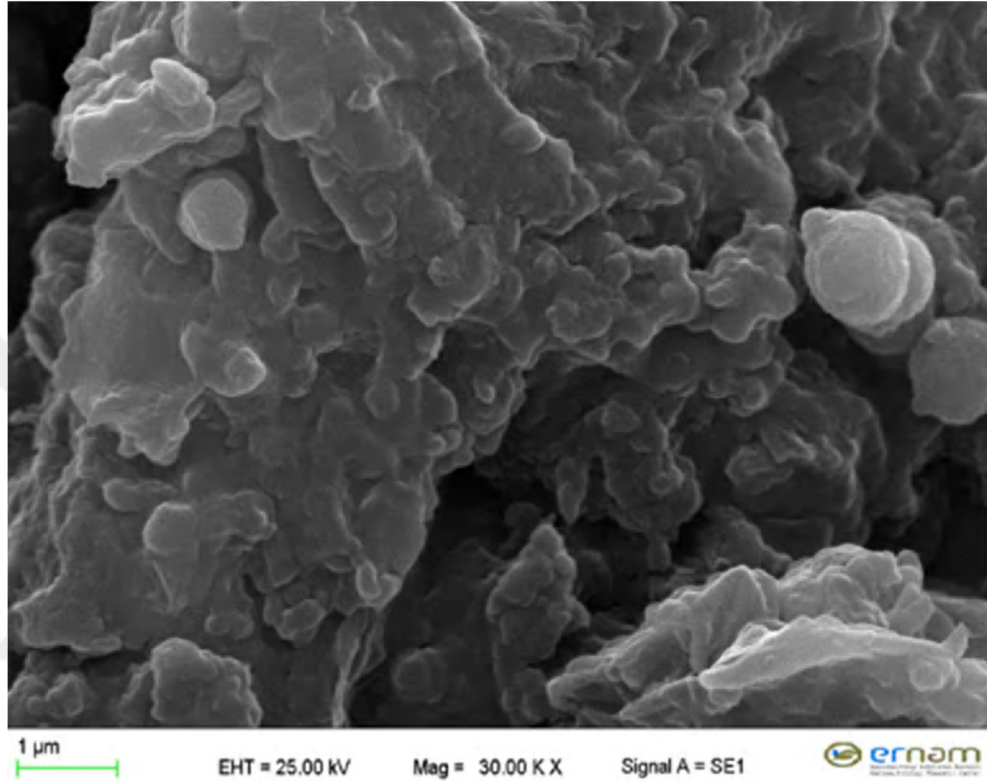


Şekil 4.10. Sentezlenen C-Dot malzemesinin SEM görüntüsü



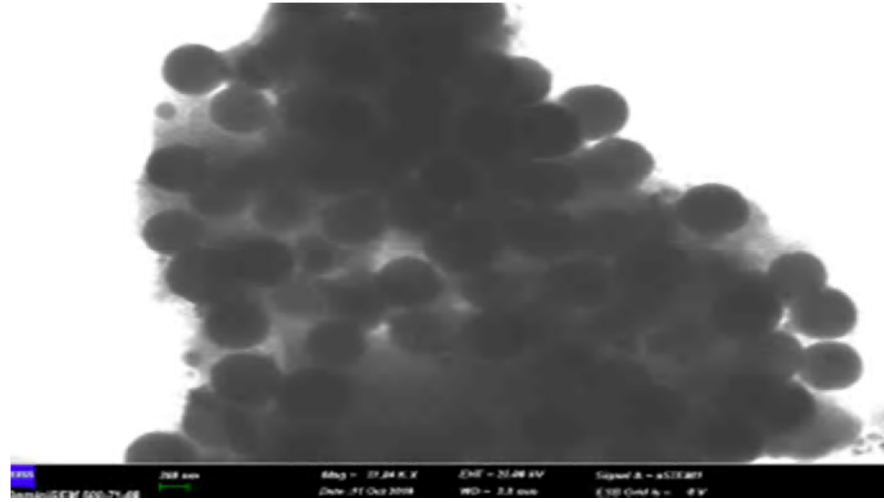
Şekil 4.11. Sentezlenen Grafen oksitin SEM görüntüsü

Grafen oksite ait SEM görüntüsünde göre çok katmanlı grafen oksit yapısının meydana geldiği görülmektedir. GO'nun yapısındaki manyetik modifikasyonun SEM görüntülerinde ve diğer karakterizasyon verilerinin değerlendirilmesiyle yapıldığı görülmektedir.

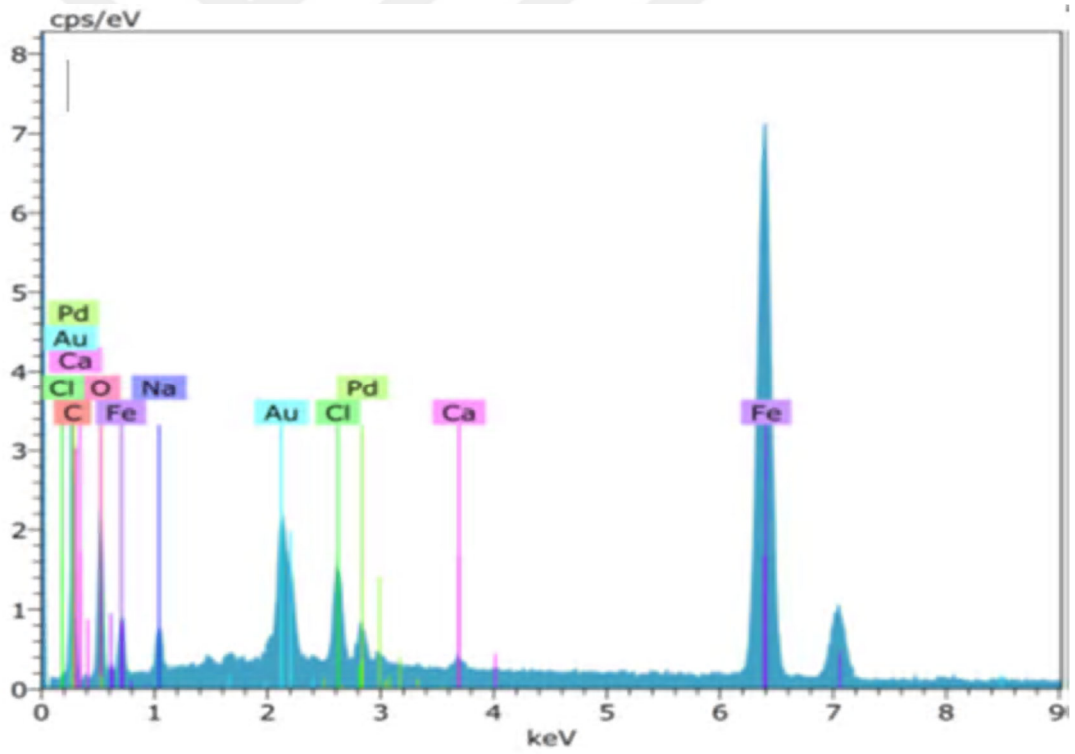


Şekil 4.12. Manyetik@ C-dot @grafen oksit nanokompozitinin SEM görüntü

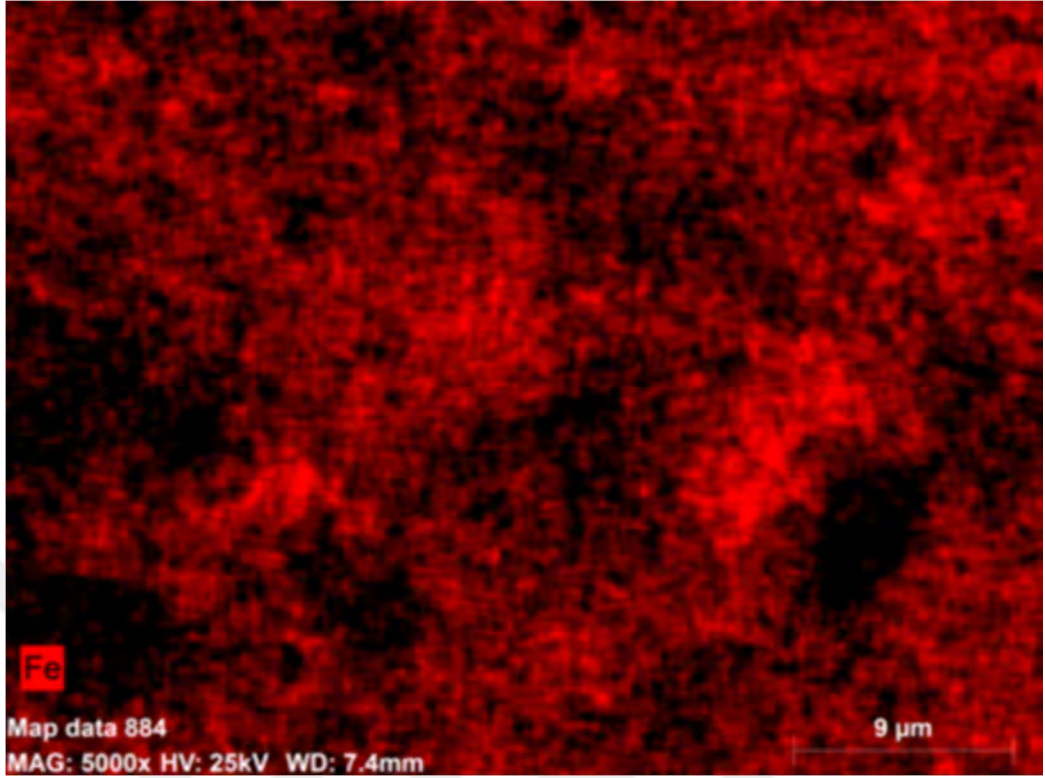
Sentezlenen C-Dot, GO ve manyetikC-Dot@GO nanokompozitine ait STEM görüntüleri Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te sırası ile verilmiştir. Taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM), nanoyapıların karakterizasyonu için paha biçilmez bir araçtır. Temel kompozisyon ve elektronik yapı hakkında tek bir atomun nihai hassasiyetinde bilgi sağlama yeteneği ile bir dizi farklı görüntüleme modu sunar. STEM, normal taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile aynı prensipte çalışır, bir görüntü oluşturmak için istenen sinyal toplanırken örnek üzerinde taranan odaklanmış bir elektron ışını oluşturur. C-Dotlara ait STEM görüntüsünde karbon nanaopartiküller net bir şekilde gözlenmektedir. GO düzgün altıgen yapıda iki boyutlu düz bir tabaka yapısında malzemedir ve sentezlenen GO'ye ait STEM görüntüsünde düz tabakalı yapı görülmektedir. Sentezlenen manyetik C-Dot@GO nanokompozitinin STEM



Şekil 4.15. Sentezlenen Manyetik C-Dot@GO nanokompozitinin STEM görüntüsü



Şekil 4.16. Fe_3O_4 oluşumunun SEM-EDX ile karakterizasyon grafiği

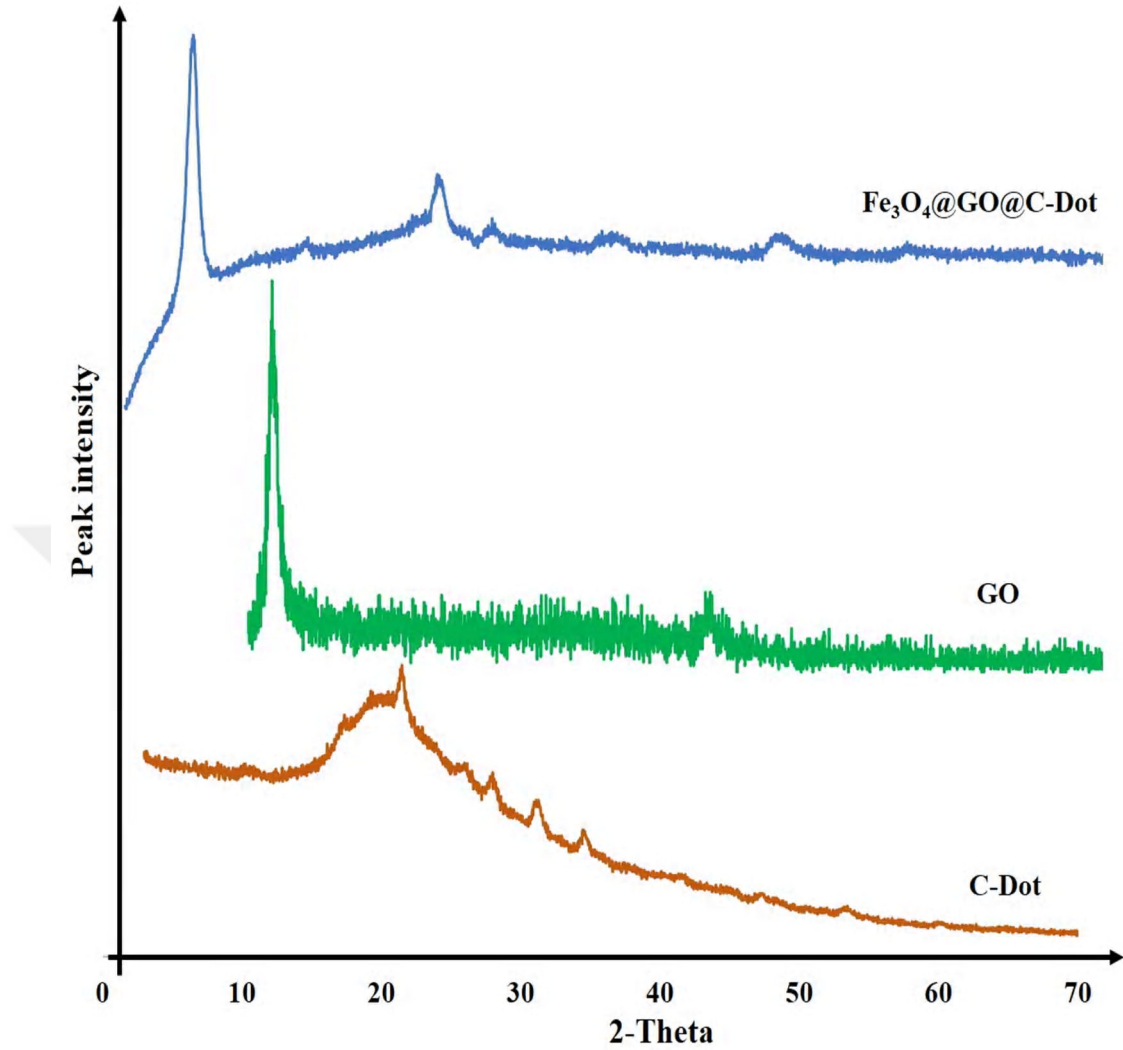


Şekil 4.17. Fe_3O_4 oluşumunun SEM- Mapping görünümü

Şekil 4.16 ve Şekil 4.17.'de yapıya demir eklendiği SEM-EDX ve SEM-Mapping analizleri ile ispatlandı.

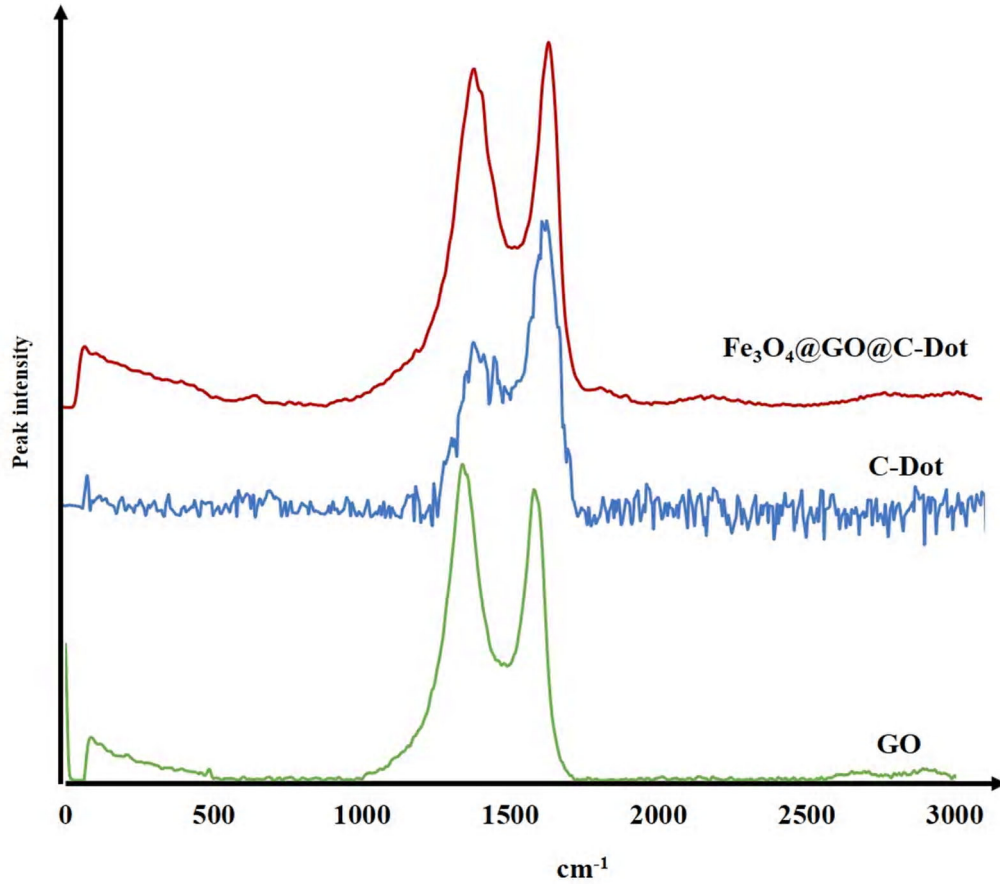
C-Dot, GO ve $Fe_3O_4@C-Dot@GO$ hibrit materyaline ait XRD spektrumları Şekil. 4.18' de gösterildi. XRD spektrumlarındaki 2θ :19.7, 21.4, 26.5, 28.4, 31.4 ve 34.8 açılarındaki piklerin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (Bhaisare ve ark., 2015). GO'e ait XRD spektrumu incelendiğinde 2θ :11.7 ve 42.3 açılarındaki piklerin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (Abdelrahman ve ark., 2018).

$Fe_3O_4@C-Dot@GO$ hibrit materyaline ait XRD spektrumları incelendiğinde 2θ :28.4, 36.8 ve 57.2 açılarındaki piklerin Fe_3O_4 partiküllerine ait olduğu literatür çalışmalarında gözlemlendi (Wu ve ark., 2011).



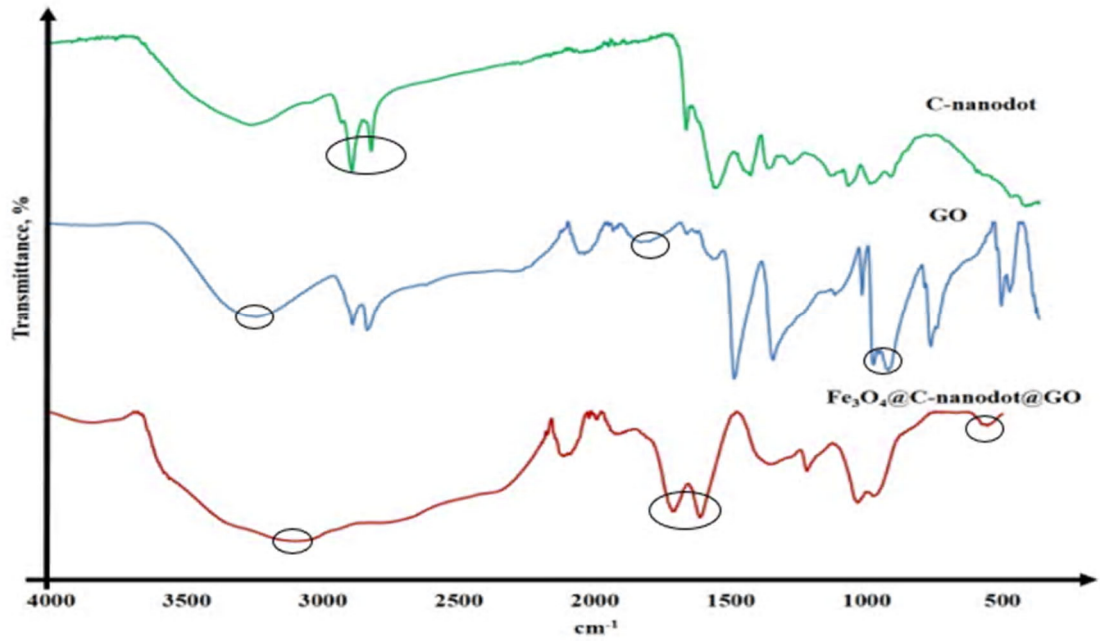
Şekil 4. 18. C-Dot, GO ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@C\text{-Dot}@GO$ materyallerine ait XRD spektrumları.

Hidrotermal yöntem ile üretilen C-Dot, GO ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@C\text{-Dot}@GO$ materyallerine ait Raman spektrumları Şekil. 4.19.' da gösterildi. 1576 ve 1346 dalga sayılarında piklerin C-dot' a ait G ve D banlarına ait olduğu literatür çalışmaları ile ispatlandı (Gaddam ve ark., 2014). Grafitten başarılı bir şekilde grafen oksit sentezlendiği GO' e ait yapıdaki sp^3 hibrişleşmesinden kaynaklı düzensiz yapıya ait D bandının, sp^2 kaynaklı düzenli yapıya ait G bandından daha baskın olmasından kolayca anlaşılabilir. Bununla birlikte modfikasyon sonucunda elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4@C\text{-Dot}@GO$ materyallerine ait raman spektrumu incelendiğinde C-Dot' un GO ile modfikasyonuna bağlı olarak D bandı şiddetinin arttığı, G bandının baskılandığı D bandının daha baskın hale geldiği ve D bandı pik şiddetinin G bandı pik şiddetine oranının önemli ölçüde değiştiği gözlemlendi.



Şekil 4.19. C-Dot, GO ve Fe₃O₄@C-Dot@GO materyallerine ait Raman spektrumları

Sentezlenen C-Dot, GO ve Fe₃O₄@C-Dot@GO materyallerine ait infrared spektrumları Şekil. 4.20.' de verilmiştir. Şekil 4.20. incelendiğinde C-dot daki C-H bağlarına ait 2800 cm⁻¹ dalga sayısındaki zayıf iki pik süttten karbonlaşma ile C-Dotların sentezlendiğini göstermektedir. GO'nin infrared spektrumunda 1700 cm⁻¹ civarındaki pikler C=O bağını, 3000 cm⁻¹ deki geniş pik O-H bağını göstererek grafenden grafen oksit elde edildiğinin ispatıdır. Sentezlenen nanokompozitin infrared spektrumları incelendiğinde C-dot ve GO'e ait karakteristik piklerin yanı sıra Parmak izi bölgesinde 500 cm⁻¹ civarında anorganik yapı olan demire ait pik gözlemlendi.

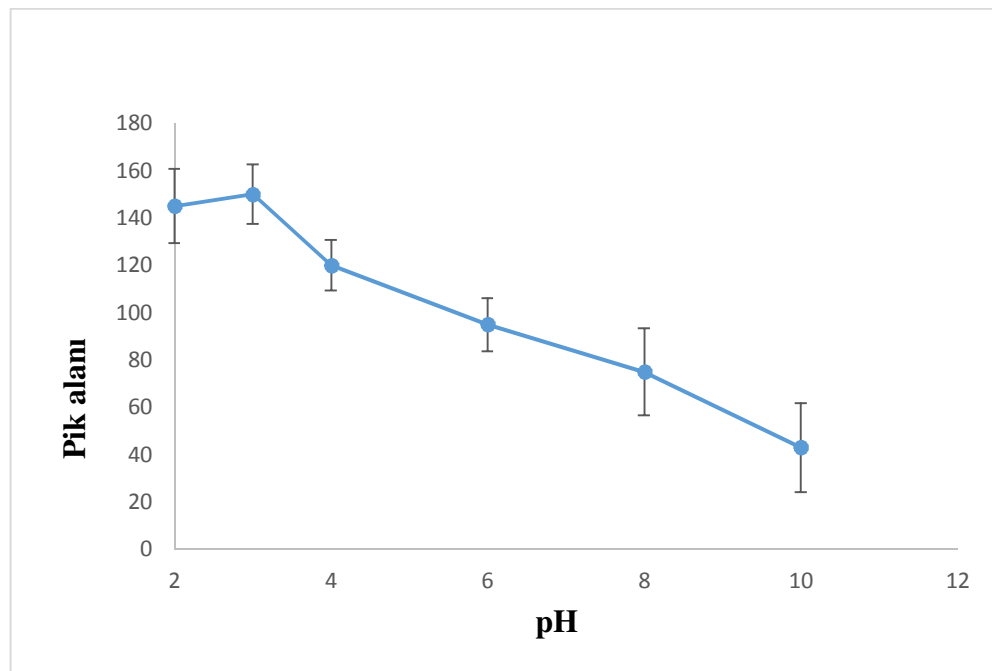


Şekil 4.20. C-Dot, GO ve Fe₃O₄@C-Dot@GO materyallerine ait İnfrared spektrumları

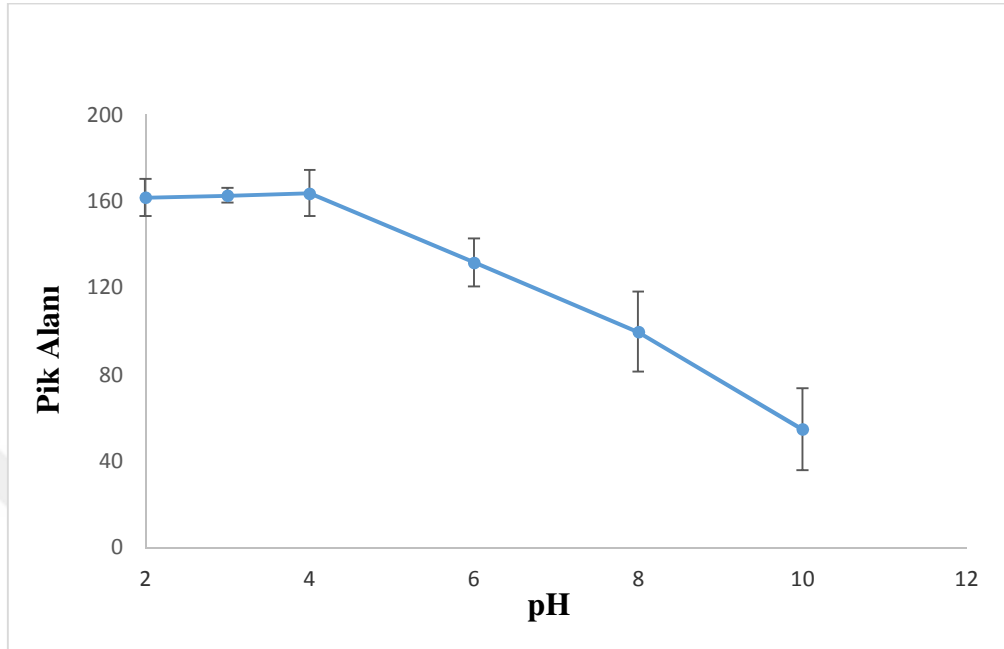
4.2.2. Sentezlenen Yeni Nesil Adsorban ile Yöntem Optimizasyonu

4.2.2.1. pH Etkisi

İbuprofenin model çözeltilerden katı faz ekstraksiyonu için yeni bir adsorban sentezinde ara ürün olan manyetik grafen oksit ve Fe₃O₄@C-Dot@GO nanokampozitinin adsorban özellikleri incelendi. Şekil 4.21 ve 4.22’de model çözelti pH’sının İBU’nun geri kazanımına etkisinin sonuçları verildi.



Şekil 4.21. Manyetik grafen oksit adsorbanı ile ibuprofenin geri kazanımına pH etkisi (n=3)



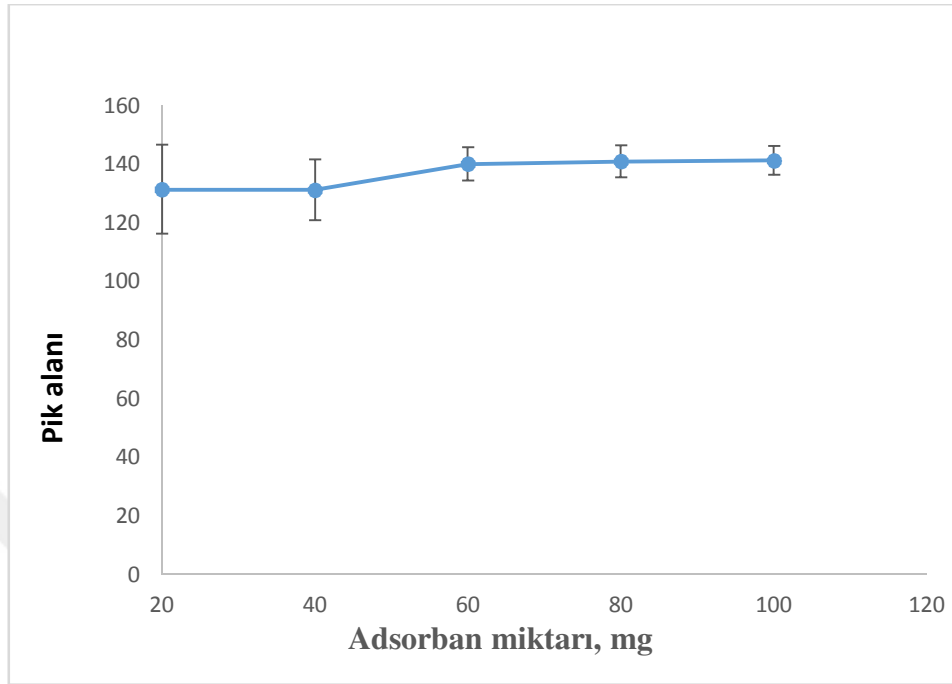
Şekil 4.22. Manyetik C-Dot@grafen oksit nanokompoziti ile ibuprofenin geri kazanımına pH etkisi (n=3)

İBU sulu ortamda pKa değeri 5,22 olan zayıf asidik özellikte bir ilaç etken maddesidir. İBU pKa değerinin altındaki asidik pH'larda ağırlıklı olarak noniyonize formda bulunmaktadır. Sentezlenen iki katı malzemeninde adsorpsiyon özelliği incelendiğinde; manyetik C-Dot@grafen oksit nanokompozitinin kısmen daha iyi adsorpsiyona sahip olmasına rağmen her iki malzemenin de ibuprofen'in ayrılmasında kullanılabileceği görülmektedir. Manyetik grafen oksitin ibuprofeninin adsorpsiyonunda kullanılabileceği ancak grafen oksitin tabakalaşma sorunu nedeniyle tekrar kullanılabilirliğinin düşük olması ve sonuçlarda yüksek standart sapmaya neden olduğu için çalışmalara manyetik grafen oksit@C-Dot nanokompoziti ile devam edildi. Manyetik@GO@C-Dot ile ibuprofenin ekstraksiyonunun optimum pH 3,0'te yapılmasına karar verilmiştir.

4.2.2.2. Adsorban Miktarının Etkisi

İbuprofenin ekstraksiyon verimine ve analizin maliyetine katkısı için adsorban miktarının 20-100 mg arasında etkisi incelendi. Sonuçlar Şekil.4.23'de görülmektedir. Daha düşük miktarda adsorban kullanımında kantitatif sonuçlar elde edilmesi ile birlikte

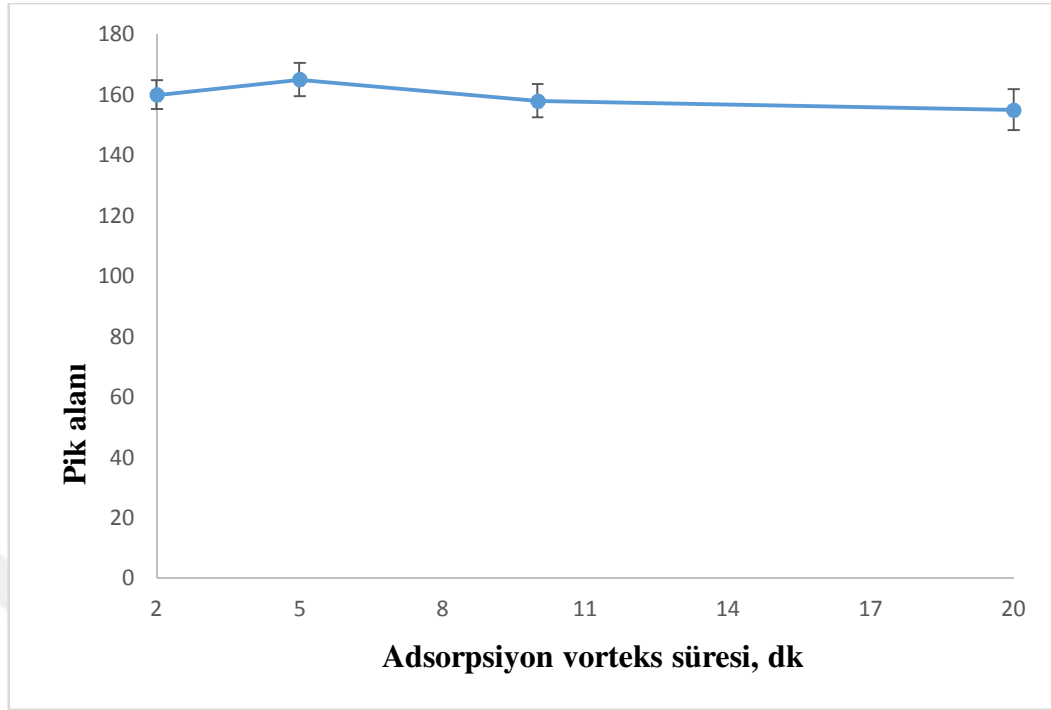
maksimum standart sapmanın küçük olduğu 60 mg adsorban miktarı optimum adsorban miktarı olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.23. Manyetik C-Dot@grafen oksit nanokompoziti ile İbuprofenin geri kazanımına adsorban miktarının etkisi (n=3)

4.2.2.3. Adsorpsiyona Vorteks Süresinin Etkisi

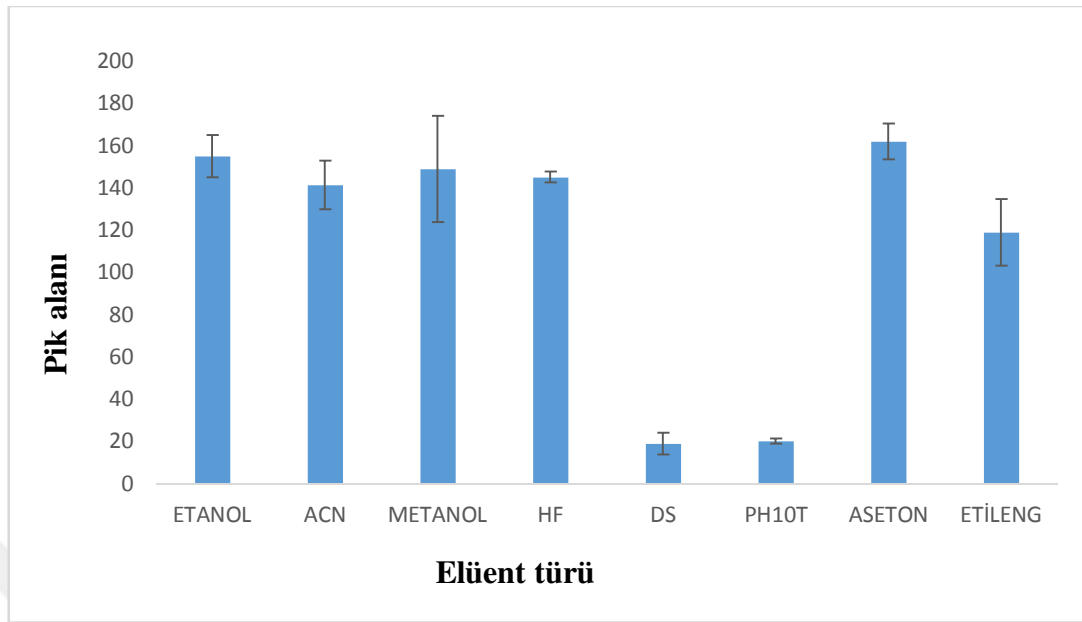
İbuprofenin model çözeltilerden geri kazanma verimine vorteks süresinin etkisi incelendi. Optimum adsorpsiyon süresi için 2-20 dk arası vorteks işlemi model çözeltilere uygulandı. Şekil 4.24.'de verilen sonuçlardan da görüldüğü gibi İbuprofenin sentezlenen nanokompozit ile adsorpsiyonu oldukça hızlıdır ve çalışılan tüm zamanlarda adsorpsiyon gerçekleşmektedir. Elde edilen sonuçlara göre 2 dk vorteks süresinin ibuprofenin katı nanokompozit üzerine adsorpsiyonu için yeterli olduğu belirlenmiştir.



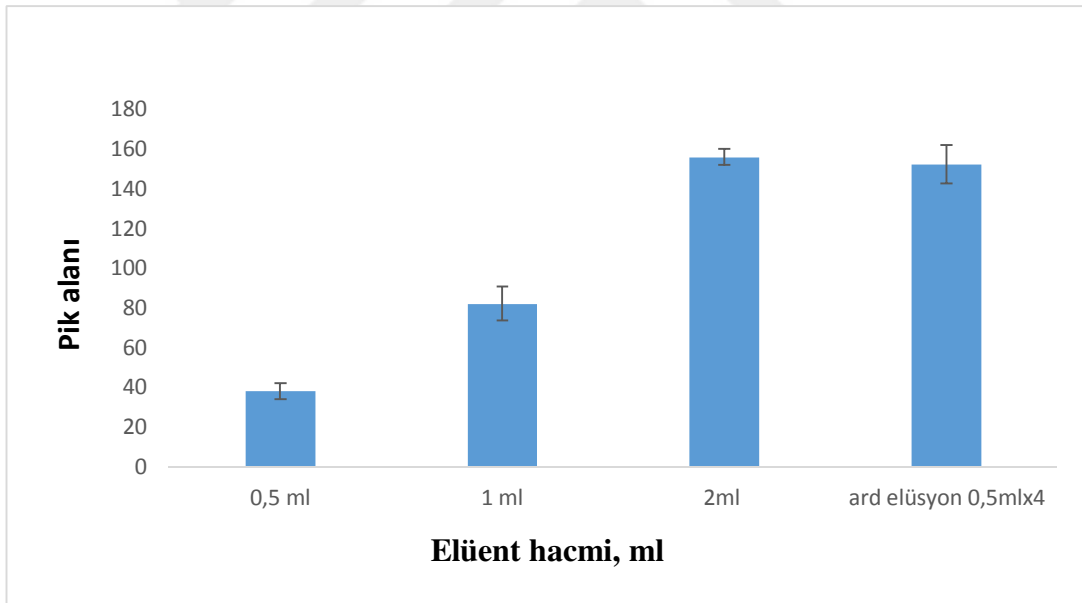
Şekil 4.24. İbuprofenin geri kazanımına adsorpsiyon süresinin etkisi (n=3)

4.2.2.4. Elüent Türü ve Hacminin Etkisi

İbuprofenin ekstraksiyon verimine elüent cinsinin ve hacminin etkisi incelendi. Elüent olarak etanol, asetonitril, metanol, hareketli faz, aseton, deiyonize su, etilenglikol, pH 10,0 tamponu denenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.25.'te verildi. Optimum elüent çözeltisi olarak etanol belirlendi. Elüent türünün belirlenmesinden sonra en uygun elüent hacmi araştırıldı. 0,5 mL ve 2,0 mL arasında hacimlerde ve ardışık elüasyon işlemi yapılarak ibuprofenin katı yüzeyinden elüasyonu incelendi. Şekil 4.26'da görüldüğü gibi optimum elüent hacmi 2 mL olarak belirlendi.



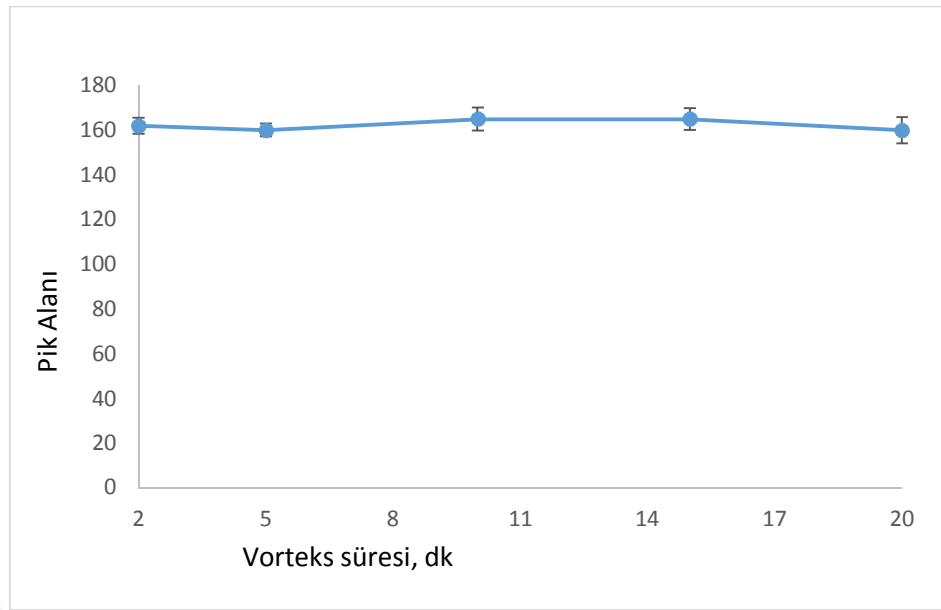
Şekil 4.25. İbuprofenin geri kazanımına elüent türünün etkisi (n=3)



Şekil 4.26. İbuprofenin geri kazanımına elüent hacminin etkisi (n=3)

4.2.2.5 Elüsyon İşlemine Vorteks Süresinin Etkisi

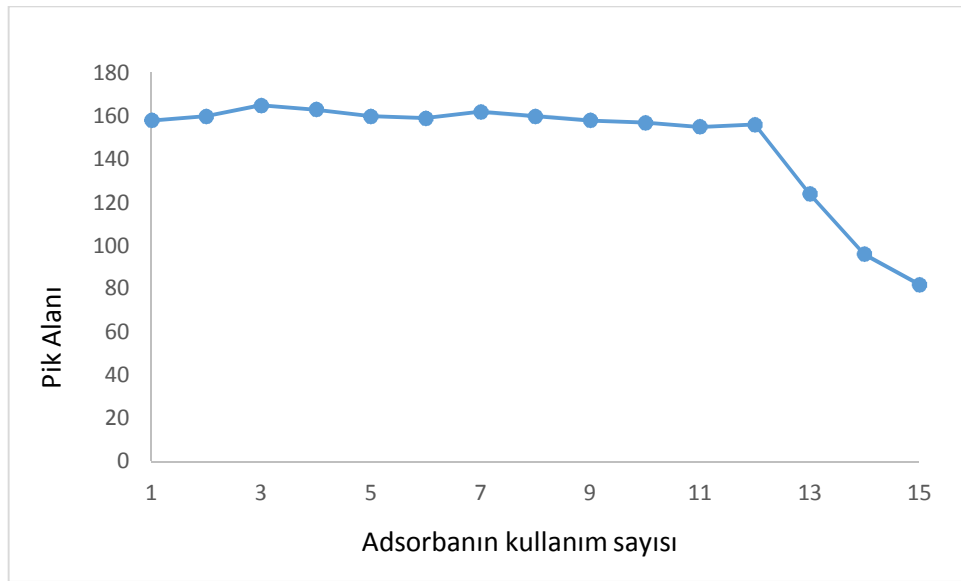
Elüsyon işleminde adsorban ve elüent çözeltisinin yeterince etkileşimi için yapılan vorteks süresinin ibuprofenin geri kazanımına etkisi incelendi ve sonuçlar Şekil 4.27.'de verildi. 2 dk vorteks yapılarak ibuprofenin kantitatif elüsyonunun hızlı bir şekilde yapılabildiğine karar verilmiştir.



Şekil 4.27. İbuprofenin geri kazanımına elüsyon vorteks süresinin etkisi(n=3)

4.2.2.6. Katı Adsorbanın Tekrar Kullanılabilirliği

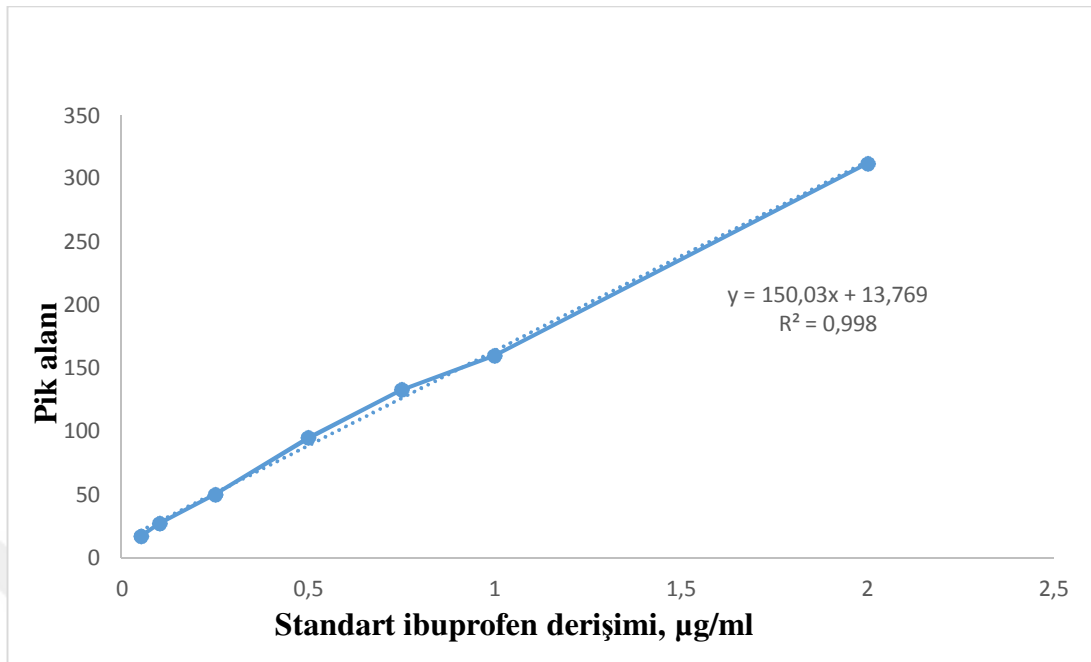
Geliştirilen hibrit malzemenin tekrar kullanılabilirliği ve adsorbanın geri kazanım değerleri, arıtma işlemini ekonomik hale getirecektir. Yeni geliştirilen manyetik malzemenin tekrar kullanılabilirliği ve stabilitesi, model çözeltiler kullanılarak kontrol edildi. Malzemenin adsorpsiyon özelliğinin, 10'dan fazla ekstraksiyon işleminde kullanıldığında fiziksel görünüşte kararlı olduğu belirlenmiştir. Manyetik nanopartiküller her kullanımdan sonra iki kez 5,0 mL etanol ile ve deiyonize suyu ile yıkama işlemine tabi tutuldu. Manyetik nanopartiküller daha sonra neodimyum mıknatıs ile manyetik özelliği kontrol edildi. Katı faz adsorbanının tekrar kullanımına dair veriler Şekil 4.28'de verilmektedir. 15 kez kullanım tekrarladıktan sonra, ibuprofenin ekstraksiyonu için adsorpsiyon kapasitesinin düştüğü kromatografik pik sinyallerinde görüldü. Deneysel sonuçlar, yeni sentezlenmiş manyetik hibrit malzemenin en az 10 kez tekrar kullanılabilirliğini gösterdi.



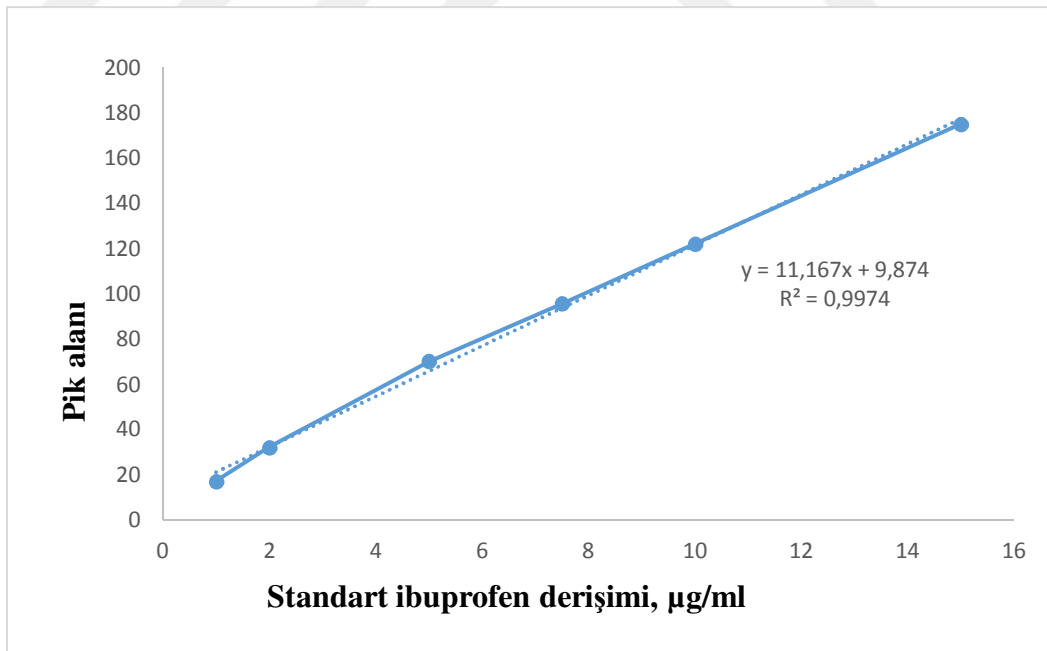
Şekil 4.28. Manyetik CD@GO nanokompozitinin ibuprofenin katıfaz ekstarksiyonunda tekrar kullanılabilirliği (N=15)

4.2.2.7. Kalibrasyon Doğruları

Optimum deneysel koşullar altında farklı konsantrasyonlarda standart ibuprofen içeren model çözeltilerinin ve ilaç içermeyen plazma örneklerine standart ibuprofen eklenip ekstraksiyonu yapılarak ibuprofen analizleri HPLC’de yapıp kalibrasyon doğrusu elde edildi. Sulu ortama ve plazma ortamına ait kalibrasyon doğruları Şekil 4.29. ve 4.30’da verildi. Manyetik grafen oksit@C-dot kullanılarak geliştirilen katı faz ekstraksiyon yönteminin analitik validasyonun belirtilen kalibrasyon doğrularına göre yapıldı. Şekillerde görüldüğü gibi sulu ortamda ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon doğrusunun eğimi 150,03 iken, plazmaya eklenerek hazırlanan standart çözeltilerin ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon doğrusunun eğimi 11,167 olarak bulundu. Aradaki bu büyük duyarlılık farkı; plazma örnekleri için alınan örnek hacminin sulu ortamda alınan örnek hacmine göre çok küçük olmasından kaynaklanmaktadır.



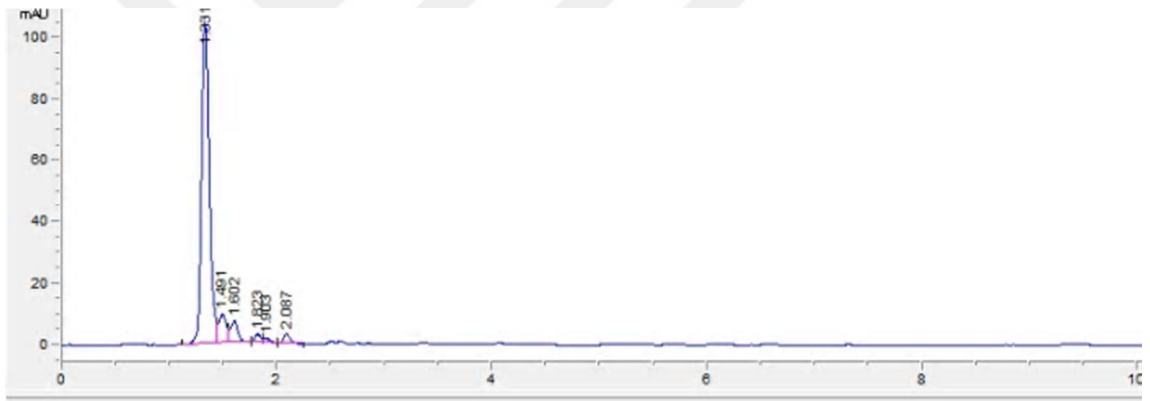
Şekil 4.29. Geliştirilen ekstraksiyon yöntemi sonrası sulu model çözeltiden elde edilen kalibrasyon doğrusu



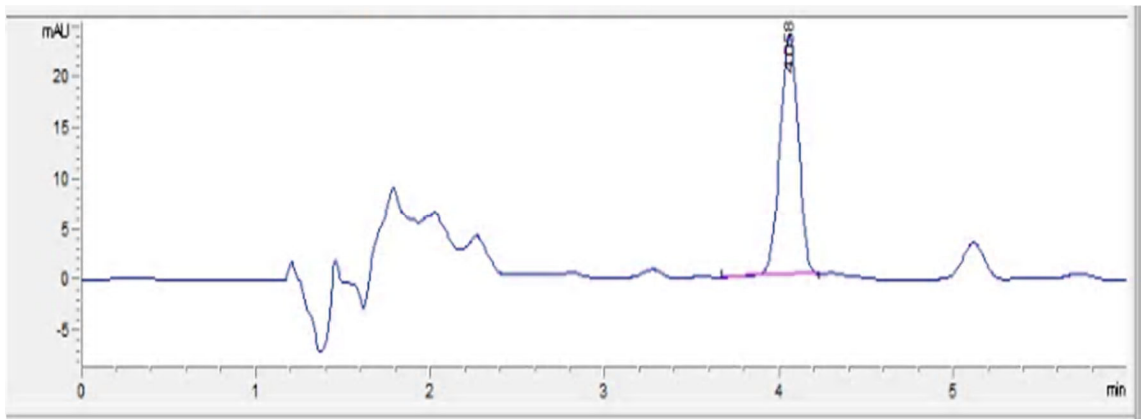
Şekil 4.30. İlaç içermeyen plazma örneklerine standart ibuprofen ilave edildikten sonra geliştirilen ekstraksiyon yöntemi uygulandıktan sonra elde edilen kalibrasyon doğrusu

4.2.2.8. İbuprofen İçeren Plazma Örneklerinin Kromatografik Analizi

İbuprofenin kromatografik analizi için literatürden Bazregar ve ark.'nın (2016), ibuprofenin analizi için kullandıkları ters faz sıvı kromatografisi yöntemi seçildi. Geliştirdiğimiz yöntemin plazma örneklerinin kromatografik analizler için uygunluğu ve verimliliği ilaç içeren plazma örnekleri proteinleri çöktürüldükten sonra HPLC ile analizi yapılarak incelendi. Şekil 4.31.'de standart ibuprofen ilave edilmiş plazma örneğinin direkt analizine ait kromatogram görülmektedir. Herhangi bir ekstraksiyon işlemi yapılmadan İBU'ne ait pik gözlenemedi. Şekil 4.32'de standart İBU ilave edilmiş plazma örneğinin geliştirilen katı faz ekstraksiyon yöntemi ile analizine ait kromatogram görülmektedir. Geliştirilen yöntem ile İBU'nun piki 4,0. dakikada görülmektedir.



Şekil 4.31. Standart ibuprofen eklenmiş plazmanın direkt analizine ait kromatogram



Şekil 4.32. Standart ibuprofen eklenmiş plazmanın geliştirilen katı faz yöntemi ile ekstraksiyon sonrası analizine ait kromatogram

4.2.2.9. Geliştirilen Katı Faz Yönteminin Analitik Performansı

Optimum koşullar altında, geliştirilen manyetik@C-Dot@GO temelli katı faz ekstraksiyon HPLC yöntemi için sulu model çözelti ve plazma ortamında doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası), korelasyon katsayısı, gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı değerleri Tablo 4.3.'de verildi.

Tablo 4.3. Manyetik C-dot@grafen oksit ile geliştirilen katı faz ekstraksiyon yönteminin model çözelti ve plazma ortamında analitik performansı

Model Çözelti Ortamı		Plazma Ortamı	
Analitik performans	Değerler	Analitik performans	Değerler
Doğrusallık, µg/mL	0,05-2,0	Doğrusallık, µg/mL	1,0-15,0
Gün içi kesinlik, % BSS (n=6)	2,0	Gün içi kesinlik, % BSS (n=6)	2,5
Günler arası kesinlik, % BSS (n=6)	3,5	Günler arası kesinlik, % BSS (n=6)	3,9
Tayin Katsayısı	0,9980	Tayin Katsayısı	0,9974
Gözlenebilme sınırı, ng/mL	8,0	Gözlenebilme sınırı, ng/mL	160,0
Tayin sınırı, ng/mL	24,2	Tayin sınırı, ng/mL	510,0

Bu yöntemin doğruluğunu test etmek için daha önce ibuprofen kullanılmayan gönüllü hastalardan alınan plazma numuneleri üzerinde ilave/geri kazanım çalışmaları yapıldı. Plazma örneklerine farklı miktarlarda ibuprofen eklenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.4.'de verildi.

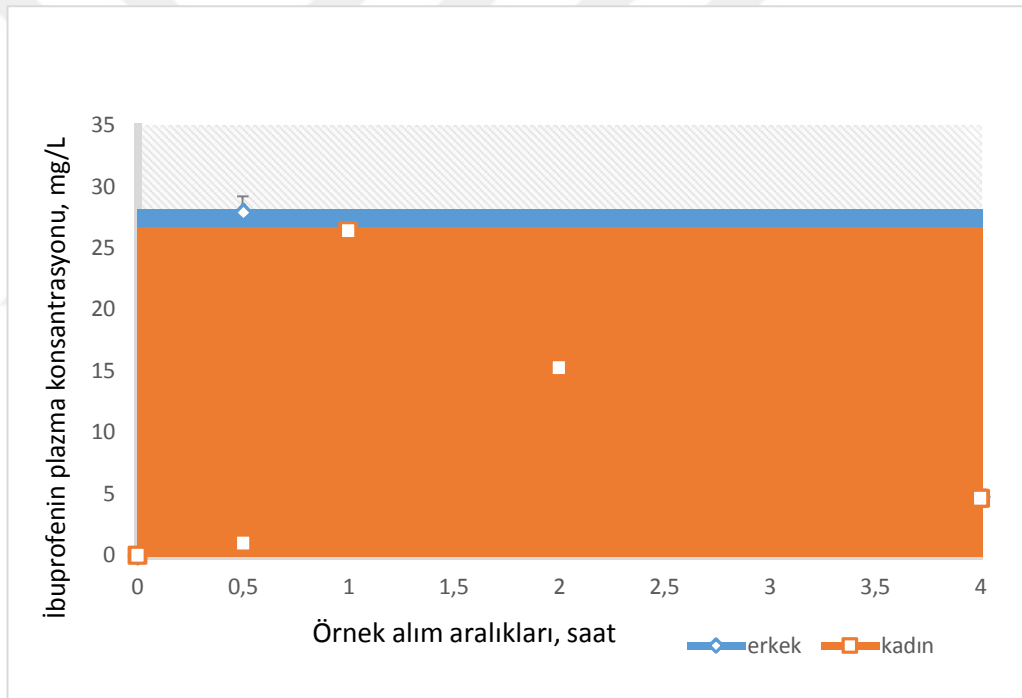
Tablo 4.4. Geliştirilen yöntemin insan plazmasına uygulanması ve geri kazanım sonuçları (n=5)

Örnek	Eklenen miktar, µg/ml	Bulunan , µg/ml	Geri kazanım, %
Plazma	0,0	0,0	TSA*
	8,0	7,6 ± 0,2	95±2
	10,0	9,2 ± 0,2	92±3
	12,0	10,9 ± 0,3	91±3

TSA: Tayin sınırının Altında

4.2.2.10. Gerçek Örneklerin Analiz Sonuçları

İbuprofen emilimi, oral yoldan verildiğinde hızlı ve tamdır. İbuprofen, her 6 saatte bir 200 - 400 mg normal önerilen günlük yetişkin dozu ile dünya çapında reçetesiz ilaç olarak sunulmaktadır. İbuprofen, 10- 50 mg/L arasında geniş bir terapötik pencereye ve > 100 mg/L'lik toksik konsantrasyonlara sahiptir (Davies, 1998). Şekil 4.33' de verilen analiz sonuçları literatür ve klinik araştırmalarla uyumludur. Terapötik ve/veya toksikolojik etkiler ile ilacın plazma konsantrasyonları arasında bir ilişki olduğuna dair bilimsel çalışmalar mevcuttur. Birçok hasta belirli bir NSAİİ 'ye cevap vermeyebilir ve NSAİİ'ler arasındaki toksikolojik profiller farklı olabilmektedir. Bu nedenlerle erkek ve kadın gönüllü arasındaki zamana göre plazma konsantrasyonunda farklılık oluşması normaldir.



Şekil 4.33. Gönüllü hastaların plazma ibuprofen konsantrasyonu

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, NSAİİ ilaç grubundan deksketoprofen ve ibuprofenin ilaç etken maddelerinin insan plazmasından ekstraksiyonu için iki farklı yöntem geliştirilip, gönüllü hastalardan alınan kan örnekleri ile yöntemlerin plazmaya uygulamaları ve ilaç etken maddelerinin HPLC ile kantitatif tayini yapıldı.

Yapılan çalışmaların değerlendirilmesi sırasıyla;

- Deksketoprofenin insan plazmasından ekstraksiyonuna yönelik yeni nesil ekstraksiyon çözücülerinden olan supramoleküler çözücü temelli yeni bir ekstraksiyon yöntemi sonrası deksketoprofenin DAD dedektörlü HPLC ile tayini için geliştirilen yöntemin verilerinin literatürle karşılaştırılması,
- İbuprofenin insan plazmasından ekstraksiyonuna yönelik yeni bir adsorban sentezi ile uygulanan katı faz ekstraksiyonu sonrası ibuprofenin DAD dedektörlü HPLC ile tayini için geliştirilen yöntemin literatürle karşılaştırılmasını içermektedir.

Tez çalışmasının temel hedefi ilaç içeren biyolojik örneklerin analizinde kullanılan örnek hazırlama ve ekstraksiyon işlemlerinin; basit, kolay, hızlı, analizci ve çevre için güvenli, sağlam, minimum kimyasal tüketimine dayalı olması amacıyla yeni ekstraksiyon yöntemlerinin geliştirilmesidir.

Bu amaçla tez çalışmasının birinci bölümünde;

Deksketoprofenin insan plazmasından analizi için yeni supramoleküler çözücü temelli ekstraksiyon yöntemi geliştirilip, yöntemin HPLC ile uyumluluğu sayesinde hızlı bir şekilde kromatografik tayini yapıldı. Geliştirilen supramoleküler çözücü temelli ekstraksiyon yönteminin optimum deneysel parametreler Tablo 5.1.' de verildi.

Tablo 5.1. Supramoleküler çözücüler ile geliştirilen yöntemin optimum deneysel parametreleri

Parametre	Optimum değer
pH	3,0
Dekanoik asit miktarı, mg	200
Tetrahidrofuran hacmi, µl	600
Sonikasyon zamanı, dk	7

Tablo 5. 1'i değerlendirecek olursak; pH 3,0'e tamponlanmış 10 ml hacmindeki model çözelti ortamında bulunan Deksketoprofen; 200 mg DA ve 600 µl THF karışından oluşan Supramoleküler çözücü eklenerek ısı gerektirmeden 7 dakika boyunca sonike edildi. Oluşan ekstraksiyon fazı santrifüj işlemi ile ayrıldı ve son hacmi 500 µL' ye asetronitril ile tamamlandı ve HPLC ile kantitatif olarak analizi yapıldı.

Geliştirilen yöntemin analitik performansı model çözelti ve ilaç içermeyen boş plazma ortamı için incelendi. Yöntem optimum şartlarda gönüllü hastalardan alınan kan örneklerine uygulandı. Geliştirilen yöntem ile bulunan plazma DKT konsantrasyonu literatür ile uyumludur.

Deksketoprofenin biyolojik ve farklı örnek matrislerinden ekstraksiyonuna ve analize yönelik kaynak taramasında bulunan çalışmaların bazı analitik parametreleri Tablo 5.2'de verilmiştir.

Tablo 5.2. Deksketoprofenin plazmadan analizi için geliştirilen supramoleküler çözücü temelli sıvı faz mikro ekstraksiyon yönteminin literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılması

Örnek	Ekstraksiyon yöntemi	Analiz yöntemi	Tayin sınırı (ng/mL)	%BSS	Kaynak
Plazma	Direkt enjeksiyon	HPLC	250.0	3,1	Oda ve ark., 1991
Plazma	SSE	HPLC	500.0	7,4	Palylyk ve Jamali,1991
Plazma	Direkt enjeksiyon	HPLC	5000.0	1,4	Oda ve ark., 1992
Plazma	KFE	HPLC	200.0	7,0	Carr ve ark., 1995
İdrar	KFE	HPLC	70.0	12,1	Grubb ve ark.,1996
Serum	KFE	HPLC	25.0	5,2	Ameyibor ve Stewart, 1998
Plazma	Supramoleküler çözücü temelli SFE	HPLC	12,8	3,9	Bu çalışma

Deksketoprofenin insan plazmasından analizine yönelik ekstraksiyon ve tayin çalışmalarını detaylı olarak incelersek;

Palylyk ve Jamali (1991) deksketoprofen ve ketoprofenin plazmadan analizi ve HPLC ile tayini için sıvı faz ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Sıvı faz ekstraksiyon yönteminde Ketoprofenin enantiomerlerini içeren rat plazma numunesi asitlendirilmiş devamında 5 mL izoktan-izopropanol (95: 5) karışımı ile ekstre edilerek 1800 g'de 5

dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Organik faz temiz cam tüplere aktarılıp ve 5 mL'ye seyreltilmiştir. Organik faz ayrılarak kalan sulu katman asitlendirilip tekrar kloroform (5 mL) ilave edilip vortekslenip (30s) ve 3 dakika santrifüjlenmiştir. Sulu katman aspire edildi ve organik faz kuruyana kadar buharlaştırıldı. Kalıntı, asetonitril içinde trietilamin ile sulandırılırken, 30 saniye boyunca vorteks karıştırılmıştır. Asetonitrilde 50-1 hacim 60 mM etil kloroformat ve metanol içinde-lösinamid hidroklorid ve 1 M trietilamin çözeltisi 30-s aralıklarla ilave edildi. Reaksiyon, 50 dakika HPLC saflıkta su ilavesiyle bitirilmiştir. Son karışım HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Palyk ve Jamali tarafından geliştirilen sıvı faz ekstraksiyon yöntemi ve HPLC analizinin deksketoprofen için tayin sınırı 500 ng/mL ve ortalama % BSS 'sı %10 dur.

Oda ve ark., (1991) Deksketoprefenin plazma miktar tayinini, HPLC sisteminde avidin proteini ile modifiye edilmiş ters faz kolon kullanarak yapmışlardır. Avidin proteini ile modifiye işlemi; aminopropil silika jeli, geleneksel yüksek basınçlı bulamaç paketleme prosedürleriyle 250 mm x 4.6 mm i.d. paslanmaz çelik kolonlara paketlenmiştir. Daha sonra bu faza, 'Disüksinimidil subat (300 mg) eklenerek, 0.1 M sodyum hidrojenkarbonat tampon-asetonitrilde (112, 30 ml) 4 saat içinde geri dönüştürülmesi, ardından su ve asetonitril (1: 2, 20 mL) ile yıkanarak aktive edilmiştir. Daha sonra mobil faz, 0.1 M sodyum hidrojenkarbonat tamponu ile değiştirilip ve aynı tamponda çözünen protein (500 mg), 4 saat boyunca kolonda geri dönüştürülmüştür. Deksketoprofenin tayini için, Komassie brilliant mavisi reaktifi kullanılmıştır. 100 mg Komassie brilliant mavisi 'nin 50 ml etanol içerisinde çözülüp, 100 mL fosforik asit eklenerek karışım suyla seyreltilmiştir. Yeni hazırlanan kolon üzerine insan plazmasından 20 µL enjekte edilerek ve hareketli faz 10 dakika boyunca toplanmıştır. Eliüattan 0,5 mL alınıp komassie brilliant blue reaktifiyle karıştırılmıştır ve 2 dakika sonra karışımın absorbanı 595 nm'de ölçülmüştür. Geri kazanım, kolon ile olan ve olmayan absorban oranından hesaplanmıştır. Oda ve ark., tarafından geliştirilen yöntemin tayin sınırı 250 ng/mL dir.

Ameyibor ve Stewart tarafından (1998) geliştirilen yöntemde; Deksketoprofenin insan kan serum örneklerinden tayini öncesinde katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Standart deksketoprofen eklenen insan serum örneklerinden toplam 1 mL alınıp, 100 Ml 0.1 N HCl ile seyreltildi ve 2 dakika boyunca vortekslenmiştir. Numuneler, daha önce 2 x 1 ml metanol ve ardından 2 x 1 ml deiyonize su ile şartlandırılmış bir C18 Bond-Elut

katı faz ekstraksiyon kolonundan geçirilmiştir. Kartuş, yıkama ve numune uygulama adımları arasında kurumasına izin verilmeden serum numunesinin uygulanmasından sonra kolon 2 x 1 mL deiyonize su ile yıkanmıştır. Analitler metanol içerisinde %2'lik 0.1 N HCl ile elüe edilmiştir ve yavaş bir azot akımı altında kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Kalıntı, 1 mL mobil fazda yeniden çözüldü, 0.2 mm boyunca süzöldü ve HPLC ye enjekte edilmiştir. Ameybor ve Stewart tarafından (1998) geliştirilen yöntemin tayin sınırı 25 ng/mL ve %BSS'si %4,9 dur.

Carr ve ark. (1995) Deksketoprofen ve ketoprofenin plazma ve idrar örneklerinden ekstraksiyonu için sıvı faz ekstraksiyon yöntemini kullanarak kantitatif tayinlerini HPLC ile yapmışlardır. Kullanılan yöntem kısaca özetlersek; ilaçsız insan plazma numuneleri (0.5 mL), standart DKP ile karıştırılmıştır. Daha sonra 0.6 M sülfirik asit ve 4 mL 2,2,4-trimetilpentan-izopropanol (95: 5, v / v) ilave edilmiştir. Örnekler vortekslenip, 5 dakika 1800 g'de santrifüjlenmiştir. Organik faz temiz bir test tüpüne aktarılıp kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Buharlaştırılmış kalıntıdaha sonra mobil faz ile sulandırılıp ve 10 saniye vortekslenmiştir. HPLC'ye karışımdan 100 µL enjekte edilmiştir. Geliştirilen sıvı faz ekstraksiyon yönteminin tayin sınırı 200 ng/mL ve %BSS'si %6'dan küçüktür.

Oda ve ark., (1992) Deksketoprofenin plazmadan analzi için yaptıkları başka bir çalışmada; plazma örneklerini proteinleri asetonitril ile çöktürüp, 3 farklı tipte kiral özellikteki maddelerin ayırımında kullanılan kolonların modifiye edildiği sistemde direkt analizini ve tayinini yapmışlardır. Bu çalışmanın tayin sınırı 5000 ng/mL ve %BSS'si %5 den küçüktür.

Supramoleküler çözücü temelli sıvı faz yönteminin avantajları,

- Dekanoik asit ve tetrahidrofuran ticari olarak temin edilip, düşük maliyetlidir.
- Geliştirilen yöntem fazladan bir sıcaklık işlemi gerektirmemektedir.
- Ekstraksiyon süresi klasik bulutlanma noktası ve sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemlerine göre daha kısadır.
- Yöntemin tekrarlanabilirliği oldukça iyidir.
- Ekstraksiyon fazı asetonitril ile düşük hacimde seyreltilip, doğrudan HPLC kolonuna verilebilmektedir. Ekstraksiyon fazının uçurulması vs. işlemlere gerek duyulmamaktadır.

- Yöntem deksketoprofenin insan kan plazmasından ekstraksiyonu ve kantitatif analizi için uygundur.
- Yöntem plazmada iyi bir ayırma gerçekleştirerek kromatogramı temizlemektedir.
- Geliştirilen sıvı faz mikro ekstraksiyon yönteminin deksketoprofenin insan plazmasından ekstraksiyonu için geri kazanım değerlerinin %97- %100 aralığında olduğu ve yüksek bir doğruluğa sahip olduğu görülmektedir. Yöntemin kesinliği en yüksek %3,7 olarak bulunmuştu. Bu kesinlik biyoloji örnek için oldukça iyi bir kesinliktir.

Deksketoprofenin insan plazmasından ekstraksiyonuna yönelik uygulanan yöntemleri incelediğimizde; geliştirdiğimiz supramoleküler çözücü temelli sıvı faz ekstraksiyon yöntemi düşük tayin sınırı, tekrarlanabilirliğinin iyi olması, ekstraksiyon işleminde kullanılan kimyasalların az miktarda ve toksik olmaması, hızlı olması ve hemen her analiz laboratuvarında uygulanabilir olması gibi önemli özelliklerinden dolayı, literatüre alternatif iyi bir yöntemdir.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde;

İbuprofenin insan plazmasından analizi için yeni bir adsorban sentezlendi ve karakterize edildi. Sentezlenen manyetik grafen oksit@C-Dot adsorbanı ile ibuprofenin ayrılması için yeni bir katı faz ekstraksiyon yöntemi geliştirilerek, ibuprofenin tayinleri HPLC ile yapılmıştır. Optimum deneysel parametreler Tablo 5.3.' de verilmektedir.

Tablo 5.3. Manyetik grafen oksit@C-Dot nanokompoziti ile geliştirilen katı faz ekstraksiyon yönteminin optimum deneysel parametreleri

Parametre	Optimum değer
pH	3,0
Adsorban miktarı, mg	60
Adsorpsiyon vorteks süresi,dk	2
Elüent cinsi	Etanol
Elüent hacmi, mL	2,0

Desorpsiyon vorteks süresi, dk	2
--------------------------------	---

Katı faz ekstraksiyon yöntemi pH 3,0'e tamponlanmış 10 mL hacmindeki ibuprofen içeren çözelti ortamına 60 mg adsorban ilave edilerek yapıldı. Çalkalama tekniği ile yapılan katı faz ekstraksiyon yönteminde bu örnek çözeltisi 2 dk 3000 rpm de vortekslendi. İbuprofenin katı faza adsorpsiyonundan sonra manyetik nanokompozit güçlü neomidyum bir mıknatıs ile ayrıldı. Katı faz yüzeyine adsorplanan ibuprofen, 2 ml etanol çözeltisi ile elüe edildi. İbuprofen içeren elüent çözeltisi 0,45 µm'lik şırınga filtrelerinden geçirilerek HPLC ile kantitatif olarak analizi yapıldı.

Geliştirilen yöntemin analitik performansı model çözelti ve ilaç içermeyen boş plazma ortamı için incelendi. Yöntem optimum şartlarda gönüllü hastalardan alınan kan örneklerine uygulandı. Geliştirilen yöntem ile bulunan ibuprofen plazma konsantrasyonu literatür ile uyumlu ve toksik düzeyin altında bulundu.

İbuprofenin biyolojik ve farklı örnek matrislerinden ekstraksiyonuna ve analize yönelik daha önce yapılan çalışmaların kısa bir özeti Tablo 5.4'de verilmiştir.

Tablo 5.4. İbuprofenin insan plazmasından analizi için geliştirilen manyetik@C-Dot@GO nanokompoziti ile katı faz ekstraksiyon yönteminin literatürdeki çalışmalarıyla karşılaştırılması

Ekstraksiyon metodu	Tayin yöntemi	Örnek	Gözlenebilme sınırı ng/mL	%BSS	Kaynak
Oyuk faz-SSME	HPLC-UV	İnsan idrarı	40.0	1,8	Payan ve ark., 2009
SFE	GC-MS	Sığır idrarı	15.2	4,4	Waraksa ve ark., 2018
KBME	HPLC-DAD	İnsan idrarı	0.36	5,7	Al-hasimi ve ark., 2017
MSFE	HPLC-DAD	Biyolojik ve çevresel örnekler	100-500	3,0	Payan ve ark., 2016
SFE	HPLC-FLD	İnsan plazması	33.3	5,6	Canaparo ve ark., 2000
KFE	HPLC-UV	İnsan plazması	510.0	2,25	Farrar ve ark., 2002
Tek adım-SSME	UPLC-MS/MS	İnsan plazması	1,0	7-11,2	Cheung ve ark, 2010
Manyetik@C-Dot@GO nanokompoziti ile KFE	HPLC-UV	İnsan plazması	160,0	3.5	Bu çalışma

İbuprofenin biyolojik örneklerden ekstraksiyonuna ve analizine yönelik literatürde yapılan bazı çalışmaları detaylı incelersek;

Canaparo ve ark., (2000) ibuprofenin plazamdan tayini için ekstraksiyon yöntemi olarak; 0.5 mL plazmaya 3 mL izoktan ve izopropilalkol çözeltisi (95: 5 h / h) ilave edip kısa vorteksle karıştırmadan sonra 1800 g'de 10 dakika santrifüj etmişlerdir. Organik fazlar temiz bir tüpe aktarılmış ve 40 ° C'de bir su banyosunda bir azot akımı altında kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Kalıntı 300 mL trietilamin içerisinde çözündürülerek ve kısa bir süre sonra vorteks karıştırmasından sonra 50 mL etil klorofomat ilave

edilmiştir. Karışıma yaklaşık 25 mL 1- naftil etilamin ilave edilip, karışım vorteksenerek 3 dakika bekletilmiştir ve etilklorofomatın reaksiyona girmesini durdurmak için 25 mL etanolamin ilave edilmiştir. Son karışım HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Yöntemin tayin sınırı 100 ng/mL ve %BSS'sı %10-19 aralığındadır.

Payan ve ark., (2016) İbuprofenin plazmadan tayini için ekstraksiyon yöntemi olarak mikroçip temelli yeni bir sıvı faz mikro ekstraksiyon yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemi kısaca özetleyecek olursak; yeniden kullanılabilir mikroçip-bazlı sıvı faz mikroekstraksiyon sistemi simetrik iki desenli poli (metil metakrilat) plakasından oluşur. Ön tarafta, donör (örnek) çözeltisi olarak bir kanal, arka tarafında ise kanal alıcı faz olarak kullanılmıştır. Her iki kanal da 80 mm derinliğe ve 2 mm genişliğe sahip 13 mm uzunluğundadır. Daha sonra her iki levhada da 1.5 mm çaplı giriş / çıkışlar açılmış ve akışkan kullanım kolaylığı için Teflon kılıflar sabitlenmiştir. İmalatı için bir lazer kesici (Epilog Mini 24–30 W) kullanılmıştır. Bu lazerle desenlenebilecek farklı polimer plakalar arasında, faset kalitesi (yani düşük pürüzlülük) ve işlem hızı nedeniyle poli metil metakrilat seçilmiştir. Tasarlanan mikroçip – SFME sistemi kapattıktan sonra, her biri 1000 µL gaz sızdırmaz şırıngayla iki ayrı mikro şırınga pompası kullanılarak çipe akış sağlanmıştır. 1 ila 3 µL/ dk arasındaki bir akış hızında sürekli bir pH 1,5 donör çözeltisi verilmiştir. Diğer yandan, alıcı faz olarak pH 11,5'lik bir sulu çözelti 1 µL/dk hızda sürekli olarak verilip veya durdurularak akış modunda (durgun şartlar) kullanılmıştır. Her iki çözelti de polipropilen membrandan ayrılmıştır. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra, alıcı solüsyon bir mikropipet kullanılarak toplanıp HPLC analizi için kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem idrar ve tükürük örneklerine uygulandı. Payan ve ark., (2016) tarafından geliştirilen mikroçip temelli yöntemin tayin sınırı sırası ile 5,0-10,0 µg/mL ve % BSS'sı %2 den küçüktür.

Payán ve ark., (2009) ibuprofenin idrar örneklerinden ekstraksiyonu için yeni bir ekstraksiyon geliştirmişlerdir. Oyuk fiber bazlı – sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemini özetlersek; içi boş elyaf 27 cm'lik parçalar halinde kesilerek, ultrasonik banyoda aseton ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Lif, desteğin gözeneklerinin empenye edilmesi için 5 saniye boyunca membran fazına (diheksil eter) batırılmış ve fazla miktarda organik çözücünün çıkarılması için ultrasonik bir banyoya yerleştirilerek dışta suyla durulanmıştır. Hazırlanan fiber parçanın lümeni, bir HPLC şırıngası kullanılarak 50 µL alıcı faz (pH 12.5 sulu çözelti) ile dolduruldu. Elyafın her iki açık ucu, sıcak lehimleme

aleti ve yapışkan bant ile kapatılmıştır. Ekstraksiyon sırasında, alıcı fazı içeren zar kısmı, 50 mL'lik bir cam beherin içerdiği 50 mL'lik numune çözeltisine (pH 2,0) daldırılmıştır. Örnek, 300 rpm'de manyetik bir karıştırıcı ile 15 dakika boyunca karıştırılmıştır. Fiber çıkarılıp uçlardan biri kesilip ve ekstraksiyon fazı bir HPLC şırıngası kullanılarak ayrılmıştır. Ekstraksiyon (alıcı) faz HPLC sistemine enjekte edildi. Oyuk fiber bazlı – sıvı faz mikroekstraksiyon yönteminin tayin sınırı 130,0 ng/mL ve %BSS'sı %3 ten küçüktür.

Farrar ve ark., (2002) ibuprofenin plazmadan tayini için katı faz ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Yöntemin uygulaması; Oasis HLB katı faz ekstraksiyon kartuşu ile bir katı faz ekstraksiyon metodu kullanılarak HPLC kolonuna enjeksiyon için numuneler hazırlanmıştır. Kartuşlar oyukları başlangıçta 1 mL metanol ve ardından 1 mL su ile yıkanmıştır. Ekstraksiyon kartuşuna uygulanmadan önce, plazma numunesi 1 dakika boyunca 10 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra 50 µl plazma, 250 µl'ye seyreltik fosforik asit (su içinde hacimce % 4 fosforik asit) ile seyreltilmiştir. Karıştırdıktan sonra, bu numune ekstraksiyon kartuşuna uygulanmış ve bir vakum kullanılarak çekilmiştir. Kartuş daha sonra su içinde 1 mL % 5 metanol ile yıkanmıştır. Elüat, vakum altında 0.5 ml metanol kullanılarak enjeksiyon tüplerine toplanmış ve HPLC sistemine 25 µL enjekte edilmiştir. Farrar ve ark., (2002) tarafından geliştirilen katı faz ekatransaksiyon yönteminin tayin sınırı 156,0 ng/mL ve % BSS'sı %6'dan küçüktür.

Al-Hashim ve ark., (2017) ibuprofenin idrar örneklerinden analizi için katı çubuk mikroekstraksiyon tekniği (SBME) geliştirmişlerdir. Bu yöntemde katı çubuk olarak çok duvarlı karbon nanotüpleri kullanmışlardır. SBME cihazı, içi boş bir fiber polipropilen mikrotüp uzunluğu 2,5 cm içinde paketlenmiş 2 mg sorbent malzemesinden oluşturulmuştur. İki uç, ısıyla kapatılmıştır ve her bir cihaz, 3 dakika boyunca metanol içerisinde ultrasonik hale getirilerek temizlenmiştir. Daha sonra kullanılana kadar metanol içerisinde saklanmıştır. Temiz bir SBME cihazı 30 mL numune çözeltisine yerleştirilerek 600 rpm'de karıştırılmıştır. Ekstraksiyondan sonra, cihaz bir çift cımbızla çıkarıldı ve tüy bırakmayan bir kumaş ile kurutularak bir HPLC mikro vialine (300 µL hacim) enjekte edilmiştir. Analitler daha sonra metanolde (250 µL) ultrasonik olarak desorbe edilmiştir. Analiz için HPLC'ye numunenin bir

kısmı enjekte edildi. Katı çubuk mikroekstraksiyon tekniği yönteminin tayin sınırı 1,7 ng/mL ve % BSS'sı %6'dan küçüktür.

Manyetik grafen oksit@C-Dot nanokompoziti ile geliştirilen katı faz ekstraksiyon yönteminin avantajları,

- C-Dot ticari olarak temin edilebilmesine rağmen çalışmamızda yeşil sentez yöntemi kullanılarak süttten sentezlenmiştir.
- Katı faz olarak kullanılan adsorbanın sentezi kolaylıkla ve istenildiği zaman yapılabilmektedir.
- İbuprofenin adsorban üzerine adsorpsiyon ve elüsyon işlemleri çok hızlıdır.
- Yöntemin tekrarlanabilirliği ve biyolojik örneklerle uygulanması oldukça iyidir.
- Sentezlenen nanokompozit 10 kez tekrar kullanılabilir stabildedir. Ticari katı faz kartuşları gibi tek kullanımlık değildir.
- Yöntem ibuprofenin insan kan plazmasından ekstraksiyonu ve kantitatif analizi için uygundur.
- Manyetik C-Dot@GO ile geliştirilen katı faz ekstraksiyon yöntemi ibuprofenin insan plazmasından ekstraksiyonunda %91-%95 aralığında geri kazanım değerleri ile iyi bir doğruluğa sahip olduğunu göstermektedir. Yöntemin kesinliği en yüksek %3,9 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç yöntemin iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

İbuprofenin kan analizleri için, manyetik grafen oksit@C-dot nanokompoziti ile geliştirilen katı faz ekstraksiyon yönteminin; düşük tayin sınırı, tekrarlanabilirliğinin iyi olması, ekstraksiyon işleminde kullanılan adsorbanın tekrar kullanılabilirliği, hızlı olması ve hemen her analiz laboratuvarında uygulanabilir olması gibi önemli özelliklerinden dolayı, alternatif yöntem olarak önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdelrahman AA, Betiha MA, Rabie AM, Ahmed HS, Elshahat MF. Removal of refractory Organo-sulfur compounds using an efficient and recyclable nanoball supported graphene oxide. *Journal of Molecular Liquids*, 2018; 252: 121-132.
- Ahmadi-Jouibari T, Fattahi N, Shamsipur M. Rapid extraction and determination of amphetamines in human urine samples using dispersive liquid liquid microextraction and solidification of floating organic drop followed by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed.*, 2014; 94:145-151.
- Ahuja S, Rasmussen H. Hplc Method Developments for Pharmaceuticals. In: *Separation Science and Technologies*, (1st ed), Elsevier Academic Press, London, 2007; 442-457.
- Al-hashimi NN, Aleih HA, Fafous II, Alkhatib HS. Multi-walled carbon nanotubes as efficient sorbent for the solid bar microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from human urine samples. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2017; 13: 1-8.
- Alshana U, Goger NG, Ertas N. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and dairy products. *Food Chemistry*, 2013; 138(2-3): 890-897.
- Ameiybor E, Stewart JT. HPLC determination of ketoprofen enantiomers in human serum using a nonporous octadecylsilane 1.5 microns column with hydroxypropyl beta-cyclodextrin as mobile phase additive. *J Pharm. Biomed. Anal.* 1998; 17: 83-88.
- Anastas P, Eghbali N. *Green chemistry: principles and practice*. Chemical Society Reviews, 2010, 39(1):301-312.

- Andrade-Eiroa A, Canle M, Leroy-Cancellieri V, Cerdà V. Solid-phase extraction of organic compounds: a critical review (Part I). *Trends in Analytical Chemistry*, 2016; 80: 641-654.
- Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M. Green Analytical Chemistry. *Trends Anal Chem*. 2008; 27(6): 497-511.
- Arthur CL, Pawliszyn J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 1990; 62: 2145–2148.
- Asadi M, Shabani AM, Dadfarnia S. Vortex-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on solidification of floating organic drop combined with high performance liquid chromatography for determination of naproxen and nabumetone. *Journal of Chromatography A*, 2015; 1425: 17–24.
- Asgharinezhad AA, Karami S, Ebrahimzadeh H, Shekari N, Jalilian N. Polypyrrole/magnetic nanoparticles composite as an efficient sorbent for dispersive micro-solid-phase extraction of antidepressant drugs from biological fluids. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015; 494: 102–112.
- Ballesteros-Gómez A, Rubio S. Environment-responsive alkanol-based supramolecular solvents: Characterization and potential as restricted access property and mixed-mode extractants. *Anal Chem*. 2012; 84(1): 342-349.
- Ballesteros-Gómez A, Sicilia MD, Rubio S. Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review. *Anal Chim Acta*. 2010; 677(2): 108-130.
- Barbanoj MJ, Antonijoan RM, Gich I. Clinical pharmacokinetics of dexketoprofen. *Clin Pharmacokinet*, 2001; 40(4): 245-262.
- Barbanoj MJ, Gich I, Artigas R, Tost D, Moros C, Antonjian RM, Garcia ML, Mauleon D. Pharmacokinetics of dexketoprofen trometamol in healthy volunteers after single and repeated oral doses. *J. of Clinic. Pharm.*, 1998; 38(12): 33-40.
- Bazregar M, Rajabi M, Yamini Y, Asghari A. Tandem air-agitated liquid e liquid microextraction as an efficient method for determination of acidic drugs in complicated matrices. *Anal. Chim. Acta*, 2016; 917: 44–52.

- Bhaisare ML, Talib A, Khan MS, Pandey S, Wu HF. Synthesis of fluorescent carbon dots via microwave carbonization of citric acid in presence of tetraoctylammonium ion, and their application to cellular bioimaging. *Microchimica Acta*, 2015; 182 (13-14): 2173-2181.
- Bidlingmeyer BA. *Practical HPLC Methodology and Applications*, John Wiley & Sons, USA, 1992; 2-25.
- Bjarnason I, Scarpignato C, Holmgren E, Olszewski M, Rainsford KD, Lanas A. Mechanisms of damage to the gastrointestinal tract from nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterology*, 2018; 154: 500–514.
- Breadmore MC. Ionic liquid-based liquid phase microextraction with direct injection for capillary electrophoresis. *J.Chromatogr.A*, 2011; 1218:1347-1352.
- Bushra R, Aslam N. An overview of clinical pharmacology of ibuprofen. *Oman Medical Journal*, 2010; 25: 155-161.
- Buszewski B, Szultka M. Past, present, and future of solid phase extraction: a review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2012, 42(3):198-213.
- Canaparo R, Muntoni E, Zara GP, Della Pepa C, Berno E, Costa M, Eandi M. Determination of Ibuprofen in human plasma by high-performance liquid chromatography: validation and application in pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.*, 2000; 14: 219–226 .
- Carr RA, Caillé G, Ngoc AH, Foster RT. Stereospecific high-performance liquid chromatography assay of ketoprofen in human plasma and urine. *J Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 1995; 668: 175–181.
- Cheung B, Szeitz A, Riggs KW, Peng HT, Edginton AN. A validated enantioselective assay for the determination of ibuprofen in human plasma using ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Am. J. Anal. Chem.* 2010; 01: 47–58.
- Dadfarnia S, Shabani AMH. Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals—A review. *Anal Chim Acta*, 2010; 658: 107–119.

- Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, Williams KM. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin Pharmacokinet.* 2000; 38(3): 225-242.
- Davies NM. Clinical Pharmacokinetics of Ibuprofen. *Clinical Pharmacokinetics*, 1998; 34: 101-154.
- de Almeida Bezerra M, Arruda MAZ, Ferreira SLC. Cloud point extraction as a procedure of separation and pre-concentration for metal determination using spectroanalytical techniques: a review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2005; 40: 269–299.
- Demirci A, Özcimder M. *Kimyada Ayırma Yöntemleri*. Kuban Matbaacılık Yayıncılık, Ankara, 2008, 150-165.
- Dietz C, Sanz J, C´amara C. Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *J. Chromatogr. A*, 2006; 1103:183–192.
- Ding M, Sun J, Zhang X, Liang Q, Han Q. One-step synthesis of magnetic graphene oxide nanocomposite and its application in magnetic solid phase extraction of heavy metal ions from biological samples. *Talanta*, 2014; 132: 557–563.
- Dionne RA, Campbell RA, Cooper SA, Hall DL, Buckingham B. Suppression of postoperative pain by preoperative administration of ibuprofen in comparison to placebo, acetaminophen, and acetaminophen plus codeine. *J Clin Pharmacol.* 1983, 23(1): 37-43.
- Ebrahimzadeh H, Saharkhiz Z, Tavassoli M, Kamarei F, Asgharinezhad AA. Ultrasound-assisted emulsification microextraction based on solidification of floating organic droplet combined with HPLC-UV for the analysis of antidepressant drugs in biological samples. *J. Sep. Sci.*, 2011; 34:1275-1282.
- Eroğlu CN, Durmuş E, Kireş D. Effect of low-dose dexketoprofen trometamol and paracetamol on postoperative complications after impacted third molar surgery on healthy volunteers: A pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014;19(6): 622–627.

- Farrar H, Letzig L, Gill M. Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*,2002; 780:341-348.
- Feizi N, Yamini Y, Moradi M, Karimi M, Salamat Q, Amanzadeh H. A new generation of nano-structured supramolecular solvents based on propanol/gemini surfactant for liquid phase microextraction. *Anal Chim Acta.* 2017; 953: 1-9.
- Gaddam RR, Vasudevan D, Narayan R, Raju K. Controllable synthesis of biosourced blue-green fluorescent carbon dots from camphor for the detection of heavy metal ions in water. *RSC Advances*, 2014; 4(100): 57137-57143.
- Gałaszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. *Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 50: 78-84.
- Haq N, Iqbal M, Alanazi FK, Alsarra IA, Shakeel F. Applying green analytical chemistry for rapid analysis of drugs: Adding health to pharmaceutical industry. *Arab J Chem.* 2017;10: 777-785.
- Hemmati M, Rajabi M, Asghari A. Magnetic nanoparticle based solid-phase extraction of heavy metal ions: a review on recent advances. *Microchimica Acta*, 2018, 185(3):160-169.
- Hennion MC. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1999; 856: 3–54.
- Herrador MA, Gonzalez G. Potentiometric titrations in acetonitrile-water mixtures: Evaluation of aqueous ionisation constant of ketoprofen. *Talanta*, 2002; 56(4):769-775.
- Horvath C, Melander W, Molnar I, Molnar P. Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *Analytical Chemistry*, 1977; 49(14): 2295-2305.
- Hwang TY, Kin CM, Shing WL. A review on extraction solvents in the dispersive liquid-liquid microextraction. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 2018; 22(2): 166-174.

- Jia S, Li J, Park SR, Ryu Y, Park IH, Park JH, Lee J. Combined application of dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplets and charged aerosol detection for the simple and sensitive quantification of macrolide antibiotics in human urine. *J. Pharm.Biomed.*, 2013; 86:204-213.
- Jouyban A, Sorouraddin M, Farajzadeh MA, Bakhtiyari RF. Determination of five antiarrhythmic drugs in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 2015; 134: 681-689.
- Kapıcıoğlu MS. Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi*, 2007; 6(1-2): 69-78.
- Khan M, Yilmaz E, Sevinc B, Sahmetlioglu E, Shah J, Jan MR, Soylak M. Preparation and characterization of magnetic allylamine modified graphene oxide-poly (vinyl acetate-co-divinylbenzene) nanocomposite for vortex assisted magnetic solid phase extraction of some metal ions. *Talanta*, 2016; 146: 130-137.
- Khezeli T, Daneshfar A, Sahraei R. Emulsification liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent: An extraction method for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and seven polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples. *Journal of Chromatography A*, 2015; 1425: 25-33.
- Kole PL, Venkatesh G, Kotecha J, Sheshala R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed Chromatogr.* 2011; 25(1): 199-217.
- Krstulovic AM, Brown PR. *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Theory, Practice and Biomedical Applications*, John Wiley & Sons, USA, 1982; 97-99.
- Leea H, Choib C, Byeona J. Simultaneous determination of flurbiprofen and its hydroxy metabolite in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical application. *Journal of Chromatography B*, 2014; 971:58-63.

- Liljegren G. Development and investigations of novel sample preparation techniques, electrochemical extraction and evaluation of miniaturized analytical devices coupled to mass spectrometry. digital comprehensive summaries of uppsala dissertations from the faculty of science and technology. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2005; 11-16.
- Liu Q, Shi J, Sun J, Wang T, Zeng L, Jiang G. Graphene and graphene oxide sheets supported on silica as versatile and high-performance adsorbents for solid-phase extraction. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2011; 50: 5913–5917.
- Liudmila LM, Theken KN, Gong L, Thorn CF, Fitz-Gerald GA, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: ibuprofen pathways. *Pharmacogenet Genomics*, 2015; 25(2): 96–106.
- Lopez-Jiménez FJ, Mariá L, Sicilia D, Rubio S. Supramolecular Solvents in the Analytical Process. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd. 2014: 1-16.
- López-Jiménez FJ, Ballesteros-Gómez A, Rubio S. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH4) in food by vesicular supramolecular solvent-based microextraction and LC-fluorescence detection. *Food Chem.* 2014; 143: 341-347.
- Macherey-Nagel, Sample Preparation, Solid Phase Extraction. In: *Macherey-Nagel Catalogue*, 2004; 184-241.
- Majors RE, Trends in sample preparation. *North America*, 2002; 20: 1098- 1113.
- Malviya R, Bansal V, Pal OP, Sharma PK. High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2010; 2(5): 22-26.
- Maria CC, Rubio DSS. Chapter 5 - Supramolecular Solvents for Green Chemistry, *The Application of Green Solvents in Separation Processes*, 2017, 111-137.
- McEvoy GK. *AHFS Drug Information 90*. MD: American Society of Hospital Pharmacists, 1990; 1020.
- Meyer VR. *Practical high performance liquid chromatography*, John Wiley & Sons, USA, 2004; 159-175.

- Miranda HF, Sierralta F, Aranda N, Noriega V, Prieto JC. Pharmacological profile of dexketoprofen in orofacial pain. *Pharmacol Reports*, 2016; 68(6): 1111-1114.
- Miroshnichenko II, Baymeeva NV. Simultaneous determination of antipsychotic drugs and their active metabolites by LC–MS-MS and its application to therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatographic Science*, 2018; 56(6): 510–517.
- Mohamed HM. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. *Trends Anal Chem*. 2015; 66: 176-192.
- Molaei K, Asgharinezhad AA, Ebrahimzadeh H. Surfactant-assisted dispersive liquid–liquid microextraction of nitrazepam and lorazepam from plasma and urine samples followed by high-performance liquid chromatography with UV analysis. *J. Sep. Sci.*, 2015; 38: 3905–3913.
- Oda Y, Asakawa N, Abe S, Yoshida Y, Sato T. Avidin protein-conjugated column for injection analysis of drug enantiomers in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromtogr. Biomed. Appl.*, 1991; 570: 133–141.
- Oda Y, Asakawa N, Yoshida Y, Sato T. On-line determination and resolution of the enantiomers of ketoprofen in plasma using couple achiral-chiral high-performance liquid chromatography. *J Pharm. Biomed. Anal.*, 1992; 10: 81–87.
- Oğuzhan Y, Aksoy Ö. Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyonu. *F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi*, Elazığ, 2006; 20(3): 259-269.
- Orbey MT. *Analitik Kimya Pratikleri*, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 3. Baskı Ankara 2012; 97-98.
- Palylyk E, Jamali F. Simultaneous determination of ketoprofen enantiomers and probenecid in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromtogr. Biomed. Appl*, 1991; 568: 187–196.
- Park KE, Qin Y, Bavry AA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their effects in the elderly. *Aging Health*, 2012; 8(2):167–177.
- Pawliszyn J. New directions in sample preparation for analysis of organic compounds. *Trends Anal. Chem*, 1995; 14:113-122.

- Payán MR, Ángel M, López B, Fernández-Torres R, Luis J, Bernal P, Mochón MC. HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME). *Anal Chim Acta*, 2009; 653: 184–190.
- Payan MR, MasPOCH S, Llobera A. An effective micro fluidic based liquid-phase microextraction device (mLPME) for extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological and environmental samples, *Anal. Chim. Acta*, 2016; 946: 56–63.
- Pichon V. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, 2000; 885: 195–215.
- Poole CF, Gunatilleka AD, Sethuraman R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction, *J. of Chromatography A*. 2000; 885: 17–39.
- Rainsford KD, *Ibuprofen: Discovery, Development and Therapeutics*, First Ed., John Wiley & Sons, Ltd, 2015, 22-50.
- Rainsford KD. Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology*, 2009; 17(6): 275-342.
- Rao RN, Raju SS, Vali RM. Ionic-liquid based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic determination of anti-hypertensives in rat serum. *J. Chromatogr. B*, 2013; 931:174-180.
- Rao RN, Vali RM, Rao AVP. Determination of rifaximin in rat serum by ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction combined with RP-HPLC. *J. Sep. Sci.*, 2012; 35: 1945-1952.
- Rençber S, Karavana SY, Özyacı M. Bioavailability File: Ketoprofen. *Fabad J. Pharm. Sci.* 2009; 34: 203-216.
- Rosenfeld JM, Solid-phase analytical derivatization: Enhancement of sensitivity and selectivity of analysis. *Journal of Chromatography A*, 1999; 843: 19–27.

- Sahu S, Behera B, Maiti TK, Mohapatra S. Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents. *Chemical Communications*, 2012; 48(70): 8835-8837.
- Sarafraz-Yazdi A, Amiri A. Liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem*, 2010; 29(1):1-14.
- Saraji M, Boroujeni MK. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. *Anal Bioanal Chem*, 2014; 406(8): 2027-2066.
- Sciortino A, Cannizzo A, Messina F. Carbon Nanodots: a review—from the current understanding of the fundamental photophysics to the full control of the optical response. *Journal of Carbon Research*, 2018; 4 (67):1-35.
- Shabir AG. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatography A*, 2003; 987: 57–66.
- Shellack N, Makgatho S, Fourie J. A review of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *S Afr Pharm J*.2015; 82(3): 8-18.
- Shohin IE, Kulnich JI, Ramenskaya GV, Abrahamson B, Kopp S, Langguth P, Pollı JE, Shah VP, Groot DW, Barends DM, Dressman JB. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: ketoprofen. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012; 101: 3593-3603.
- Skoog DA, Leary JJ. *Principles of Instrumental Analysis*, 4th Edition, Harcourt Brace College Publishers, New York 1992; 22-27.
- Snyder LR, Glajch JL, Kirkland JJ. *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, USA, 1997; 266-288.
- Sögüt Ö, Kayalı A. Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel bir Bakış. *Ankara Ecz.Fak. Derg.* 2005; 34(1): 41–57.
- Thammana M. A review on high performance liquid chromatography (hplc). *Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016; 5(2): 22-28.

- Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 2002; 74(5): 835–855.
- Toasaksiri S, Massart DL, Heyden VY. Study of method validation criteria in a capillary electrophoresis method for the separation of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Anal Chim Acta*, 2000; 416:1: 29-42.
- Tuncer S, Tavlan A, Köstekçi H, Reisli R, Otelcioğlu E. Postoperatif ağrıda deksketoprofen kullanımı. *Ağrı*, 2006; 3: 18-29.
- Vaghela A, Patel A, Patel A, Vyas A, Patel N. Sample Preparation In Bioanalysis□: A Review. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 2016; 5(5): 6-10.
- Vasconcelos I, Fernandes C. Magnetic solid phase extraction for determination of drugs in biological matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 2017, 89: 41-52.
- Walczak JS. Analgesic properties of dexketoprofen trometamol review. *Pain Manage*, 2011; 1(5): 409–416.
- Wang P, Qiu X, Yang Y. Determination of estrogens in human urine by vortex-assisted dispersive liquid liquid microextraction based on floating organic acid droplet combined with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol*, 2015; 38:640-646.
- Wang X, Qu K, Xu B, Ren J, Qu X. Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents. *Journal of Materials Chemistry*, 2011; 21(8): 2445-2450.
- Wang X, Wang Y, Zou X, Cao Y. 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. *Anal. Methods*, 2014; 6: 2384-2389.
- Waraksa E, Kacper Woźniak M, Kłodzińska E, Wrzesień R, Bobrowska-Korczak B, Namieśnik J. A rapid and sensitive method for the quantitative analysis of

ibuprofen and its metabolites in equine urine samples by gas chromatography with tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2018;41: 3881–3891.

Wong SRY. Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Cancer Prevention and Cancer Promotion. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2019, 1-10.

Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami J. A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly. *Aging Dis.* 2018; 9(1): 143-156.

Wu HF, Kailasa SK, Lin CH. Single drop microextraction coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid and direct analysis of hydrophobic peptides from biological samples in high salt solution. *Rapid Commun. Mass Spectrosc.* 2011; 25: 307-315.

Wu HF, Kailasa SK, Yan JY, Chin CC, Ku HY. Comparison of single-drop microextraction with microvolume pipette extraction directly coupled with capillary electrophoresis for extraction and separation of tricyclic antidepressant drugs. *J. Ind. Eng. Chem.*, 2014; 20: 2071-2076.

Wu S, Sun A, Zhai F, Wang J, Xu W, Zhang Q, Volinsky AA. Fe₃O₄ magnetic nanoparticles synthesis from tailings by ultrasonic chemical co-precipitation. *Materials Letters*, 2011, 65(12): 1882-1884.

Xiang G, Wang Y, Zhang H, Fan H, Fan L, He L, Zhao W. Carbon dots based dual-emission silica nanoparticles as ratiometric fluorescent probe for nitrite determination in food samples. *Food Chemistry*, 2018; 260: 13-18.

Yardımcı C. Rosiglitazon ve Metformin'in Kapiler Elektroferez ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Yöntemleri ile Farmasötik Preparatlardan ve Biyolojik Materyalden Aynı Anda Analizi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006; 35-58.

Yazdi AS, Razavi N. Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline in biological samples using single-drop microextraction with GC. *Chromatographia*, 2011; 73: 549-557.

- Yıldız A, Genç Ö, Bektaş S. Enstrümental Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 1997; 49-58.
- Zhang H, Chen Y, Liang M, Xu L, Qi S, Chen H, Chen, X. Solid-phase synthesis of highly fluorescent nitrogen-doped carbon dots for sensitive and selective probing ferric ions in living cells. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(19): 9846-9852.
- Zhang X, Chen S, Wang Z, Ding M, Xia J, Han Q. Facile and tunable fabrication of Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposites and their application in the magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples. *Talanta*, 2012; 101: 388–395.
- Zhao L, Zhao P, Wang L, Ma Z, Hou X, Li F. A dispersive liquid-liquid microextraction method based on the solidification of a floating organic drop combined with HPLC for the determination of lovastatin and simvastatin in rat urine. *Biomed. Chromatogr.*, 2014; 28:895-900 .
- Żwir-Ferenc A, Biziuk M. Solid phase extraction technique – trends, opportunities and applications. *Polish J. of Environ. Stud*, 2006; 15(5): 677-690.
- WEB_1 https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
- WEB_2 <http://www.ieis.org.tr/ieis/tr/indicators/33/turkiye-ilac-pazari>, Erişim tarihi: 22 Ağustos 2019.
- WEB_3 <https://www.medicalnewstoday.com/articles/179211.php>, Erişim tarihi: 28 Temmuz 2019.
- WEB_4 <https://www.tga.gov.au/alert/non-steroidal-anti-inflammatory-drugs-nsaids-review>, Erişim tarihi: 11 Temmuz 2019.
- WEB_5 <https://www.drugs.com/international/dexketoprofen.html>, Erişim tarihi: 2 Temmuz 2019.
- WEB_6 <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01050>, Erişim tarihi: 5 Ağustos 2019.
- WEB_7 <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>, Erişim Tarihi: 29 Haziran 2019.

WEB_8<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-fda-strengthens-warning-non-aspirin-nonsteroidal-antiinflammatory>, Erişim Tarihi:1 Temmuz2019.

WEB_9<https://www.tga.gov.au/sites/default/files/safety-review-nonsteroidal-anti-inflammatory-drugs-nsaids-and-spontaneous-abortion-161018.pdf>, Erişim Tarihi: 22 Ağustos 2019.

WEB_10<https://ibsen.com/applications/spectroscopy/high-pressure-liquid-chromatography/>, Erişim tarihi: 20 Temmuz 2019.



EK-1: Etik Kurul Raporu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KA EK-00)			
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Non Steroidal Antiinflamatuar İlaçlar ile Birlikte Kullanılan İlaç Etken Maddelerinin İnsan Plazmasında Analizine Yeni Yaklaşımlar		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU			
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ	
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11	
	FAKS	0 352 437 52 85	
	E-POSTA	byancar@erciyes.edu.tr	
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. İbrahim Narin	
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Analitik Kimya	
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi/Kayseri	
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ ADI SOYADI		
	DESTEKLEYİCİ		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>
FAZ 4		<input type="checkbox"/>	
Gözetimsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>	
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>	
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>	
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>	
Diğer ise belirtiniz	Doktora Tezi		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOKMERKEZ <input type="checkbox"/> ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/> ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>		

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÖŞÖNEL
İmza:


Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Non Steroidal Antiinflamatuar İlaçlar ile Birlikte Kullanılan İlaç Etken Maddelerinin İnsan Plazmasında Analizine Yeni Yaklaşımlar
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ÖLÜR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama				
	SİGORTA					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU					
	ILAN					
	YILLIK BİLDİRİM					
	SONUÇ RAPORU					
	GUVENLİK BİLDİRİMLERİ					
DİĞER						
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2016/154	Tarih : 04 03 2016				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırma/çalışmanın gereği, araştırma ve yöneticileri dikkate alınarak incelendiği ve uygun bulunmuş olup araştırma/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan etik kurul üyelerinin salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Tez ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaların Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile İlgili	Katılım (*)	İmza
Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL	Çocuk Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Karamehmet YILDIZ	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Salih KUK	Tıbbi Parazitoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ	Çocuk Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Aydın ÜNAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Güven KAHRIMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Kemal ÖZYURT	Dermatoloji	Kayıseri Eğitim Hast.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Cene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek. Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yardı. Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yardı. Doç. Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Av. Zafer Tuğrul SARIASLAN	Avukat	Hukuk Müşaviri	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
İcz. Şükran TEPEZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Serkan KARACA	Sivil Üye	Öğretmen	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

* Toplantıda Bulunan

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL, Y.
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmaktadır.

DEKSKETOPROFEN VE İBUPROFEN'İN İNSAN PLAZMASINDA YENİ NESİL EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ İLE AYRILMASI VE HPLC İLE TAYİNİ

ORIJINALLIK RAPORU

% **14**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **8**

İNTERNET
KAYNAKLARI

% **1**

YAYINLAR

% **10**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 2
2	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
4	pharmacy.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	www.onebilgio.com İnternet Kaynağı	% 1
6	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	% 1
7	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	% 1
8	Submitted to (school name not available) Öğrenci Ödevi	% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Dönay YUVALI

Uyruğu : T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri : 12.12.1989 / Kocasinan

Medeni durum : Evli

E- mail : d.yuvali12@gmail.com, dyuvali@erciyes.edu.tr

Yazışma Adresi : Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya ABD
38039, Melikgazi/ KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2007-2012
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya ABD	2012-2014
Doktora	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya ABD	2014-

YABANCI DİLLER

İngilizce

ÇALIŞTIĞI KURUMLAR

Kadro	Kurum	Tarih
Araştırma Görevlisi	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya ABD	2012- halen