

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
2020-DR-011

VEMURAFENİBİN MİKROEKSTRAKSİYON
YÖNTEMİ İLE ÖN DERİŞTİRİLMESİ, TAYİNİ
VE OPTİMİZASYONU

Pınar ALP

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa DEMİR

AYDIN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Kimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Pınar ALP tarafından hazırlanan “Vemurafenib’in Mikroekstraksiyon Yöntemi ile Ön Deriştirilmesi, Tayini ve Optimizasyonu” başlıklı tez, 17.07.2020 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmza sı
Başk an :	Prof. Dr. Mustafa DEMİR	ADÜ	
Üye :	Prof. Dr. Kubilay GÜÇLÜ	ADU	
Üye :	Prof. Dr. Ahmet BALCI	MSKU	
Üye :	Doç. Dr. Cem ESEN	ADÜ	
Üye :	Dr.Öğr. Üyesi Ahmet AYKAÇ	İKCU	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla(tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gönül AYDIN
Enstitü Müdürü



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

17/07/2020

İmza

Pınar ALP



ÖZET

VEMURAFENİB'İN MİKROEKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE ÖN DERİŞTİRİLMESİ, TAYİNİ VE OPTİMİZASYONU

Pınar ALP

Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa DEMİR

2020, 121 sayfa

Melanoma, bir cilt kanseri türüdür. Ancak erken tanı ve tedavi imkânlarının gelişmesi ile tedavisi mümkün olmuştur. Vemurafenib, melanom hastalığının tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Daha önce tedavi edilemeyen metastatik melanoma hastalarında vemurafenib ile devam eden klinik çalışmalarda dacarbazine kıyasla sağkalımda artış gözlemlendiğinden dolayı vemurafenib, son yıllarda oldukça ilgi çekici ve üzerine çalışmaların yoğunlaştığı bir ilaç haline gelmiştir. Klinik çalışmaları ve tedavi edici ilaçları gözlemlemeyi desteklemek amacıyla vemurafenib'in tayini için bir analiz gereklidir. İlaçların analizinde doğru ve hassas sonuçlar elde etmek için önderiştirme yöntemleri kullanmak gerekmiştir. Son zamanlarda, dağıtıcı sıvı-sıvı mikro-ekstraksiyon (DLLME) olarak adlandırılan bir sıvı faz mikro ekstraksiyon tekniği oldukça ön plana çıkmıştır. Bu yöntem, ekstraksiyon sonrasında alınan örneğin doğrudan GC veya HPLC'ye enjekte edilebilmesine olanak sağlaması, yüksek zenginleştirme oranı, ekstraksiyon ve zenginleştirmenin yanısıra ayırma işleminin de yapılabilmesi, düşük maliyeti, hızlı olması ve işlem kolaylığı gibi üstün avantajlarından dolayı giderek daha fazla insanın ilgisini çekmiştir. Bu doktora çalışmasında dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi kullanılarak vemurafenibin ön deriştirilmesi, tayini ve optimizasyonunu gerçekleştirilmiştir. Bu sayede düşük maliyetle, hızlı, yüksek zenginleştirme faktörü elde edilerek vemurafenibin eser miktarları da ölçülmüştür. Geliştirilip optimize edilen bu yöntem yapay idrar ve su numunelerinde uygulanmış, sonuçlar istatistiksel olarak da incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Vemurafenib, dağılımlı sıvı sıvı mikro ekstraksiyonu, zenginleştirme, HPLC.



ABSTRACT

PRECONCENTRATION, DETERMINATION AND OPTIMIZATION OF VEMURAFENIB WITH MICROEXTRACTION METHOD

Pınar ALP

PhD. Thesis, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa DEMİR

2020, 121 pages

Melanoma is a type of skin cancer. However, with the development of early diagnosis and treatment opportunities, patients are diagnosed and treated at an early stage. Vemurafenib is a drug used in the treatment of melanoma disease. Vemurafenib has become a highly interesting and concentrated drug in recent years because of an increase in survival compared to dacarbazine in clinical trials with vemurafenib in previously untreated metastatic melanoma patients. An analysis for the determination of vemurafenib is required to support clinical studies and monitoring of therapeutic drugs. In order to obtain accurate and accurate results in the analysis of drugs, it is necessary to use preconcentration methods. Recently, a liquid phase micro-extraction technique called dispersing liquid-liquid micro-extraction (DLLME) has come to the fore. This method allows the injection of eg post-extraction directly into gas chromatography (GC) or highpressure liquid chromatography (HPLC), high enrichment rate, extraction and enrichment, as well as separation, low cost, speed and ease of operation. is attracting more and more people because of its superior advantages. In this doctoral study, pre-concentration, determination and optimization of vemurafenib was carried out by using dispersing liquid-liquid microextraction method. Thus, fast, high enrichment factor was obtained at low cost and very small amounts of vemurafenib were measured. This method, which was developed and optimized, was applied on artificial urine and water samples, and the results were statistically analyzed.

Key Words: Vemurafenib, dispersive liquid liquid microextraction, enrichment, HPLC.



ÖNSÖZ

Vemurafenib'in mikroekstraksiyon yöntemi ile ön deriştirilmesi, tayini ve optimizasyonunun araştırılmasını amaçlayan bu tez çalışması Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Tez çalışmalarımındaki desteklerinden dolayı saygıdeğer danışman hocam, sayın Prof. Dr. Mustafa DEMİR'e sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Tez İzleme Komitesi'nde benimle her türlü bilgi ve tecrübelerini paylaşan hocalarım sayın Prof. Dr. Ahmet Balcı'ya ve Doc. Dr. Cem ESEN'e katkıları için teşekkür ederim.

Tezimde bilimsel, maddi, manevi ve saymakla bitmeyecek her türlü desteklerinden dolayı Sayın Doc. Dr. Gülşen GÜVEN'e sonsuz teşekkürler.

Sosyal hayatımda beni destekleyen, hırslandıran canım eşim Murat ALP ve bu kadar uzamasına rağmen doktoramı bitirmeyi borç bildiğim biricik kızım, can parçam Mira ALP'e sabırlarından dolayı çok teşekkür ederim. Ayrıca her koşulda bana destek olan, sevgi, anlayış ve hoşgörülerini eksik etmeyen annelerim Cevher BİLGİN ve Sevgi ALP, babalarım Caner BİLGİN ve Vaner ALP, kardeşim Çağlar BİLGİN, ablalarım Ebru KAYIR ve Elif ALP'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında olanaklarından faydalandığım Kimya Bölümü'ne ve uzadıkça uzayan doktora sürecimde tüm sorularıma sabırla cevap olan Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü personeline (özellikle Tufan TÜRKÖZ'e) teşekkür ederim.

Pınar ALP



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1. Melanoma	1
1.2. Vemurafenib	2
1.2.1. Kimyasal Özellikleri	3
1.3. Zelboraf®	3
1.3.1. Farmakokinetik Özellikler	4
1.3.2. Farmasötik Özellikleri	6
1.3.2.1. Yardımcı Maddelerin Listesi	6
1.3.2.2. Raf Ömrü	7
1.3.2.3. Saklamaya Yönelik Özel Tedbirler	7
1.3.2.4. Beşerî Tıbbi Üründen Arta Kalan Maddelerin İmhası ve Diğer Özel Önlemler	7
1.4. İlaçların Analizinde Kullanılan Yöntemler	7

1.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	9
1.5.1. Hareketli Faz Haznesi.....	11
1.5.2. Bağlantı Ekipmanlar ve Hareketli Faz Uygulama Sistemi	12
1.5.3. Hareketli Faz Pompası.....	12
1.5.4. Enjektörler	13
1.5.5. Kolon	14
1.5.6. Sıvı Kromatografi Dedektörleri.....	15
1.5.7. Kayıt Cihazı.....	16
1.6. Ekstraksiyon yöntemleri	16
1.7. Mikroekstraksiyon Yöntemleri.....	17
1.7.1. Katı Faz Mikroekstraksiyonu (SPME)	19
1.7.2. Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu (LPME)	19
1.7.2.1. Asılı Damla Mikroekstraksiyonu (SDME).....	20
1.7.2.2. Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyonu (SFODME)	20
1.7.2.3. Oyuk Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu (HF-LPME).....	21
1.7.2.4. Dağıtıcı sıvı mikroekstraksiyonu (DLLME)	21
1.8. Ekstraksiyon Verimini Etkileyen Parametreler	24
1.8.1. Çözücü Türü ve Miktarının Ekstraksiyon Verimine Etkisi	24
1.8.2. pH'ın Ekstraksiyon Verimine Etkisi.....	26
1.8.3. Tuz Eklemeinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi	26
1.8.4. Sıcaklığın Ekstraksiyon Verimine Etkisi.....	26
1.8.5. Santrifüj Hızı ve Süresinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi	27
1.8.6. Ekstraksiyon Süresinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi	27
1.9. Analitik Yöntem Validasyonu (Yöntem Geçerlilik Testleri)	28
1.9.1. Seçicilik	29
1.9.2. LOD ve LOQ	30
1.9.3. Ölçüm Aralığı ve Doğrusallık	32
1.9.4. Doğruluk (Geri Kazanım).....	33
1.9.5. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik-Tekrar Üretilbilirlik).....	34
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	37
2.1. Vemurafenib ile İlgili Çalışmalar	37
2.2. DLLME Yönteminin Kullanımı ile İlgili Çalışmalar	39

3. MATERYAL VE YÖNTEM	44
3.1. Kullanılan Kimyasallar	44
3.1.1. Vemurafenib Stok Çözeltilisinin Hazırlanması	45
3.1.2. Tampon Çözeltilisinin Hazırlanması	45
3.1.3. Mobil Fazın Hazırlanması	45
3.2. Kullanılan Ekipman ve Cihazlar	45
3.3. Vemurafenib Tayini İçin Optimizasyon Çalışmaları	46
3.3.1. Ekstraksiyon Çözücüsü ve Dağıtıcı Çözücü Seçimi	47
3.3.2. Ekstraksiyon Çözücüsü ve Dağıtıcı Çözücü Hacminin Belirlenmesi	49
3.3.3. pH'ın Ekstraksiyon Verimine Etkisi	50
3.3.4. Tuz Eklemenin Ekstraksiyon Verimine Etkisi	51
3.3.5. Sıcaklığın Ekstraksiyon Verimine Etkisi	51
3.3.6. Santrifüj Hızının ve Süresinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi	52
3.3.7. Ekstraksiyon Süresinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi	53
3.4. Optimize Edilen Metodun Yapay İdrar Numunesine Uygulanması	54
3.4.1. 1 Nolu Yapay İdrar Numunesinin Hazırlanması	54
3.4.2. 2 Nolu Yapay İdrar Numunesinin Hazırlanması	55
3.5. Optimize Edilen Metodun Çeşme Suyu Numunesine Uygulanması	71
3.6. Metodun Validasyonu	72
3.6.1. Seçicilik	72
3.6.2. LOD ve LOQ	72
3.6.3. Ölçüm Aralığı ve Doğrusallık	73
3.6.4. Doğruluk (Geri Kazanım)	73
3.6.5. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik-Tekrar Üretilbilirlik)	73
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	75
4.1. Vemurafenib Tayini İçin Optimizasyon Çalışmaları	75
4.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü ve Dağıtıcı Çözücü Seçimi	75
4.1.2. Ekstraksiyon Çözgeni ve Dağıtıcı Çözgen Hacminin Belirlenmesi	79
4.1.3. pH'ın Ekstraksiyon Verimine Etkisi	82
4.1.4. Tuz Eklemenin Ekstraksiyon Verimine Etkisi	84
4.1.5. Sıcaklığın Ekstraksiyon Verimine Etkisi	86
4.1.6. Santrifüj Hızının ve Süresinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi	88
4.1.7. Ekstraksiyon Süresinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi	91

4.2. Optimize Edilen Metodun Yapay İdrar Numunesine Uygulanması	93
4.3. Optimize Edilen Metodun Çeşme Suyu Numunesine Uygulanması	96
4.4. Metodun Validasyonu	97
4.4.1. Seçicilik	98
4.4.2. LOD ve LOQ	99
4.4.3. Ölçüm Aralığı ve Doğrusallık	100
4.4.4. Doğruluk (Geri Kazanım)	102
4.4.5. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik-Tekrar Üretilbilirlik)	104
5. SONUÇ	107
KAYNAKLAR	111

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg	:Mikrogram
mcg	:Mikrogram
mL	:Mililitre
mmol	:Milimol
ng	: Nanogram
ppm	: Milyonda bir
ppb	: Milyarda bir
ng	:Nanogram

Kısaltmalar

EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
FTIR	: Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi
HPLC	: Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
LC	: Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektroskopisi/Kütle Spektroskopisi
UV	: Ultraviyole
UPLC-MS	: Ultra Performans Sıvı Kromatografi-Kütle Spektroskopisi

MS	: K�t�le Spektroskopisi
DKE	: Dikloroetan
K	: Kloroform
DKM	: Diklorometan
KB	: Klorobenzen
A	: Aseton
E	: Etanol
ACN	: Asetonitril
M	: Metanol
CE	: Kapiler Elektroforez
TKI	: Trozin Kinaz İnhibitörü
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu)
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
OPP	: Organofosforlu Pestisitler
CP	: Klorofenoller
OSP	: Organos�lf�rl� Pestisitler
SBSE	: Manyetik Karıştırma �ubuęu Ekstraksiyonu
SPME	: Kat Faz Mikroekstraksiyon
LPME	: Sıvı Faz Mikroekstraksiyon
SDME	: Asılı Damla Mikroekstraksiyon
SFODME	: Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyonu
HF- LPME	: Oyuk Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu

CPE	: Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu
HLLE	: Homojen Sıvı Sıvı Ekstraksiyonu
LOD	: Tespit Limiti
LOQ	: Tayin Limiti
LOL	: Doğrusallık Limiti
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
VIM	: Uluslararası Metroloji Sözlüğü
GLP	: Yöntem Geçerliliği ve İyi Laboratuvar Uygulamaları
SOP	: Standart Çalışma Yöntemi
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Komitesi
TS	: Türk Standartları
IEC	: Uluslararası Elektroteknik Komisyonu
US EPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Bürosu
AOAC:	: Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği
USP	: Amerikan Farmakopesi
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
WELAC	: Batı Avrupa Laboratuvar Akreditasyon İş Birliği
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
ANOVA	: Varyans Analizi
APDC	: Amonyum Pirolidin Ditiyo Karbamat



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Vemurafenibin moleküler yapısı (Sparidans, R.W. ve ark., 2012)	3
Şekil 1.2. Yüksek performans sıvı kromatografi bölümleri (Özgür, D., 2011).....	11
Şekil 1.3. Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (DLLME) Sistemi (E. Alver ve ark., 2012)	23
Şekil 4.1. Farklı dağıtıcı ve ekstraksiyon çözücüsü kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 2,50 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in % geri kazanım değerleri üzerine etkisi	77
Şekil 4.2. Farklı dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözücü hacimlerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi	82
Şekil 4.3. Farklı pH değerlerinin, ekstraksiyon sonrasında 5 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi	84
Şekil 4.4. Farklı %NaCl değerlerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi.....	85
Şekil 4.5. Farklı sıcaklık değerlerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi.....	87
Şekil 4.6. Farklı santrifüj hızlarının, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi.....	89
Şekil 4.7. Farklı santrifüj sürelerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi.....	90
Şekil 4.8. Farklı ekstraksiyon sürelerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi.....	92
Şekil 4.9. 1 nolu yapay idrar numunesinde Vemurafenib'in % geri kazanım değerleri.	94

Şekil 4.10. 2 nolu yapay idrar numunesinde Vemurafenib'in % geri kazanım değerleri.....	95
Şekil 4.11. Çeşme suyu numunesinde Vemurafenib'in geri kazanım değerleri	97
Şekil 4.12. Kör numuneye ait kromatogram.....	98
Şekil 4.13. 1mg/L Vemurafenib içeren analite ait kromatogram	98
Şekil 4.14. Vemurafenib'in kalibrasyon eğrisi	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Denemelerde kullanılan ekstraksiyon çözücüsü ve dağıtıcı çözücü hacimleri.....	49
Çizelge 3.2. Pickering Laboratuvarı DIN EN 1616:1999 Yapay İdrar Örneği.....	55
Çizelge 3.3. İnsan idrarının yayınlarda belirtilen bileşenleri	56
Çizelge 3.4. 2 nolu yapay idrar numunesi için içerik ve miktar belirlenmesinde izlenen yol.....	64
Çizelge 3.5. 2 nolu yapay idrar içeriği.	70
Çizelge 4.1. Farklı dağıtıcı ve ekstraksiyon çözücüsü kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 2,50 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve % geri kazanım değerleri.....	76
Çizelge 4.2. Denemelerde ekstraksiyon sırasında oluşan bulanıklıklar.	77
Çizelge 4.3. Farklı dağıtıcı ve ekstraksiyon çözücü hacimlerinin kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve % geri kazanım değerleri.....	80
Çizelge 4.4. Farklı pH değerlerinin kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve % geri kazanım değerleri.....	83
Çizelge 4.5. Farklı %NaCl değerlerinin kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve % geri kazanım değerleri	85
Çizelge 4.6. Farklı sıcaklık değerlerinin kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve % geri kazanım değerleri.....	87

Çizelge 4.7. Farklı santrifüj hızlarının, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve %geri kazanım değerleri.....	89
Çizelge 4.8. Farklı santrifüj sürelerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve %geri kazanım değerleri.....	90
Çizelge 4.9. Farklı ekstraksiyon sürelerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve %geri kazanım değerleri.....	91
Çizelge 4.10. Ekstraksiyon sonrasında 1,00 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib içeren 1 nolu yapay idrar numunesi geri kazanım değerleri	93
Çizelge 4.11. Ekstraksiyon sonrası 1,00 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib içeren 2 nolu yapay idrar numunesi geri kazanım değerleri.....	95
Çizelge 4.12. Ekstraksiyon sonrasında 1,00 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib içeren çeşme suyu numunesi geri kazanım değerleri	96
Çizelge 4.13. 1,00 mg/L Vemurafenib'in LOD ve LOQ değerleri.	99
Çizelge 4.14. Vemurafenib'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel verileri (n=6)	101
Çizelge 4.15. 1 nolu yapay idrar numunesinde Vemurafenib'e ait geri kazanım verileri.....	103
Çizelge 4.16. 2 nolu yapay idrar numunesinde Vemurafenib'e ait geri kazanım verileri.....	103
Çizelge 4.17. Çeşme suyunda Vemurafenib'e ait geri kazanım verileri.	104
Çizelge 4.18. Tekrarlanabilirlik parametresine ait %RSD değerleri	105

Çizelge 4.19. Vemurafenib’e ait tekrar üretilebilirlik verileri.....	106
--	-----





1. GİRİŞ

1.1. Melanoma

Melanom, normal melanositlerin malign transformasyonu ile oluşan bir kanser türüdür(Solak, M., 2014). Malign melanom ölümcül cilt kanseridir. Melanom insidansı her yıl artar (Rousset, M. ve ark, 2017). Melanoma, vaka artışında en hızlı ilerleme gösteren kanser türlerinden biridir. Özellikle Avrupa kökenli beyaz ırk ve 0 ile 14 ve 15 ile 29 yaş gruplarında oldukça hızlı bir insidans artışı bildirilmesine karşın ülkemizde melanom insidansı düşüktür. Melanoma, ciddi bir metastaz potansiyeline sahiptir; hamilelikte en çok görülen kanser türü olmamasına karşın, plasenta ile fetüste en çok metastaz yapan kanser türüdür. Pigment üretimi, UV ışınlarının zararlı ve mutajenik etkilerinden korumayı sağlar. Melanositlerde ortaya çıkan mutasyonlar sonucunda melanoma açığa çıkar (Güngör, H.K., ve ark., 2016). Yeni veriler, melanomun büyük bir parçasında proteinkinaz sinyal yollarında hiper aktivasyona yol açan somatik mutajenlerin olduğunu göstermektedir. En sık rastlanan somatik mutasyon BRAF genindeki nokta mutasyonudur (Solak, M., 2014).

Malign melanom, özellikle genç erişkinlerde en sık rastlanan kanser türlerinden birisidir. Malign melanomda MAPK yolağında, %20 oranında NRAS, %50 oranında BRAF mutasyonu olduğu geniş serilerde gösterilmiştir. Bu bulgunun ardından yolağı hedef alan BRAF ve MEK inhibitörlerine yüksek tedavi yanıtına karşın, ortalama olarak tedavinin 7. ayında BRAF inhibitörlerine direnç gelişmekte ve bunun ardından hızlı tümör progresyonu meydana gelmektedir. Kemoterapötik ajanlara direnç, insan kanserlerinin klinik tedavisinde en büyük engellerden biridir (Gençoğlu, G., 2018).

Melanom, erken teşhis ve tedavi olanaklarının ilerlemesi ile %83 oranında erken safhada tanınmakta ve hastalığın iyileştirilmesi mümkün kılınmaktadır. 1. evredeki melanomada 5 yıl için sağ kalım % 95 ile % 100 oranında iken 2. evrede bu oran %65 ile %92 arasında bulunur. Melanomanın, metastaza uğrayan evreye geçmesinin ardından sağkalım yüzdelerinde ciddi bir düşüş görülmektedir. 3. evrede 5 yıllık sağkalım %41 ile 71 arasında iken 4. evrede bu oran %9 ile 28 aralığına düşmektedir. İleri evre melanomda yaşama şansı 1 seneden daha azdır ve bilinen kanser türlerinden en ölümcüllerinden biridir. En sık metastaz bölgeleri, derialtı

dokular, lenf bezeleri, karaciğer, akciğer, kemik ve beyindir. Başka organlarda da metastaz gerçekleşebilir (Güngör, H.K., ve ark., 2016).

BRAF İnhibitörleri; Sorafenib, Vemurafenib ve Dabrafenib'dir (Solak, M., 2014). Vemurafenib FDA tarafından maling melanom tedavisinde ilk onaylanan BRAF inhibitörüdür (Gençoğlu, G., 2018).

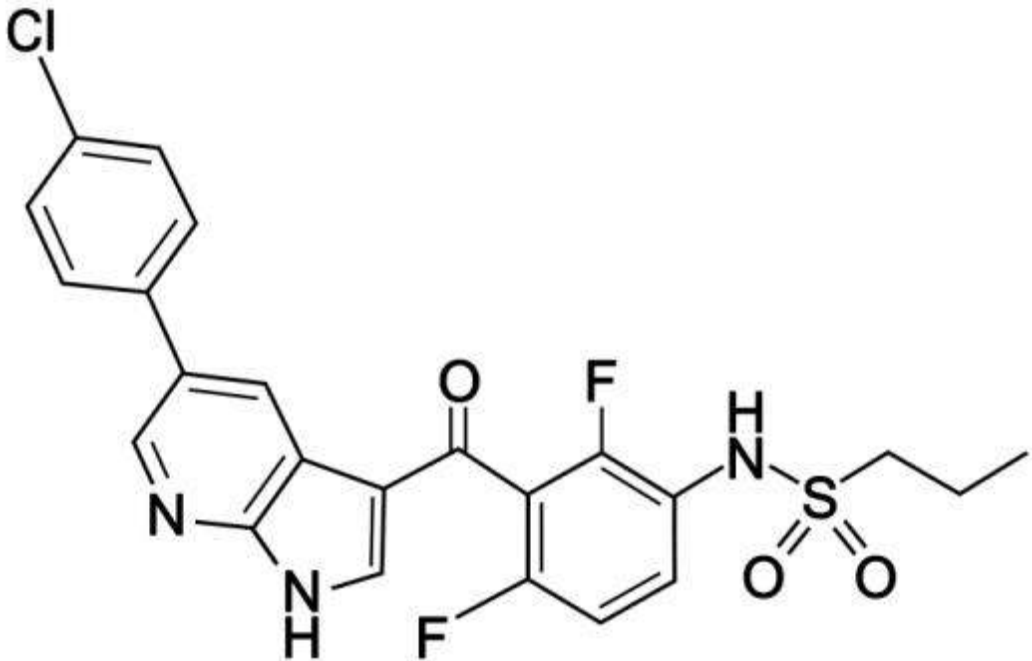
1.2. Vemurafenib

Vemurafenib, melanom hastalarının tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. İlaç, ağustos 2011'de FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır ve Zelboraf® olarak tescillenmiştir. V600E ve V600K mutasyonlarına sahip hastalarda Vemurafenibin tümörü azaltıcı etkisi vardır. Ancak mutant alleli taşımayan hastalarda, normal BRAF'ı aktive ederek tümör gelişimine neden olur (Güngör, H.K., ve ark., 2016). Son zamanlarda, daha önce tedavi edilemeyen metastatik melanoma ile bu mutasyona uğramış hastalarda vemurafenib ile devam eden Faz III klinik çalışmada dakarbazine kıyasla sağkalımda artış gözlemlendi. BRAF mutasyonu pozitif olan hastalarda Vemurafenib, faz III çalışmasında dakarbazin ile kıyaslandığında 6. aydaki toplam sağkalım vemurafenib için %84 iken dakarbazin için %64 olarak tespit edilmiştir. Toplam sağkalım ise, vemurafenib için 13,6 ay iken, dakarbazin için 9,7 ay olarak bulunmuştur. Progresyonsuz sağkalım ise, vemurafenible 6,9 ay iken dakarbazin ile 1,6 ay olarak tespit edilmiştir (Roche S.p.A., 2014).

Vemurafenib, mutant BRAF'ın kinaz bölgesinin potent bir inhibitörüdür (Solak, M., 2014). Vemurafenib, V600E mutasyonuna uğramış BRAF geni tarafından kodlanan serin / treonin-protein kinaz B-Raf proteininin seçici, güçlü ve oral olarak biyoyararlanabilen ilk inhibitörüdür (Sparidans, R.W. ve ark., 2012). Vemurafenib, kanseri V600E BRAF mutasyonu içeren melanom hastalarında (yani, B-Raf protein üzerindeki 600 numaralı amino asit pozisyonunda, normal valin glutamik asit ile yer değiştirir) çalışır. Melanomların yaklaşık %60'ı bu mutasyona sahiptir. Bu mutasyona uğramamış melanom hücreleri vemurafenib tarafından inhibe edilmemiştir; ilaç, paradoks olarak normal BRAF'ı uyarır ve bu gibi durumlarda tümör büyümesini teşvik edebilir (Pradad, G.R. ve ark., 2011).

1.2.1. Kimyasal Özellikleri

Moleküler ağırlığı 489,93 g/mol, moleküler formülü $C_{23}H_{18}ClF_2N_3O_3S$ dir. Kimyasalın pKa değerleri 7,9 ile 11,1'dir. İlacın suda çözünürlüğü çok düşük ve pH'dan bağımsızdır (Strömqvist, M., 2014). Vemurafenib kimyasal olarak propan-1-sulfonik asit {3-[5-(4-klorofenil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-karbonil]-2,4difloro-fenil}-amit'tir (Chhabda, P.J. ve ark, 2013).



Şekil 1.1. Vemurafenibin moleküler yapısı (Sparidans, R.W. ve ark., 2012)

1.3. Zelboraf®

Vemurafenib'in etken madde olarak kullanıldığı ilacın ticari ismi Zelboraf®'tır. Roche Müstahzarları Sanayi A.Ş. tarafından 13.02.2014 yılında ruhsatı alınmıştır ve hala üretilmektedir.

1.3.1. Farmakokinetik Özellikler

Farmakokinetik, ilaçların canlı vücudunda emilim, dağılım ve atılımını inceleyen bir bilim dalıdır (Bingöl, N., 2015).

Analizlenecek olan ilacın farmakokinetik özelliklerini bilmek ilacın vücuda alımından itibaren hangi sürelerde kana ya da idrara maksimum ya da minimum miktarda geçeceğini bilmemiz açısından önemlidir.

Biyo farmasötikleri Sınıflandırma Sistemi'nde yayınlanan verilere bakıldığında Vemurafenib Sınıf IV bir kimyasaldır (düşük çözünürlükte ve permeabilitede). Vemurafenib'in farmakokinetik parametreleri; faz I ve faz III çalışmalarda, 960mg dozdan günde iki kez uygulaması yapılan 15 günden sonra 20 hasta ve 22. günde kararlı durumda olan 204 hasta ve yanında, 458 hastaya ait toplu verilerin kullanıldığı popülasyon farmako kinetik analizi yoluyla tespit edilmiştir. Bu hastaların 457'si beyaz ırkta aittir (Roche S.p.A., 2014).

Emilimi: Vemurafenibin 240 mg'lık tabletinin mutlak biyo yararlanımı henüz bilinmemektedir. 960 mg dozda günde 2 kez vemurafenibin alımı, yaklaşık 4 saatlik medyan Tmaks ile emilim gerçekleşmektedir. Hastadan hastaya büyük değişiklik göstermektedir. Faz II çalışmalarında, birinci gündeki EAA 0-8 saat ve Cmaks sırasıyla $22,1 \pm 12,7$ $\mu\text{g} \cdot \text{saat/mL}$ ve $4,1 \pm 2,3$ $\mu\text{g/mL}$ olmuştur. Vemurafenib günde 2 kere çoklu doz uygulanarak birikmeye neden olur. Vemurafenibin 960mg'ını günde 2 kez uygulanmasından sonra kararlı durum koşullarında 15. gün / 1. gün oranı EAA için 15 ile 17 kat ve Cmaks için 13 ile 14 kat aralığında olmuş ve EAA 0-8 saat ve Cmaks sırasıyla $380,2 \pm 143,6$ $\mu\text{g} \cdot \text{saat/mL}$ ve $56,7 \pm 21,8$ $\mu\text{g/mL}$ olmuştur (Roche S.p.A., 2014).

Aşırı yağlı yiyecekler 960mg'lık Vemurafenib in tek tabletinin bağıl biyo yararlanımını yükseltir. Açlık ve tokluk arasında geometrik ortalama oranlar Cmaks ve EAA için sırasıyla 2,6 ve 4,7 katı olmuştur. Tek bir vemurafenib tableti yiyeceklerle kullanıldığında medyan Tmaks, 4 saatten 8 saate çıkmıştır (Roche S.p.A., 2014).

Gıdaların vemurafenibe maruz kalma üstündeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Sürekli ve aç olarak olarak vemurafenib almak, yemekle veya yemeklerden bir müddet sonra sürekli ilaç almak ile kıyaslandığında anlamlı oranda daha düşük bir kararlı durum maruzatına neden olabilir. Bunun yanında Vemurafenibi arada açken almanın, kararlı durumda vemurafenibin yüksek oranda birikmesinden dolayı kararlı durum maruziyeti üstündeki etkisinin sınırlı olması beklenmektedir. Tek başına veya gıdalarla vemurafenib alan hastalardan pivotal çalışmalarda güvenilirlik ve etkililik verileri de incelenmiştir (Roche S.p.A., 2014).

Gastrointestinal sıvı bileşimi, hacim, pH, motilite ve geçiş süresi ile safra bileşimindeki değişikliklere bağlı olarak da maruziyette farklılık görülebilmektedir (Roche S.p.A., 2014).

Kararlı halde plazmadaki ortalama ilaç maruziyeti, sabahki dozdan önce ve sabahki dozdan 2-4 saat sonra plazma derişimleri arasındaki 1,13'lük ortalama oran ile gösterilmesi gibi, 24 saatlik aralık süresince stabildir. Oral doz uygulamasından sonra metastatik melanoma hastalarından oluşan popölasyon için emilim hızı sabiti 0,19 saat-1 saat (%101'lik hastalar arası değışkenlik ile) olarak tahmin edilmektedir (Roche S.p.A., 2014).

Dağılım: Metastatik melanoma hastalarında vemurafenibin görülen dağılım hacmi 91 L şeklinde hesaplanmıştır (hastalararası %64,8 oranında değışkenlik). In vitro, insan plazma proteinlerine çok yüksek oranda bağlıdır (>%99).

Biyotransformasyon: Vemurafenibin ve metabolitlerinin göreceli oranları, oral yolla tek doz ^{14}C - işaretli Vemurafenib uygulanmasıyla insanlara ilişkin bir kütle denge çalışmasında belirlenmiştir. CYP3A4, vemurafenibin in vitro metabolizmasından sorumlu 1° enzimdir. İnsanlarda konjugasyon metabolitleri de (glukuronidasyon ve glikozilasyon) belirlenmiştir. Bununla beraber, plazmadaki baskın bileşen (%95) ana bileşen olmuştur. Metabolizmanın, plazmada önemli miktarda metabolite yol açmadığı düşünülmektedir ancak atılım açısından metabolizmanın önemi göz ardı edilemez (Roche S.p.A., 2014).

Eliminasyon: Metastatik melanoma hastalarında, toplulukta görülen vemurafenib klirensi 29,3 L/gün olarak bulunmuştur (hastalararası %31,9 değışkenlik).

Vemurafenib için topluluk PK analizi yoluyla bulunan popülasyon eliminasyon yarılanma ömrü 51,6 saattir (bireysel yarılanma ömrü tahminlerinin 5. ve 95. persentil aralığı 29,8 ile 119,5 saat aralığındadır). İnsanlar üzerinde uygulanan Vemurafenib'in ağız yoluyla uygulandığı kütle denge araştırmalarında, miktarın ortalama %95 kadarı 18 gün içinde geri kazanılmıştır. Vemurafenib ile ilgili maddenin büyük kısmı (%94) gaitada ve %1'den azı idrarda bulunmuştur. Farklılığa uğramamış bileşiğin biliyer atılımı önemli bir atılım yolu olabilir. Bununla beraber, mutlak biyo yararlanımın bilinmemesiyle, ana bileşen vemurafenibin klirensi bakımından hepatik ve renal atılımın önemi belirsizdir. Vemurafenib, P-gp'nin in vitro substratı ve inhibitörüdür (Roche S.p.A., 2014).

1.3.2. Farmasötik Özellikleri

Farmasötik, ilaçların kendine has şekillerde hazırlanmasını (tablet, merhem, ampul, kapsül v.b.) ve kimyasal yapısını inceleyen bir bilim dalıdır (Bingöl, N., 2015).

1.3.2.1. Yardımcı Maddelerin Listesi

Geliştirilen Vemurafenib analiz yöntemini bir ilaç analizinde kullanmak gerektiğinde içindeki diğer yardımcı maddelerin ne olduğunun bilinmesi, analizde oluşabilecek bir girişim etkisi olasılığının bilinmesi ya da analizde oluşabilecek sorunların öngörülmesi açısından oldukça önemlidir. Bu açıdan Vemurafenib içeren bir ilaç olan Zelboraf'ın içindeki yardımcı maddeler aşağıda sıralanmıştır.

- ✓ Kroskarmelozsodyum
- ✓ Kolloidalanhidrözsilika
- ✓ Magnezyumstearat
- ✓ Hidroksipropilselüloz
- ✓ Polivinilalkol
- ✓ Titanyumdioksit (E171)
- ✓ Makrogol3350
- ✓ Talk
- ✓ Demiroksit kırmızı (E172) (Roche S.p.A., 2014)

1.3.2.2. Raf Ömrü

İlacın raf ömrünü, ne zaman bozulacağını, etkisinin ne zaman azalacağını bilmek analiz yapılırken ihtiyaç duyacağımız diğer bilgilerdendir.

Zelboraf için raf ömrü 24 aydır (Roche S.p.A., 2014).

1.3.2.3. Saklamaya Yönelik Özel Tedbirler

İlacın saklanma koşullarını, hangi sıcaklıkta muhafaza edileceğini bilmek analiz yapılırken ihtiyaç duyacağımız diğer bilgilerdendir.

ZELBORAF çocukların göremeyeceği, erişemeyeceği yerlerde ve ambalajında, 30°C sıcaklığın aşağısındaki oda sıcaklığında saklanmalıdır. Nem olmaması için orijinal ambalajlarında bekletilmelidir. Son kullanma tarihiyle uyumlu olarak kullanılmalıdır. Ambalajdaki son kullanma tarihinden sonra ZELBORAF kullanılmamalıdır (Roche S.p.A., 2014).

1.3.2.4. Beşeri Tıbbi Üründen Arta Kalan Maddelerin İmhası ve Diğer Özel Önlemler

Kullanılmamış, atık ilaçlar ‘Tıbbi Atıkların Kontrolü Yönetmeliği’ ve ‘Ambalaj Atıklarının Kontrolü Yönetmelik’lerine uygun olarak yok edilmelidir (Roche S.p.A., 2014).

Bu gibi önlemlerin bilinmesi, analiz sonrasında atıkların ne şekilde bertaraf edilmesi gerektiğinin bilinmesi bakımından oldukça önemlidir.

1.4. İlaçların Analizinde Kullanılan Yöntemler

Farklı biyolojik örneklerdeki ilaçların analizinde kullanılan genel metotlar, yüksek verimli ayırma tekniği ile hassas ölçüm tekniklerinin kombine edilmiş halidir. Günümüzde ilaçların analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi(HPLC), gaz kromatografisi(GC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi birçok ayırma yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemler arasında, HPLC, kolaylık, basit çalışma, güçlü ayırma

kabiliyeti ve geniş numune uygulaması gibi bazı avantajlarından ötürü yaygın kullanılan tekniklerden kabul edilir. Çeşitli numunelerde ilaç derişimini doğru bir şekilde belirlemek için UV spektrofotometrisi, florimetri, kemilüminesans yöntemi ve kütle spektrometrisi gibi çeşitli ölçüm teknikleri uygulanmaktadır. Bunların içinde HPLC ve CE ile kombine kullanılanlardan en yaygını UV'dir. Diğerlerine göre daha düşük maliyet, uygun hassasiyete sahip, online tayin için oldukça kolaydır (Xiong, C. ve ark., 2009).

Literatürde, insan plazmasında Vemurafenib'in HPLC (Zheng, Y., ve ark., 2013; Gogineni ve ark.), LCMS / MS (Alvarez, J.C., ve ark., 2014; Bihan, K., ve ark., 2015; Nijenhuis, C.M. ve ark., 2014; Sparidans, R.W., ve ark., 2012; Vikingsson, S. ve ark., 2016), farmakokinetik, farmakodinamik ile belirlenmesini içeren çeşitli yöntemler vardır (Chhabda, P.J. ve ark., 2013).

Klinik çalışmaları ve tedavi edici İlaçları gözlemlemeyi desteklemek adına vemurafenib'in tayini için bir analiz gereklidir (Nijenhuis, C.M. ve ark., 2014). Sparidans, R.W., ve ark., insan ve fare plazması için doğrulanmış bir LC-MS / MS analizi bildirmiştir (Sparidans, R.W. ve ark., 2012). Zheng, Y., ve ark., insan plazması için doğrulanmış bir LC-UV analizi üzerine çalışmıştır. Her iki analizde de örnek hazırlama maddesi olarak protein çökeltisi kullanılır ve iç standart olarak başka bir tirozin kinaz inhibitörü (TKI) kullanılmıştır (Nijenhuis, C.M. ve ark., 2014).

Plazmada vemurafenib belirlemek için üç yöntem bildirilmiştir. Erlotinib ve vemurafenib'in aynı anda miktar tayini için yüksek performanslı bir sıvı kromatografi (LC) -UV yöntemi tarif edilmiştir. İkinci bir yöntem, kütle spektrometreli LC'dir (LC / MS / MS) (UV metodundan daha hassas ve daha duyarlı olduğu bildirilmiştir). J.-C. Alvarez, J.C., ve ark., vemurafenib-¹³C₆'yı iç standart olarak kullanan basit bir çöktürmeden sonra insan örneğinin 10µL'sinde valide edilmiş bir LC / MS / MS mikro-yöntemi geliştirmiştir (Alvarez J.C. ve ark., 2014).

Vemurafenib ile yapılacak klinik araştırmaları desteklemek için biyoanalitik bir analiz kaçınılmaz olacaktır. Flaherty ve ark. tarafından vemurafenib'in farmakokinetik profilini ortaya çıkarmak için bir LC-MS analizi kullanmıştır (K.T. Flaherty, ve ark., 2010).

1.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HPLC, sıvı hareketli bir fazda, karışımdaki bileşenlerin ayrılmasında kullanır. Bu karışımdaki bileşenler çözünürleştirilirler, ardından da yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçmeye zorlanırlar. Analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılan yöntem HPLC'dir. HPLC yöntemi kantitatif tayinlerde sonuç vermek için uygundur. Kantitatif tayinlerde, uçucu olmayan ya da ısı ile kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasıyla tespit edilir. Birçok sanayide, laboratuvarlarda ve bilimsel çalışmalarda HPLC yöntemiyle geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır. HPLC yöntemi ile birçok bileşik nitel ve nicel olarak tespit edilebilir. Bunlar toksinler, pestisitler, ilaçlar, aminoasitler, proteinler ve şeker bileşenleridir (Karakaplan, M., 2019).

Son zamanlarda yenilenen teknoloji ile birlikte ekstraksiyonda, çok küçük parçacıklar (tanecik çapı; 3-10 μ m) ve yaklaşık 5 mm çapındaki kolonlar kullanılmaya başlanmıştır. Olan gelişmeler kromatografinin ayırıcılığının çoğalmasına yol açmıştır. Bundan dolayı kromatografik ayırım performansı artmaktadır ve ayırım oldukça kısa bir sürede olabilmektedir. Bundan dolayı, kullanılan malzemenin miktarı azalmakta ve birim zamanda yapılabilen analiz sayısı artmaktadır. Bu koşullardaki ayırım işlemi 100 ile 400 atm arasındaki kolon basıncında olmaktadır. Yapılan işlemler sonucu uygulanan kromatografik tekniğe yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) adı verilmektedir (Özgür, D., 2011).

HPLC'nin öteki kromatografik yöntemlere kıyasla

1. Yüksek kolon ayırıcılığı,
2. Kullanıcıya daha az bağımlı işlem kolaylığı (bu nedenden dolayı yüksek tekrarlanabilirlik),
3. Nicel analize uygunluğu,
4. Daha az analiz süresi,
5. Geniş derişim aralıklarındada çalışma olanağı,

6. Düşük sıcaklıklarda uygulanabilirlik,

7. Kolay geri kazanım,

8. Dedektör seçme olanağının olması gibi bazı avantajları vardır;

HPLC ile nükleik asitler, aminoasitler, ilaçlar, proteinler, karbonhidratlar, hidrokarbonlar vb maddeler analiz edilebilmektedir (Kutucu, T. 2008).

Bir HPLC'nin kısımları şu şekildedir (Şekil1.2.);

1. Hareketli (Mobil) fazın haznesi,

2. Bağlantı ekipmanları ve hareketli (mobil) fazın uygulama sistemi,

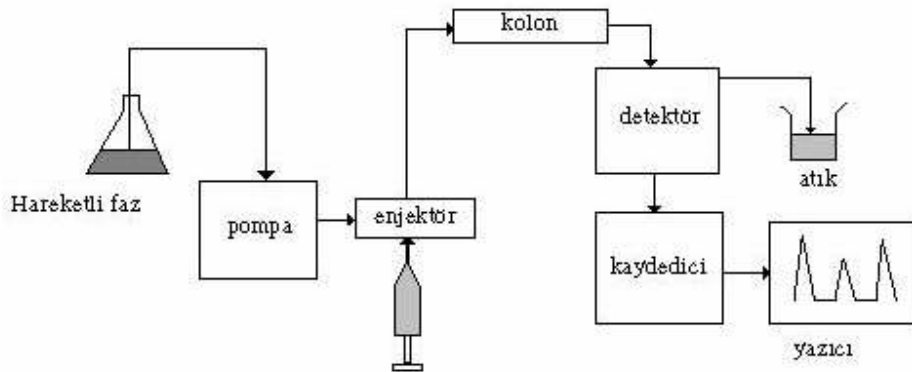
3. Hareketli faz için pompa,

4. Enjektör,

5. Kolon,

6. Dedektör,

7. Kayıt cihazı (Özgür, D., 2011).



Şekil 1.2. Yüksek performans sıvı kromatografisi bölümleri (Özgür, D., 2011)

1.5.1. Hareketli Faz Haznesi

Hareketli faz ile hareketli fazın haznesinin içindeki materyalinin birbiriyle etkileşmemesi gerekmektedir. Sistemde herhangi bir korozyon ya da oksitlenmeye neden olmaması gerekmektedir. Pompaya gelen mobil fazda, bir toz ya da kabarcık görülmemelidir. Bu nedenle steril edilebilen, cam veya çelik materyalli kaplar kullanılır. Mobil fazdan, çözünmüş olan gazların ayrılması gerekir. Bu sebepten sistemden Helyum gibi inert bir gazın, düşük akış hızında geçirilmesi, hareketli fazı ultrasonik banyoda bekletmek veya vakum altında uzaklaştırmak vb işlemler kullanılır (Skoog, 1998; Hamilton, 1982).

Sabit bileşime sahip tek çözücü kullanımıyla yapılan ayırma, izokratik ayırma (elüsyon) olarak isimlendirilir. Polariteleri birbirlerinden farklı 2 (veya daha çok) çözücü türlerinin kullanıldığı elüsyon tekniğine gradient elüsyon denilir. Şanlı, S.'nin yönteminde 2 çözücünün kullanım oranı, programlanmış şekilde bazen sürekli bazen de kademeli şekilde değiştirilir. Ayırmanın başlamasının ardından belirli bir programa göre, bazen sürekli, bazen de bir seri kademeler şeklinde çözücülerin oranı farklandırılır. Yeni HPLC sistemlerinde, çözücülerin miktarsal oranı zamanla doğrusal ya da üstel olarak değiştirilebilecek şekilde, iki ya da daha çok hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli farklı oranlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır. İzokratik elüsyon ile elue edilemeyen maddeler, gradient

elüsyon ile ayrılabilir, farklı kapasite faktörlerine sahip karışımların alıkonma zamanları kısaltılabilir (Şanlı, S., 2009)

1.5.2. Bağlantı Ekipmanları ve Hareketli Faz Uygulama Sistemi

Mobil faz, sisteme verilmeden, 2µm veya 5µm çaplarındaki tanecikleri süzeabilen kâğıt filtre veya çelik filtrelerden süzülerek, tanecikler ortamdan uzaklaştırılır. Sistemdeki bağlantı parçaları, dış çapı 1/8, 1/16 inç ya da daha geniş olan paslanmaz çelik ya da teflon borular ile olmaktadır. Mobil faz akışı, bağlantı parçaları (fitting), ferüller ve sıkıştırmak için vida (nut) ile sabitleştirilmiş paslanmaz çelik borularla yapılmaktadır (Kutucu, T. 2008).

HPLC'deki izokratik ve gradient olmak üzere bulunan iki yöntem için izokratik yöntemde, hareketli faz karışımı, tek kanaldan geçecek şekilde karıştırılarak hazırlanır. Gradient yöntemde ise, farklı hareketli faz çözeltiler vardır ve bunlar farklı oranlarda ve zamanlarda karıştırılır (Işık, G., 2015).

1.5.3. Hareketli Faz Pompası

HPLC'de kullanılacak bir pompanın bazı özellikler göstermesi gereklidir. Bu özellikler aşağıda verilmiştir.

1. Üst basınç sınırı 400atm olmalı,
2. Çalışma basınç aralığı $\approx 100 - 200$ atm olmalı,
3. 'pulsuz' veya 'puls' düşürücü ile birlikte kullanılmalı,
4. Yüksel sinyal/gürültü oranına sahip olmalı,
5. Analitik uygulamalar için 1 ile 10 ml/dk aralığında akış sağlamalı,
6. Kullanılan çözeltilere karşı etkisiz olmalı,
7. Sistem, düşük ölü hacminde olmalı,

8. Çözelti değişmek zor olmamalı,

9. Bakım ve tamir işleri kolay olmalı,

10. Halka, conta, valf gibi hemen aşınan parçalar sağlam olmalı ve yedek parçaları hemen bulunabilen parçalar olmalıdır (Kutucu, T. 2008).

Ayrıyetten pompada akışı kontrol eden sistemler bulunur. Bu akış denetleyiciler, akışta oluşacak basıncı ölçen ve sabit basınç değeriyle kıyaslayan ve aradaki farkın belirlenen sınır değerleri aştığında pompanın akış hızını, ayarlanmış akışı sabit tutacak şekilde düzenleyen cihazlardır. Yüksek basınçta kolondan geçen akış hızı, sıvıların bastırılmaz katsayılarındaki farklılığından dolayı ayarlanan akış hızı gibi olmayabilir. Bu durumda hareketli fazın akışı sırasında kolonun geçirgenliği ve de viskozite farklılığından kaynaklanan değişimlerin düzenlenmesi sağlanır (Özgür, D., 2011).

HPLC parçalarından temel bir bileşen olan pompa, mobil fazı karışımlarının kolon ve dedektör içerisinden belirli, sabit veya değişken bir hızla, belirli bir basınç altında geçmesini sağlamaktadır. HPLC için kullanılan pompalar genel olarak üçe ayrılmaktadır. Bunlar; pistonlu pompalar, şırınga veya sürgülü pompalar ve pnömatik veya sabit basınç pompalarıdır (Köktürk, M., 2013)

1.5.4. Enjektörler

HPLC enjektörleri, numunenin kolondan önce mobil faza enjekte edilmesi için kullanılmaktadırlar. Enjektörlerin manuel enjektör ve otoenjektörler olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır. Oto enjektörlerin manuel enjektörlere göre tekrarlanabilirliği daha yüksektir. HPLC’de ölçmenin kesinliğini belirleyici faktör, numunenin kolona enjeksiyonunda yapılan hatadır. Başka bir deyişle enjeksiyonun tekrarlanabilirliğidir. Numunenin enjektesi yüksek basınç altında yapılmaktadır. Enjeksiyonu yapılan numune, yüksek basınç altında mobil faza karışmakta ve kolona mobil fazda çözülmüş halde ulaşmaktadır. Ulaşma çok küçük bir hacim içerisinde gerçekleşmektedir. Böylece numune seyrelmeden kolona ulaşmaktadır. Bu çok önemli bir husustur. Numune seyreltiğinde, dedektörden yayvan pikler elde edilmektedir. Bu da hiç istenmeyen bir durumdur (Köktürk, M., 2013).

Analizi yapılacak örnek, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği yüksek olacak şekilde sisteme verilmelidir. Sisteme verilen örnek için kullanılan enjektörler; şırınga enjektörler, vana-sarım (valve-loop) enjektörler ve şırınga-sarım (syringe-loop) enjektörlerdir. Örneğin enjekte edilmesi esnasında sistem basıncı düşmeden, hareketli fazın akışı durmadan veya akış hızını değişmeden örnek sisteme iletilmelidir. Şırınga tipi enjektörler 1500 lb/in^2 basıncına kadar sisteme örnek gönderebilirler. Bu enjektörlerde mobil fazın akışı bir süreliğine durdurulur. Bu nedenden dolayı kolay kullanılabilir olmasına rağmen tekrarlanabilirliği düşük olduğundan şırınga enjektörler tercih edilmemektedir (Özgür, D., 2011).

Vana - sarım enjektörleri ile, 7000 lb/in^2 basınç değerine kadar sisteme örnek enjekte edilebilir. Örnek, enjekte edilirken mobil fazda bir durma ya da akışında hızda bir değişme olmaz. Hacim yüksekken örnek enjekte edildiğinde analizi yapılan maddenin düşük derişimlerine kadar inilebilmektedir, fakat bu, kolona aşırı madde yüklemesinden dolayı bant genişlemesine ve pikin keskinliğinin azalmasına sebep olur. Düşük hacimdeki enjeksiyonlar daha yüksek avantaja sahiptir. Bu tür enjektörlerle uygulamada tekrarlanabilirlik ve çalışma basıncının üst sınırı yüksektir. Ototampler kullanımının imkanı olmasından dolayı birim zamandaki, standart enjeksiyon sayısı daha çoktur (Kutucu, T. 2008).

Şırıngalı enjektörlerde, 0,5 ile $5 \mu\text{l}$ aralığındada enjeksiyonlar yapılabilen mikro enjektörler mevcuttur. Sıfır ölü hacim ile enjeksiyon yapabilir. Düşük hacimlerde bile kesinlik ve doğruluk değerleri yüksektir (Özgür, D., 2011).

1.5.5. Kolon

HPLC donanımının dört temel yapı taşından birisi olan kolon, karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirlerinden iyi çözünürlükle ayrımından sorumlu sabit fazdır. Kolon, sistemin önemli kısmı olup dolgu materyali ve taşıyıcı kısım olmak üzere iki bölümden meydana gelmektedir. Dolgu materyalinin partikül yüzeyi ile partikül büyüklüğü, taşıyıcı kısmın ise uzunluğu, çapı ve üretildiği materyalin ayırma üzerinde etkileri olmaktadır. Kolonlar paslanmaz çelikten, teflon veya camdan yapılmaktadırlar (Köktürk, M., 2013).

Sıvı kromatografide kolonlar, mobil faz bileşenleriyle etkileşmeyen, okside olmayan, korozyona uğramayan malzemelerden üretilmiştir. Kolonlar için paslanmayan çelik, teflon, cam gibi malzemeler kullanılır. Sıklıkla kullanılan kolonlar 2,1, 3,2, 4,1 ve 4,6mm çapında, boyu ise 10 ile 30 cm aralığında olanlardır. Aynı uzunluktaki kolonlar için kolonun çapı arttıkça kolona iletilen madde miktarı da artar. Analiz esnasında birden çok kolon birbiri ile kombin şekilde kullanarak analizin kalitesi artırılabilir. Sıkça kullanılan kolonlar 25 cm boy uzunluğunda ve 4,6 mm iç çapında, 5 µm çapında tanecik dolgu maddesiyle doldurulmuş kolonlardır. Son yıllarda firmalar yukarıda anlatılan kolon boyutlarından farklı olarak iç çapı 1-4,6mm olan uzunluğu 5 - 10cm olan kolonlar üretmektedir. Dolgu maddesindeki tanecik çapı da 1,7 µm'ye kadar düşürülmüştür (Özgür, D., 2011).

1.5.6. Sıvı Kromatografi Dedektörleri

Dedektör, kolondan elüe edilen molekülleri tespit etmek için kullanılan bir cihazdır. Absorbansların belirli bir dalga boyunda sürekli olarak kaydedilmesini sağlar. Analit, mobil fazdan daha fazla absorpladığında, pozitif sinyal elde edilir. HPLC sistemlerinde ultraviyole (UV) dedektörleri, floresans dedektörleri (FD), kırılma indeksi dedektörleri (RID), kütle dedektörleri (MSD) ve elektrokimyasal dedektörler (ECD) gibi çeşitli dedektörler bulunmaktadır (Kumar, V., 2015)

i.Örneğin ve hareketli fazın özelliklerine göre dedektörler 5 şekilde incelenebilir;

a. Fotometrik dedektörler (UV/Görünür Bölge, Floresans dedektörü, Fotodiyot dizi (FDD) ve İnfrared absorbans dedektörleri),

b. Radyoaktivite dedektörü,

c. Elektrokimyasal dedektör,

d. Ayırım sonrası tepkime dedektörü,

e. Kütle spektrometrisi dedektörü.

ii. Örnek özelliklerinin ölçülmesine göre dedektörleri 4 şekilde incelenebilir;

- a. Dielektirik sabiti dedektörü,
- b. İletkenlik dedektörü,
- c. Yoğunluk ölçüm dedektörü,
- d. Refraktif indeks dedektörleridir.

HPLC sisteminde en sık kullanılan dedektör UV/GB dedektör, FDD, flüoresans dedektör ve elektrokimyasal detektördür (Kutucu, T. 2008).

Farmasötik analizde uygulanan en yaygın dedektör UV detektördür (Işık, B., D., 2017).

1.5.7. Kayıt Cihazı

Dedektörlerden gelen sinyallerin kayıt edilmesinde, yazıcılar veya bilgisayar destekli veri kaydediciler kullanılır. Son zamanlarda ilerleyen teknolojiyle mikroişlemci ve bilgisayar kullanılmaktadır. Bu tür sistemlerde mobil fazın akış hızı, enjektör, kolon fırını, dedektör, örnek alma sistemi ve veri kaydı sisteminin kontrolü merkezi bir veri kayıt cihazı ile sağlanmaktadır. Mikroişlemci ve bilgisayarların kullanımı, kromatografi sisteminin tekrarlanabilirliğini arttırmaktadır ve sistem validasyonunda daha doğru sonuçlar elde etmeyi sağlamaktadır (Özgür, D., 2011).

1.6. Ekstraksiyon yöntemleri

Gelişen teknolojiyle matriks örneklerin nitel ve nicel analizinde hassas, doğru ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Fakat biyolojik, çevresel, gıda ve eczacılık ürünlerinin analizinde yüksek hassasiyet içeren analitik cihazlar geliştirilmiştir fakat analitik cihazlar, çoğu kez matriks ortamında tayinlerde başarısız olmaktadır. Bundan dolayı matriks ortamdan analitleri alma

(ayırma), deriştirme (zenginleştirme) için genellikle ön işlem uygulanması gerekmektedir (Alver, E. ve ark, 2012).

Ekstraksiyon işlemleri çoğunlukla sıvı-sıvı, katı-sıvı ve katı faz ekstraksiyon şeklinde uygulanmaktadır. Bu yöntemler, uzun zaman süren, kompleks ekstraksiyon adımları içeren, fazla miktarda örnek ve çözücü kullanmak istenen yöntemlerdir. Bu gibi dezavantajlarından ötürü organik çözücü tüketimini en aza indiren, otomasyona imkân veren, ekstraksiyon basamaklarını basitleştiren ve daha iyi zenginleştirme sağlayan mikroekstraksiyon yöntemlerine ilgi son zamanlarda iyice artmıştır (Alver, E. ve ark, 2012).

İlaçların analizinde doğru ve hassas sonuçlar elde etmek için önderiştirme yöntemleri kullanmak gerekir (ilaçların kromatografik ayırıştırmasından önce). Bunların başında LLE (sıvı-sıvı ekstraksiyonu) ve SPE (katı faz ekstraksiyonu) gibi bazı ayırma / ön deriştirme prosedürleri gelir. Bununla birlikte, LLE meşakkatli, zaman alıcıdır ve normalde insan sağlığına zararlı olabilecek büyük miktarda organik çözücüler gerektirir. SPE, belirli adsorpsiyon maddeleri ile yüklü spesifik bir cihazın yanı sıra nispeten pahalı olabilen yüksek basınçlı bir aktarım sistemi gerektirir. Bu da oldukça pahalıdır (Xiong, C. ve ark., 2009).

1.7. Mikroekstraksiyon Yöntemleri

Mikroekstraksiyon yöntemleri, son yıllarda sıvı-sıvı, katı-sıvı ve katı faz ekstraksiyon gibi klasik yöntemlerin yerini almaya başlamışlardır. Bu avantajları başlıca şu şekildedir;

- ✓ Klasik katı sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan zararlı ve pahalı ekstraksiyon sıvılarının kullanımını mikrolitre düzeylerine indirmişlerdir.
- ✓ Buharlaştırma, saflaştırma gibi işlemlere gerek duyulmamaktadır.
- ✓ Yüksek zenginleştirme oranına sahiptir.
- ✓ Ekstraksiyon ve zenginleştirme işlemlerinin yanısıra ayırma işlemi de yapılabilir.

- ✓ Ekstraksiyonun ardından alınan örneğin, doğrudan gaz kromatografi (GC) veya yüksek basınç sıvı kromatografi (HPLC)'ye enjekte edilebilmesine olanak sağlar.
- ✓ Otomasyonun yapılabilmesine imkan tanır.

Katı Faz Mikroekstraksiyon (Solid-Phase Microextraction, SPME), Manyetik Karıştırma Çubuğu ile Ekstraksiyon (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE), Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (Liquid-Phase Microextraction, LPME) mikroekstraksiyon yöntemlerindendir (Alver, E. ve ark, 2012).

Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (LPME) yöntemi de kendi içinde ayrılmaktadır. Bunlar, Asılı Damla Mikroekstraksiyon (Single Drop Microextraction, SDME), Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME), Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon (Solidified Floating Organic Drop Microextraction, SFODME), Oyuk Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (Hollow Fibre Liquid-Phase Microextraction, HF-LPME) şeklinde ayrılmaktadır (Alver, E. ve ark, 2012).

Biyolojik sıvılardaki bazı ilaçların analizi için içi boş-fiber bazlı sıvı faz ekstraksiyonu ve fiber-in-tube katı faz mikro-ekstraksiyon gibi mikro ekstraksiyon yöntemlerinin bazılarının başarıyla kullanıldığına dikkat edilmelidir. Son zamanlarda, dağıtıcı sıvı-sıvı mikro-ekstraksiyon (DLLME) olarak adlandırılan yeni bir sıvı faz mikro ekstraksiyon tekniği, ekstraksiyon solventi, dağıtıcı solventi ve ilgi konusu analit içeren sulu örnekleri içeren bir üçlü komponentli solvent özütleme sistemine dayanır. DLLME, yüksek zenginleştirme faktörüne, düşük maliyete, hızlı ve kolay uygulama prosedürüne sahip olması gibi üstün avantajlarından dolayı giderek daha fazla insanın ilgisini çekmektedir. Bu yöntem günümüzde, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), organofosforlu pestisitler (OPP), klorofenoller (CP), organosülfürlü pestisitler (OSP), ftalat esterler, polibromlanmış difenil eterler vb organik bileşenler içeren çevresel su numunelerindeki organik bileşiklerin analizi için yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Xiong, C. ve ark., 2009).

Bu yöntemler arasında, DLLME, çevresel su numunelerinin hazırlanmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır ve kompleks biyolojik sıvılardaki ilaçların analizi için nadiren uygulanmaktadır (Xiong, C. ve ark., 2009)

1.7.1. Katı Faz Mikroekstraksiyonu (SPME)

Katı faz mikroekstraksiyonu tek aşamada örnekten maddeyi zenginleştirme, matristen ayırma ve tayin etme işlemidir. SPME toprak, su hava gibi çeşitli matrislerdeki çevresel kirleticilerin analizlerine başarıyla uygulanmaktadır. Klasik örnek hazırlama yöntemleriyle kıyaslandığında SPME nin oldukça önemli avantajları mevcuttur. SPME, maddelerin ekstraksiyonu için hızlı, basit ve çözücü kullanmayan hassas yöntemlerdendir. Analitler matris ortamdan ekstrakte edilirken zenginleştirilirler de. Analitleri ayırma ve tayin etmede, HPLC ile kullanıma uygun bir yöntemdir (Açıkgöz, Ş., 2014).

1.7.2. Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu (LPME)

Sıvı faz mikro ekstraksiyonun diğer klasik sıvı-sıvı ekstraksiyonundan en önemli ayrıcalığı ekstraksiyon sıvısının mikrolitre düzeylerine indirilmesidir. Bu nedenden dolayı zenginleştirme yapılırken hem çözücü kaybı önlenir hem de buharlaştırma işlemine gerek duyulmaz. Sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemi ile ekstraksiyon işleminde maddeler genellikle sulu bir örnek içerisinde. Kısaca bu yöntem ucuz ve çok az çözücü kullanan bir yöntemdir. Bu yüzden daha az organik çözücülere maruz kalınır. Sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemi aşağıdaki şekillerde uygulanır (Açıkgöz, Ş., 2014);

- 1) Asılı Damla Mikroekstraksiyonu (SDME)
- 2) Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyonu (SFODME)
- 3) Oyuk (Hollow) Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu (HF-LPME)
- 4) Dağıtıcı Sıvı -Sıvı Mikroekstraksiyon (DLLME)

1.7.2.1. Asılı Damla Mikroekstraksiyonu (SDME)

Tek damla mikroekstraksiyon yöntemi olarak da bilinen yöntem, gaz veya sıvı örnek içerisinde karışmayan ekstraksiyon çözücü damlası (1 ile 10 µl boyut aralığında), enjektör ucunda asılı olarak tutulur. Belirli bir zaman yapılan ekstraksiyon işlemi sonrasında maddeler sulu örnekten pasif difüzyon ile asılı olan damla içerisine alınır ve GC, HPLC ile analiz edilir. Bu yöntemin avantajları, herhangi bir karmaşık donanıma ihtiyaç duyulmaması, ucuz ve uygulanmasının kolay olması ve çok az miktarda çözücü kullanılmasıdır. Yöntemin dezavantajları arasında damla yüzeyinin sınırlı olması, damlanın enjektör ucunda kararsız olması ve ekstraksiyon kinetiğinin yavaş olması sayılabilir. SDME yöntemi değişik biçimlerde uygulanabilir.

- Doğrudan daldırma –asılı damla mikroekstraksiyonu

Direct-immersion single-drop microextraction (DI-SDME)

- Tepede –asılı damla mikroekstraksiyonu

Headspace single-drop microextraction (HS-SDME)

- Üçlü faz-asılı damla mikroekstraksiyonu

Three phase single-drop microextraction (TP-SDME)

- Sürekli-akış mikroekstraksiyon

Continuous-flow microextraction (CFME) (Johrami, E. Z., ve ark., 2007)

1.7.2.2. Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyonu (SFODME)

2007 yılında Khalili-Zanjani ve ark tarafından geliştirilen sıvı faz mikroekstraksiyon tekniği olan katılaştırılmış yüzen organik damla mikroekstraksiyonu, düşük yoğunluğa sahip organik çözücülerin kullanılması nedeniyle organik mikro damlayı taşıyan mikro şırıngaya, oluklu fiber veya

polikloropiren kauçuk tüp gibi özel aparatlara gerek kalmadan uygulama gerçekleşir (Elyas, N., 2011).

Bu mikroekstraksiyon yönteminde, manyetik bir karıştırıcı, sulu örnek içeren kabın altına yerleştirilir ve az girdaplı bir karıştırma yapılır. Kütle transferi olurken damla da sulu fazın yüzeyinde kendi etrafında döner (Açıkgöz, Ş., 2014).

Bu yöntem diğer LPME yöntemleri ile kıyaslandığında, işlemsel parametrelerin belirlenmesinde, özellikle organik çözücü miktarında ve karıştırma hızı parametrelerinde esneklik imkanı sunar. Yöntem organik çözücünün büyük hacimlerinin de kullanımına olanak verdiği için gaz kromatografinin yanı sıra HPLC sistemleri ile de kullanıma uygundur (Açıkgöz, Ş., 2014).

1.7.2.3. Oyuk Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu (HF-LPME)

Bu yöntemde sulu çözelti içindeki hedef maddeler gözenekli polipropilen oyukfiberin duvarlarına emdirilmiş organik çözücü vasıtasıyla fiberin içerisindeki alıcı faza ekstrakte edilir. Yöntem basit, ucuz, hızlı, ve yüksek seçiciliğe ve yüksek zenginleştirme faktörüne sahip bir yöntemdir. Ancak bu yöntemde alıcı faz ile verici faz arasındaki ekstraksiyon etkinliğinin azalması ve ekstraksiyon süresinin uzaması ile tekrarlanabilirliğin azalması gibi dezavantajlar da bulunmaktadır (Açıkgöz, Ş., 2014).

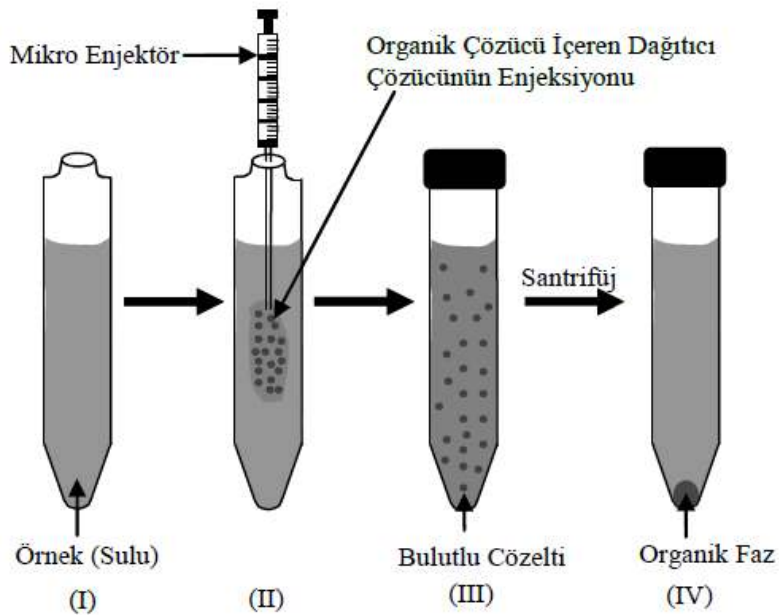
1.7.2.4. Dağıtıcı sıvı mikroekstraksiyonu (DLLME)

Son zamanlarda, dağıtıcı sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu (DLLME), bileşenlerin ön deriştirilmesi ve tayini için geliştirilmiştir. DLLME, diğer mikro ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla, yüksek bir ekstraksiyon verimliliğine, geliştirilmiş kararlılığa, gelişmiş hassasiyete sahiptir ve basitleştirilmiş bir numune ön-işlem prosedürü sergilemektedir. Yöntem, suyla karışmayan bir ekstraksiyon çözücüsünün ve hidrofilik bir dağıtıcı çözücüsünün uygun bir karışımının sulu bir örnek çözeltisine enjekte edilmesinden sonra oluşan üç bileşenli bir çözücü sistemine dayanır. Karışım hızla dengeye ulaşır ve bu da çalışma süresini önemli ölçüde kısaltır. DLLME, pestisitlerin, organik ve inorganik çevre kirleticilerinin ve çeşitli matrislerdeki farmasötiklerin tayin edilmesi için yaygın şekilde uygulanmıştır.

DLLME'nin olağanüstü avantajları; işlem kolaylığı, hızlı olması, ucuz olması, yüksek geri kazanıma sahip olması ve zenginleştirme faktörüdür (Razmi, R. Ve ark, 2016).

Rezaee ve ark. birkaç mililitre dağıtıcı çözücü ile birlikte mikro hacimde ekstraksiyon çözücüsünün kullanıldığı yeni bir mikroekstraksiyon yöntemi geliştirmişlerdir (Rezaee, M. ve ark, 2006). Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) yöntemi, homojen sıvı-sıvı ekstraksiyonu (HLE) ve bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE) yöntemlerine benzer bir üçlü çözücü sistemine dayanmaktadır (Alver, E. ve ark, 2012).

Yöntem, analizlenecek maddeleri içeren sulu örnek (Şekil 1.3.-I) içerisinde dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözücüsünün hızlıca enjeksiyonuna (Şekil 1.3.-II) dayanır. Toplam çözelti hacminin %1–3'ünü ekstraksiyon çözücüsü oluşturur. Örneğe bu yolla yapılan enjeksiyon, örnek içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün küçük damla yapılarının oluşmasına sebep olur (Şekil 1.3.-III). Bu adımda çözeltide bulutlanma olur. DLLME'de ekstraksiyon çözeltisinin %97 ile 99'unu oluşturan sulu çözelti içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün iyi damlalar oluşturmada dağıtıcı çözücü nün rolü büyüktür. Ekstraksiyon çözücüsü ile örnek çözeltisi arasında oluşan büyük yüzey alanı sayesinde dengeye çok hızlıca gelir. Dolayısıyla ekstraksiyon işlemi zamandan bağımsız olur. Suda çözünmeyen maddeler, sulu çözelti içinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilir. Karışım sanrifüj cihazına konduktan sonra küçük damlacık formları konik tüpün dibinde toplanır (Şekil 1.3.-IV). Dipte toplanan ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınıp uygun enstrümantal yöntemler kullanılarak tayin edilir (Alver, E. ve ark, 2012).



Şekil 1.3. Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (DLLME) Sistemi (E. Alver ve ark., 2012)

Ekstraksiyon çözücüsü, yoğunluğu sudan daha yüksek olmalı ve santrifüjleme işlemi ile sulu fazdan kolaylıkla ayrılabilmesi, iyi kromatografik davranış sergilemelidir. Genellikle kloroform, nitrobenzen, karbon tetra klorür, karbon disülfür, bromobenzen ve klorobenzen gibi organik çözücüler DLLME’de ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılırlar. Dispersif (dağıtıcı) çözücüler ise ekstrakte edilecek madde ve sulu fazın her ikisiyle de yüksek oranda karışabilen çözücüler olmalıdır. DLLME’de metanol, etanol, asetonitril, aseton ve tetrahidrofur gibi çözücüler kullanılır (Elyas, N., 2011).

DLLME, bir anlamda sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) yöntemindeki ekstraksiyon çözücüsünün mikrolitre düzeyinde kullanılarak minyatüre edilmiş halidir. DLLME yönteminin eser miktarlardaki analizler için avantajları: işlemin basitliği, seriliği, düşük maliyeti, yüksek geri kazanım, yüksek zenginleştirme faktörü ve çevreye dost olmasıdır (Vuran, F.A. 2013).

Yöntemin seçiciliği çok karmaşık örneklerde çok iyi değildir bu yüzden karmaşık örneklerin ekstraksiyonlarda tercih edilmezler. Üç farklı çözücünün gerekli olması,

ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan bileşiklerin yoğunluğunun sudan fazla olması gerektiğinden çözücü seçiminin sınırlı olması ve santrifüj gerektirmesi yöntemin dezavantajları olarak sayılabilir (Alver, E. ve ark, 2012).

1.8. Ekstraksiyon Verimini Etkileyen Parametreler

Ekstraksiyon işleminin en uygun şart ve istenilen en yüksek verimle gerçekleştirilebilmesi parametrelerin doğru şekilde seçilmesine bağlıdır. İstenilen kalitedeki ürünün alınabilmesi için en uygun ekstraksiyon çözücü tipinin seçimi yanında ekstraksiyon işlemleri öncesinde ve işlemler sırasında dikkat edilmesi gereken birçok parametre vardır (Açıkgöz, Ş., 2014). Bu parametrelerin en önemlileri kısaca; ekstraksiyon çözücüsü ve dağıtıcı çözücüsünün türü ve hacmi, pH, tuz eklemek, sıcaklık, santrifüj hızı ve süresi, ekstraksiyon süresi olarak sayılabilir.

1.8.1. Çözücü Türü ve Miktarının Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Çözücü seçimi, ekstraksiyon işlemlerindeki en önemli parametrelerdendir. Çözücü seçiminde öncelik ekstrakte edilecek olan madde veya maddeleri çözücünün tam olarak çözebilmesi en önemli aranan özellik olurken, istenmeyen maddeleri çözmemesi gerekir. Bu özelliklere sahip bir çözücü bulmak o kadar da kolay değildir. Çözücünün polaritesi ile çözünmesini istediğimiz madde veya madde grupları arasında çok sıkı bir ilişki vardır. Örneğin çözünmesini istediğimiz madde polar bir yapıdaysa, ekstraksiyon için kullanılacak olan çözücünün de polar olması gerekir. Zira benzer benzeri çözer. Kullanılacak olan çözücüde aranan diğer özellikler şunlardır:

- Toksik olmamalı,
- İşlem sonunda kolaylıkla ve tamamen ortamdan uzaklaştırılabilmeli,
- Ucuz olmalı,
- Yanıcı ve patlayıcı olmamalı,

- Uygun viskozitede olmalı,
- Diğer maddelerle istenmeyen reaksiyon ve etkileşme yapmamalı,
- Kaynama noktası çok yüksek olmamalı (Açıkgöz, Ş., 2014).

Ekstraksiyon çözücüsü, yoğunluğu sudan yüksek olmalı ve santrifüjleme işlemi ile sulu fazdan kolaylıkla ayrılabilmesi, iyi kromatografik davranış sergilemelidir. Genellikle kloroform, nitrobenzen, karbon tetra klorür, karbon disülfür, bromobenzen ve klorobenzen gibi organik çözücüler DLLME’de ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılırlar (Ojeda, C. B., ve ark, 2009).

DLLME’de, ekstraksiyon çözücü hacmi, zenginleştirme faktörü için önemli bir parametredir. Ekstraksiyon çözücü hacmi arttıkça, santrifüjleme işlemi ile elde edilen sediment faz hacmi artar, bu durum, hedeflenen analitin organik fazdaki derişimini azaltır. Bununla birlikte, her ne kadar ekstraksiyon geri kazanımı sabit olsa da zenginleştirme faktörü düşer. Bu sonuç, hedeflenen bileşiklerin tayinindeki duyarlılığı düşürür. Bundan dolayı, uygun ekstraksiyon hacminin hem yüksek zenginleştirme faktörü için hem de santrifüj sonrasını takip eden tayin için yeterli miktarda olması gerekir (Vuran, F.A. 2013).

Dağıtıcı (dispersif) çözücü, ekstraksiyon çözücüsünde çözünebilmeli ve sulu fazla (örnek) tam karışarak sulu faz içerisinde ekstraksiyon çözücüsünü küçük damlacıklar halinde dağıtıp bulutlu çözelti oluşturabilmelidir (sulu ortam/ekstraksiyon çözgeni/dağıtıcı çözgen). Bu durum, sulu faz ile ekstraksiyon çözücüsü arasındaki büyük yüzey alanının temelini oluşturur, böylece ekstraksiyon verimliliği artırılabilir. Dağıtıcı çözücü olarak yaygın kullanılan bazı polar maddeler; etanol, metanol, aseton, asetonitril ve tetrahidrofuran’dır (Vuran, F.A. 2013).

Dispersif çözücü hacminin değişmesi sediment faz hacmini değiştirir. Bu yüzden sabit sediment faz hacmi elde etmek için dispersif çözücü ve ekstraksiyon çözücüsünün hacimlerinin optimize edilmesi gerekir. İyi bir bulutlanma elde etmek dispersif çözücünün hacmi, sulu faz ve ekstraksiyon çözücü hacimleri optimizasyonu ile ilgilidir (Elyas, N., 2011).

1.8.2. pH'ın Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Bilhassa polar analitler için ekstraksiyon verimini etkileyebilen bir diğer parametre de örneğin pH'sidir. Analitin sulu fazda daha az çözünmesini sağlayabilmek için pH değerinin optimizasyonu gerekebilir (Agnieszka, Z., ve ark., 2011)

1.8.3. Tuz Eklemeinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Sıvı-sıvı ekstraksiyon prosedürlerinde, tuz ilavesi, analit(ler)in çözültiden, kütle transferini arttırmak veya ekstraksiyon çözücüsüne bölüştürmek için çözültiden çıkarılması amacıyla kullanıldığı bilinen bir uygulamadır (Mashayekhi, H. A., ve ark., 2010).

Yüksek geri kazanıma ulaşabilmek amacıyla iyonik güç artırıldığında sulu fazdaki hedef analitin ve organik ekstraksiyon çözücüsünün çözünürlükleri genellikle düşer. Aynı zamanda, elde edilen organik faz hacmi (sediment) artar ve bu durum hem hedef analit derişiminin hem de zenginleştirme faktörünün düşmesine sebep olur (Agnieszka, Z., ve ark., 2011).

Tuz etkisi, yalnızca uygun miktarda tuz eklendiğinde etkilidir. Etkinin oluşması için düşük bir miktar yeterli olmayabilir veya yüksek bir miktar çözelti yoğunluğunu değiştirebilmekte ve analit(ler)in ekstraksiyon çözücüsüne kütle transferini inhibe edebilmektedir (Balçık, U., 2019)

1.8.4. Sıcaklığın Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Ekstraksiyon işlemlerinde en önemli parametrelerden biri sıcaklıktır. Birçok maddenin sıcakta çözünürlüğünün arttığı bilinmektedir. Ancak, bu etki ekstraksiyonun daima yüksek sıcaklıkta yapılması gerektiği anlamına gelmez. Sıcaklık artışı maddelerin bozunma ve buharlaşma kayıpları da beraberinde gelmektedir. Bu yüzden, ekstrakte edilecek maddelerin buharlaşma kayıpları ve bozunma olmaksızın hangi sıcaklık derecelerine kadar çıkılabileceğinin bilinmesi gerekir. Özellikle ısıya karşı hassas olan maddelerin ekstraksiyon işlemlerinde uygulanacak olan işlem sıcaklığına çok dikkat edilmedilir. Ya da istenmeyen çokça

madde oluşabilir ve istenen kadar kaliteli ürün elde edilemeyebilir (Açıkgöz, Ş., 2014).

1.8.5. Santrifüj Hızı ve Süresinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

DLLME tekniğinde en önemli basamaklardan bir tanesi, ekstraksiyonun ardından mikro seviyedeki organik çözücüyü sulu fazdan ayırarak analiz için bir başka tüpe alma işlemidir. Sudan daha yoğun çözücüler kullanıldığında bu işlem nispeten daha kolaydır. Ekstraksiyonun ardından sulu çözelti santrifüj edildiğinde ekstraksiyon çözücüsü santrifüj tüpünün dibinde toplanmakta ve tüpün dip kısmı dar olduğundan bu kısımdaki ekstraksiyon çözücüsü rahatlıkla bir mikro enjektörle çekilerek bir başka tüpe aktarılabilmektedir (Köktürk, M., 2013).

Artan santrifüj hızı ve süresi, ekstraksiyon verimini artırabilir, azaltabilir ya da hiç etki etmeyebilir. Bunu anlayabilmek için farklı santrifüj hızlarında ve farklı santrifüj sürelerinde ekstraksiyon işlem prosedürleri uygulanıp geri kazanım değerleri incelenerek durum değerlendirilir.

Aksoy, B.'nin yaptığı bir tez çalışmasında, elde edilen bulgulardan yola çıkarak santrifüjleme zamanının ekstraksiyon verimliliği üzerine kayda değer bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Aksoy, B., 2017).

Elyas, N.'nin yaptığı bir başka tez çalışmasında da elde edilen verilerden yola çıkarak santrifüj zamanının ekstraksiyon verimliliğine önemli bir etki katmadığı görülmüştür (Elyas, N., 2011).

1.8.6. Ekstraksiyon Süresinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

DLLME'de, ekstraksiyon zamanı dispersif çözücü ve ekstraksiyon çözücüsü karışımının, örnek çözeltiye enjekte edilmesinden santrifüjleme öncesine kadar geçen süre olarak tanımlanır. Örnek çözeltiye ekstraksiyon çözücü-dispersif çözücü karışımı enjekte edildikten sonra hemen çalkalanarak, çözeltinin bulutlanmasına yardımcı olunmalıdır. Ekstraksiyon süresinin kısa olması, DLLME için avantajdır (Elyas, N., 2011).

Ekstraksiyon süresi arttıkça ekstraksiyon verimi de beraberinde artar. Ancak, işlemlerin uzun süreli olması işlem ekonomisi ve zaman açısından olumsuz etkileri de beraberinde getirir. Bu sebeple ekstraksiyon işlemi için seçilecek süre verim ve maliyet hesabı çok dikkatli yapılarak belirlenmelidir (Açıkgöz, Ş., 2014).

1.9. Analitik Yöntem Validasyonu (Yöntem Geçerlilik Testleri)

Validasyon, bir yöntemin ilgili performans parametrelerine uygunluğunun belirlenmesi için, yöntem parametrelerinin belirlenerek incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır (Yılmaz, A., 2012).

Green'in tanımına göre geçerlik, analitik yöntemin istenen amaca uygunluğunu test eden işlemdir. Başka bir deyişle geçerlilik; herhangi bir metotda işlem, araç ve gereç, materyal, sistem ve faaliyetin beklenen değerleri verdiğinin kanıtlanması işlemidir. Diğer bir deyişle yöntem geçerliliği; her aşamada aynı sonucu bulmak için yapılan işlemlerdir. Geçerliliği tanımlarken başvurulacak resmi kaynaklar arasındaki terminolojik farklılıklar bulunmaktadır. Geçerlilik çalışmalarının genel isimlendirilmesinde Uluslararası Standardizasyon Komitesi, ISO/IEC 17025 yöntem geçerliliği, Uluslararası Metroloji Sözlüğü (VIM) yöntem geçerliliği ve İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP) standart çalışma yöntemi (SOP) ifadelerini kullanır (Ertaş, Ö., S., 2005).

ISO/IEC 17025'in 5.4.5.2. bölümünde de belirtildiği gibi; standart olmayan yöntemler, laboratuvarlarda geliştirilen yöntemler, amacının dışında kullanılan standart yöntemler ya da değiştirilmiş standart yöntemler kullanıldığında validasyon gereklidir. FDA rehberinde yöntem validasyonu yapılırken incelenmesi önerilen performans parametreleri; seçicilik, LOD (Tespit Limiti), LOQ (Tayin Limiti), ölçüm aralığı ve linearite, doğruluk (geri kazanım) ve kesinlik (tekrarlanabilirlik-tekrar üretilebilirlik) parametrelerinden oluşmaktadır (Çabuk, T., Z., 2018).

Denetleyici kurumların ve endüstrinin ilgilenmeye başlamasıyla birlikte, yöntem geçerliliği yaygın olarak literatürlerdeki yerini almaya başlamıştır. EN 45000 Standart Serilerinin Yorumlama Rehberi geçerlilik üzerine 20 bölüm ve dokuz geçerlilik göstergesini içerir. Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), insanlarda kullanılan ilaçların kaydındaki teknik ihtiyaçları karşılamak için, analitik

hesaplamaların geçerliği üzerine ortak bir döküman geliştirmişlerdir. Bu döküman sekiz geçerlilik göstergesinin tanımını içerir. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Bürosu, (US EPA) yöntem gelişimi ve konservasyon kaynakları ve gerikazanım rolü (RCRA) için bir geçerlilik rehberi hazırlamıştır. Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (AOAC), US EPA ve diğer bilimsel organizasyonlar, çoklu-laboratuvar çalışmalarıyla geçerli edilmiş yöntemler sağlamıştır. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (US FDA), yöntem geçerliliği için örnek analitik veriler içeren rehberler çıkarmıştır. Amerikan Farmakopesi (USP), bileşik değerlendirmesi üzerine yöntem geçerliliğini içeren özgül rehberler yayınlamıştır (Ertaş, Ö., S., 2005).

Analitik işlemlerin geçerliliğinin amacı, gereken amaç için yeterli güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların alınması, bilimsel bütünlük ve uygunluğun sağlanmasıdır. Geçerlilik çalışmaları bazı belirlenmiş sistemlere göre olmaktadır. Elde edilen veriler ve alınan kararlar kayda geçilmelidir. Bir imalat formülü veya yeni bir çalışma yöntemi kullanılacağında, bunun işlemlerde uygun olup olmadığının gösterilmesi zorunluluktur. Tanımlanmış işleyiş, belirlenmiş materyal ile araç ve gereç kullanılarak istenilen kalitede ürününün sürekli olarak üretilebileceği gösterilmelidir. Araç ve gereçlerin ve materyallerin değiştirilmesi de dahil olmak üzere, ürünün kalitesini veya üretiminin tekrarlanabilirliğini etkileyebilecek tüm üretim değişiklikleri geçerli edilmelidir. İşleyiş ve yöntemlerin, hedeflenen sonuçlara ulaşmada yeterlilikleri kanıtlanıncaya dek düzenli aralıklarla tekrar validasyon uygulanmalıdır. Tekrar geçerlilik özellikle yöntemi değiştirdiğimiz zaman ve yeni göstergeler değerlerin dışında olduğu zaman önemlidir. Bununla birlikte basit matriks değişiminde, cihaz model ve marka değişikliklerinde tekrardan geçerlilik çalışmaları yapılmalıdır (Ertaş, Ö., S., 2005).

1.9.1. Seçicilik

Seçicilik, analiz edilecek maddenin, girişim yapma olasılığı bulunan diğer yardımcı veya etken maddelerin yanında miktarının tam ve doğru bir şekilde tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir (Özgür, D., 2011).

Diğer bir deyişle seçicilik, yöntemin, mevcut olması beklenen diğer bileşenlerin varlığında analiti kesin olarak tespit edebilme yeteneğidir (FDA, 2018).

Özgüllük ve seçiciliğin aynı terimler olduğu kabul edilip incelense de, tanımlarını Vessmann farklı şekilde yapmış ve bu terimlerin özellikle IUPAC/ WELAC ile ICH tarafından yapılmış olan tanımları arasındaki farka dikkat çekmiştir. Özgüllük, genellikle tek analite cevap üreten bir metot için kullanılırken; seçimlilik, birbirinden ayrılabilen veya ayrılmayan kimyasal varlıklar için cevaplar üreten bir sistem için kullanılır. Şayet bu cevap diğer tüm cevaplardan farklı ise yöntem seçicidir denilir. Analite cevap veren oldukça az yöntemin olmasından seçimlilik terimini kullanmak daha iyidir. USP kriterlerine göre bir analitik yöntemin seçiciliği, ölçüm anında bir analitin varlığını doğru tayin etmektir (Ertaş, Ö., S., 2005).

Yöntemin seçiciliği için analizi yapılan analiti ihtiva etmeyen (boş) örneğin ve boş örneğe eklenen belirli bir derişim düzeyindeki analitlerin kromatogramları karşılaştırılır. Boş örnek ile analit eklenmiş örnek kromatogramları karşılaştırılarak yöntemin seçiciliği hakkında bilgi edinilebilir (Çabuk, T., Z., 2018).

Spesifiklik, bu ilkeler doğrultusunda farklı bir metotla karşılıklı çalışarak da tespit edilebilir. Ancak analizi yapan kişinin aranan analitin başka bir kimyasal formda bulunup bulunamayacağı konusunda bilgi sahibi olması gerekir (Yılmaz, A., 2012).

1.9.2. LOD ve LOQ

Düşük derişimlerde kantitatif analiz için kullanılan analitik metotların geliştirilmesi, geçerli kılınması ve raporlanan analiz sonuçlarının yorumlanması için metodun güvenilir ölçüm yapabildiği en düşük derişimin bilinmesi gerekir (TÜRKAK, 2019).

Tespit limiti (LOD), özellikle limit testleri için gereklidir. Öngörülen deney koşulları altında tespit edilebilen bir numunedeki en düşük analit miktarıdır. Bu nedenle, sınır testleri sadece analit miktarının kesin bir seviyenin altında veya üstünde olduğunu gösterir. Tespit limiti genellikle numunedeki analit derişimi (örn. ppb) olarak belirtilir (Işık, B., D., 2017).

Çok düşük derişimlerde çalışılması gerektiğinde örneğin vermiş olduğu sinyalin, kör numuneden ayrımının yapılması ve uygun bir kesinlikle kantitatif sonuçların elde edilmesi gerekir. Analiz sonucu elde edilen veri sıfırın üzerinde olduğunda iki olasılık olur;

1- Örnek aranan analiti içermiyor ve elde edilen sonuçlar körün dağılım aralığındadır.

2- Örnek aranan analiti içeriyor ve analiz tekrarları ortalamanın elde edilmesini sağlar.

“1 No’lu durumda” yani örneğin gerçekten analiti içermediği durumda, yanlış pozitif karar verilebilir ve α - hata şekillenir.

“2 No’lu durumda” analitik sonucun tespit edildiği halde örneğin gerçekte içermediği durumlarda yanlış negatif sonuç elde edilebilir ve β - hata şekillenir.

Bu durumda 3 farklı limit oluşur;

- karar limiti – tespit limiti (decision limit- limit of detection) x_{LOD}
- minimum tespit edilebilir değer (minimum detectable value) x_{MDV} ,
- tayin limiti (limit of quantification, limit of determination) x_{LOQ} (Yılmaz, A., 2012)

Tayin sınırının tespit edilmesi aletli ve aletsiz olmak üzere seçilen yöntemle göre değişiklik gösterir. Aletli işlemlerde bilinen en düşük derişimde analiti içeren örnek sonuçlarının kör sonuçlarıyla kıyaslanmasıyla belirlenir. Tayin sınırının hesaplanmasında başka bir yöntem de, kör örneklerinin analizlenerek analitik geri zemin cevabının ölçülmesi ve bu değerin standart sapmasının 2 veya 3 gibi faktörle çarpılmasıdır (Ertay, Ö., S., 2005).

ISO/TS 13530, tespit limiti’ni (x_{LOD}) kör ve sıfır dışında tespit edilebilen en küçük miktar ya da derişim olarak belirtmektedir. pH, redoks potansiyeli gibi bazı fiziksel parametrelere tespit limiti uygulanamaz, bu yüzden ki tespiti için çalışma yapılmamalıdır. Bu konuda ayrımı daha da netleştirmek için bir örnek içinde var ya da yok diyebileceğimiz bir analit kalitatif olarak aranıyorsa buna tespit limiti uygulanabilir. Ancak, pH gibi ölçüldüğünde mutlak bir değer verilebilecek parametrelerde yani yokluğu olmayan parametrelerde tespit limiti bulunmamaktadır (Yılmaz, A., 2012).

Analiz edilen maddenin kabul edilebilir düzeyde kesinlik ve doğruluk düzeyinde miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırı içerisine girmeyen veya kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişim düzeyidir. Direkt yapılan deneylerle ya da hesaplamayla bulunabilir (Özgür, D., 2011).

EURACHEM, kimyasal ölçümlerin uluslararası izlenebilirliği ve kaliteli uygulamaların teşvik edilmesi için bir sistem kurmak amacına sahip, Avrupa'daki bir organizasyon ağıdır. EURACHEM belgesine göre LOD ve LOQ değerleri, standart sapmanın uygun bir katsayı ile çarpılması ile hesaplanır. Hesaplanan standart sapmanın, tipik test numuneleri için elde edilen kesinliği temsil etmesi ve

güvenilir bir tahminin yapılması için yeterli sayıda tekrar ölçümlerinin yapılmış olması önemlidir (Magnusson, B., ve ark, 2014).

Yapılan ölçümlerin standart sapması 3 ile çarpılarak LOD'nin ve 10 ile çarpılarak LOQ'nun sayısal değeri belirlenir (Çabuk, T., Z., 2018).

Avrupa Birliği'ndeki gıda ve yemlerdeki pestisit kalıntılarının resmi kontrolüne katılan laboratuvarlar için hazırlanmış olan SANCO dökümanı adı verilen bir belge mevcuttur. Bu dokümana göre, tayin limitini (LOQ), %70-120 geri kazanım, $\leq$ %20 RSD koşullarında en düşük derişim olarak tanımlanmaktadır. Buna göre, gittikçe azalan derişimlerde spike yapılarak geri kazanım çalışmaları yapılmalı, geri kazanımın %70-120 aralığında olduğu, RSD değerinin %20'nin altında olduğu en düşük derişim tayin limiti (LOQ) olarak belirlenmelidir. SANCO dokümanında tespit limiti (LOD) ise; valide edilmiş kontrol metotları ile miktarsal olarak belirlenebilen ve raporlanabilen valide edilmiş en düşük kalıntı derişimi olarak tanımlanmıştır (SANCO, 2011).

1.9.3. Ölçüm Aralığı ve Doğrusallık

Analitik bir metodun doğrusallığı, belirli bir aralıktaki numunelerdeki analit derişimleriyle orantılı olan test sonuçları elde etme yeteneğidir. Yani, derişimler ve test ölçümleri arasındaki ilişkilerin doğrusallığı ile ilgilidir (Işık, B., D., 2017).

En az üç farklı derişimde hazırlanan kalibrasyon standart çözeltileri ile, derişime (x) karşı response (y) değerleri tespit edilip doğrusal bir kalibrasyon fonksiyonuna ($y=a+bx$) sahip olunur. Kalibrasyon belirsizliğinin hesaplanmasında bu veriler (response, doğrunun eğimi (b), doğrunun kesim noktası (a)) kullanılarak birtakım işlemler yapılır. Bu hesaplama yöntemi EURACHEM/CITAC Guide CG 416 standardı sayfa 106'da açıklanmaktadır (Açar, Ö., Ç., ve ark 2013).

Derişime karşı cevabın grafiksel olarak doğrusal şekilde değişmesi ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korrelasyon katsayısı (r) doğrusallığı veren bir parametredir. Analit derişiminin ölçülen değerlere karşı regresyon analizleri ile matematiksel olarak hesaplanır (Özgür, D., 2011).

Kalibrasyon eğrisi, ürüne ve yönteme bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans numuneyle veya kör numune içine eklenmiş analitin bilinen derişimi ile yapılır. FDA rehberinde en az 6 nokta, bir de kör eklenerek toplam 7 nokta olarak belirtilmiştir. Sonuçlar grafiksel olarak verilir ve “regresyon eşitliği” ile “korelasyon katsayısı” belirtilir (Çabuk, T., Z., 2018).

Sonuçlar grafiksel şekilde verilir ve linear regresyon formülü ile korelasyon katsayısı belirtilir. Bu şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir. Korelasyon katsayısı $>0,99$ olmalıdır. Regresyon hesabı için Excel’de bulunan formüllerden yararlanılabilir (Yılmaz, A., 2012). Bununla birlikte, r^2 tayin katsayısı ve $\geq 0,98$ verilmişse de kabul edilebilir olmalıdır (SANCO, 2019).

Bu şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir. Regresyon hesabı için Excel’de bulunan formüllerden yararlanılabilir. Doğrusallık, korelasyon katsayısının hesaplanması yanında ANOVA tablosunda F değeri ile karşılaştırılarak da değerlendirilmelidir (Çabuk, T., Z., 2018).

1.9.4. Doğruluk (Geri Kazanım)

Doğruluk, yöntem sonucu edinilen verilerin gerçek değere olan yakınlığıdır (Işık, B., D., 2017). Doğruluk için sistematik hata hesabı yapılmaktadır. Sistematik hatanın hesaplanabilmesi için doğruluğu kabul edilen referans yani gerçek değer bilinmelidir. Gerçek değer dediğimiz; sertifikaya sahip referans materyalden, valide edilmiş metodun ölçümü sonucu ya da yeterlilik testleri sonucu elde edilebilir (Çabuk, T., Z., 2018).

Doğruluk, %geri kazanım olarak belirlenir. Geri kazanım, kabul edilen gerçek değer ile ortalama değer arasındaki fark olarak hesaplanabilir. ICH kılavuzu, doğruluğun belirtilen aralığı kapsayan en az üç derişim için en az dokuz ölçüm kullanılarak belirlenmesini önermektedir. Bir analiz yöntemi için doğruluk kriterleri, geri kazanımın her derişim seviyesinde %95 ile %105 arasında olması gerektiğidir (Işık, B., D., 2017).

Doğruluğun tespit edilebilmesi için sertifikaya sahip referans materyal, referans metod ve yeterlik testinin bulunmadığı anlarda yapılan geri kazanım çalışmasının en büyük avantajı orijinal matrikste çalışılabilmesidir. Çalışmaların en az 3 farklı derişimde yapılması gerekir. Geri kazanım çalışmasında aşağıdaki eşitlik kullanılır;

$$\%Geri\ Kazanım = \frac{\text{Bulunan Miktar} - \text{Numunedeki Miktar}}{\text{Spike Edilen Miktar}} \times 100$$

Hesaplanan sistematik hata ve gerçek değer arasında önemli bir farkın bulunup bulunmadığı t-testi ile kontrol edilebilir.

$$t = \frac{|X_{ortalama} - \mu|}{SD / \sqrt{n}}$$

$X_{ortalama}$ = Tekrarlanabilirlik veya tekrar üretilebilirlik koşulları altında yapılan ölçümlerin ortalaması.

μ = Bilinen değer (Zenginleştirme miktarı)

SD = Tekrarlanabilirlik veya tekrar üretilebilirlik koşulları altında yapılan ölçümlerin standart sapması

n = Tekrarlanabilirlik veya tekrar üretilebilirlik koşulları altında yapılan ölçümlerin sayısı (Çabuk, T., Z., 2018)

1.9.5. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik-Tekrar Üretilebilirlik)

Yöntemde kesinlik, herhangi bir değerın tekrarlanabilmesi veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir (Ertaş, Ö., S., 2005).

Bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı ve rastgele hataların dağılımını gösterir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olarak iki genel kesinlik ölçümü bulunmaktadır. Tekrarlanabilirlik, tekrarlanabilirlik koşulları altında elde edilen kesinliktir. Tekrarlanabilirlik koşulları; aynı yöntem ile eşdeğer numunelerde, aynı laboratuvarı, aynı ekipman ve aynı analizci tarafından kısa zaman aralığında bağımsız test sonuçları elde edilmesi olarak tanımlanır. Koşulların yakınlığı nedeniyle beklenen kesinlik küçük olmaktadır. Tekrar üretilebilirlik ise tekrar üretilebilirlik koşulları altında elde edilen kesinliktir. Tekrar üretilebilirlik koşulları; aynı yöntem ile eşdeğer numunelerde, aynı ya da farklı laboratuvarı, farklı ekipman ve farklı analizciler tarafından uzun zaman aralığında bağımsız test sonuçlarının elde edilmesi olarak tanımlanmıştır. Kesinlik, kantitatif analizlerde standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (RSD) olarak ifade edilir. Kesinliğin relatif standart sapma olarak ifadesi, derişimden bağımsız hale getireceği için kullanımda tercih edilmektedir. Analitik yöntemlerin kesinliğinin kabul

edilebilirliği konusunda basit bir performans parametresi olan Horwitz oranından (HorRat) faydalanılır (Çabuk, T., Z., 2018).

Kimyasal metotların kesinliğinin kabul edilebilirliği konusunda bilgi veren Horwitz oranı (HorRat) veya değeri basit bir performans parametresi olup her ne kadar laboratuvarlar arası relatif standart sapma (RSDR) ile ilgili geliştirilmiş olsa da laboratuvar içi relatif standart sapma (RSDr) için de uygulanabilmektedir. HorRat değeri 2'den daha küçük olmalıdır (Yılmaz, A. 2012).

HorRat hesabı için aşağıdaki formüller kullanılır:

$$HorRat = \frac{\%RSD}{\%PRSD}$$

$$\%PRSD = 2x(C^{-0.15})$$

Formülde yer alan 'C' değeri derişim olup, örneğin; 1 ng/mL için 10^{-9} , 10 ng/mL için 10^{-8} ve 100 ng/mL için ise 10^{-7} 'dir (Çabuk, T., Z., 2018).

SANCO dokümanına göre, tayin limitini (LOQ) metot performans kriterlerinin sağlandığı (%70-120 geri kazanım, ≤ 20 RSD) en düşük derişim olarak tanımlanmakta, herhangi bir matematiksel hesaplama yöntemi bildirmemektedir (Madde 58). Buna göre, gittikçe azalan derişimlerde spike yapılarak geri kazanım çalışmaları yapılmalı, geri kazanımın %70-120 aralığında olduğu, RSD değerinin %20'nin altında olduğu en düşük derişim tayin limiti (LOQ) olarak belirlenmelidir (Açar, Ö., Ç., ve ark 2013).

Yöntemin kesinliği, herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir. Yöntem kesinliği, standartların onayladığı bir dizi farklı ölçümün test sonuçlarına etkisidir. Kesinlik % bağıl standart sapma ile verilir. Kesinlik için kabul edilen kriter analizin türüne bağlıdır. Eczacılıkta, kalite kontrol analizi için bağıl standart sapma %1'den daha iyi olan kesinlik kolaylıkla başarılabılırken çevresel ve besin numunelerinde kesinlik, daha çok numune matriksine dayanır. Ayrıca kesinlik, analit derişimine,

analiz tekniğine bağılı olup bağılı standart sapma %2 ve %20 den fazlaya kadar çeşitlilik gösterebilir. Tekrarlanabilirlik, aynı kişi tarafından aynı şartlarda kısa zaman zarfında aynı miktardaki örneğin belli bir yöntem kullanılarak yapılan bir dizi işlemin kesinliğı olarak tanımlanır. Tekrarlanabilirlik, kesinliğin bir göstergesidir (Başoğlu, A., 2014).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Vemurafenib ile İlgili Çalışmalar

Pradad, G.R., ve ark. 'ın (2011) yaptıkları bir çalışmada, basit, seçici, doğrusal, kesin ve doğru RP-HPLC yöntemi geliştirildi ve tablet dozaj formunda Vemurafenibin hızlı bir şekilde test edilmesi için valide edildi. Ortam sıcaklığında, bir C18 (250x4,6mm, 5µm parçacık boyutunda) üzerinde 0,8ml / dk akış hızında izokratik elüsyon uygulanmıştır. Mobil faz, metanol, asetonitril, THF 65:20:15 v / v / v'dan oluşmaktadır. UV tespit dalga boyu 271 nm'dir ve 20 µl numune enjekte edilmiştir. Vemurafenib için alıkonma süresi 6,0 dakika bulunmuştur. Yöntemin hassasiyeti ve doğruluğu için RSD yüzdesi %2'den az bulunmuştur. Yöntem, tablet dozaj formundaki Vemurafenib'in rutin analizi için başarıyla uygulanmıştır. %99,41 geri kazanım elde edilmiştir. Lineerite, 5-80 ppm derişim aralığında $r^2=0.9993$ olarak gözlenmiştir.

Sparidans, R. W., ve ark. (2012), mutasyona uğramış BRAF inhibitörü vemurafenib için bir biyoanalitik analiz geliştirip onaylamıştır. Kantitatif deney için, insan plazma numuneleri, iç standart olarak sorafenib içeren sulu asetonitril (1/3, v / v) ile protein çökeltisi kullanılarak ön-işleme tabii tutulmuştur. Ekstrakt, kromatografik sisteme doğrudan enjekte edilmiştir. Bu sistem, bir su ve metanol karışımında %0,01' lik (v / v) formik asit kullanılarak izokratik elüsyon ile oktadesil silika kolonundan oluşmaktadır. Eluat, pozitif iyonizasyon ile elektrosprey arayüzüne transfer edilip analit, üçlü kuadropol kutuplu kütle spektrometresinin seçilen reaksiyon izleme modunda tespit edilmiştir.

Zheng. Y., ve ark. (2013) yaptığı bir çalışmada plazmada vemurafenib ve erlotinibi ölçmek için bir HPLC-UV yöntemi geliştirmiştir. Vemurafenib, erlotinib ve sorafenib (iç standart), bir glisin tamponu (pH 9,0, 100 mM) / asetonitril (45:55, v/v) mobil fazı kullanılarak bir C8 Xterra® MS üzerinde izokratik olarak ayrılmıştır. Numuneler, 12 dakika süre boyunca 0,9 mL / dk'lık bir akış hızında elue edilmiştir. Kromatografi 50°C'de yapılmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 µl olarak verilmiştir. Absorbans 249 nm'de kaydedilmiştir. Kalibrasyon, vemurafenib için 1,25-100 mg/L aralığında doğrusaldır.

Chhabda, P.J. ve ark. (2013), vemurafenib'in kantitatif analizinin geliştirilmesi ve validasyonu için yeni, basit, hassas ve kararlı ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi kullanmıştır. Bunun için C8 kolonu (150x 4.6, 3.5 μ m), mobil faz olarak da tampon-asetonitril (50:50 v/v) kullanılmıştır ve akış hızı 1.0 ml/dakika olarak belirlenmiştir. 254 nm'de UV ile gerçekleştirilmiştir. Lineerite, 20-200 μ g / ml derişim aralığında $r^2=0,9999$ olarak gözlenmiştir. Doğruluk ve kesinlik çalışmalarında relatif standart sapma yüzdesi %2' den düşük bulunmuştur. Vemurafenib, asidik, alkalın, oksidasyon, fotoliz ve termal bozunum gibi stres koşullarına maruz bırakılmıştır. Vemurafenib asidik ve alkalın bozunmaya karşı daha duyarlı bulunmuştur.

Nijenhuis, C.M., ve ark. (2014) insan plazmasında vemurafenib'in tayini için bir yöntem geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Ayrıca farklı dedektörlü iki LC-MS sistemi test edilmiştir. Klinikte insan plazma örnekleri toplanıp -20°C'de saklanmıştır. Vemurafenib plazmadan sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile bir C18 kolonu üzerinde ayrılmıştır kütle spektrometresi ile analiz edildiği bildirilmiştir. Ölçüm için iç standart olarak kararlı bir izotop kullanılmıştır. 1 ile 100 μ g / ml aralığında, deney korelasyon katsayıları (r^2) 0,9985 veya daha yüksek şekilde doğrusal olmuştur. Sonuç olarak, insan plazmasındaki vemurafenib için sunulan analitik yöntem başarıyla doğrulanmış ve bu test için iki LC-MS sisteminin performansı karşılaştırılabilir olmuştur. Ek olarak, vemurafenib ile tedavi edilen vemurafenibin kanseri hastalarının farmakokinetik ölçümün değerlendirilmesi için yöntem başarıyla uygulanmıştır.

Alvarez, J.C., ve ark. (2014), terapötik ilaç düzeyi izlemine incelemek amacıyla Vemurafenib'in üçlü kuadropol spektrometrik dedeksiyonu 10 μ L plazma örneği kullanılarak yapılmıştır. Vemurafenib-¹³C₆'yı iç standart olarak eklenmesinden sonra su/asetonitril kullanarak basit bir çöktürme yapılmıştır. Ve bir LC / MS / MS mikro-yöntemi geliştirmiştir.

Bihan. K., ve ark. (2015), sıvı kromatografi - kütle spektrometresi kullanılarak vemurafenib ölçümü için basit bir yöntem geliştirmiştir. İnsan plazmasındaki vemurafenibin stabilite çalışması da yapılmıştır. İç standart olarak ¹³C₆-vemurafenib kullanılmıştır. Plazma numunesini hazırlamak için tek aşamalı protein çöktürmesi kullanılmıştır. Kromatografi, bir Acquity UPLC BEH C18 kolonu (2,1-50 mm, 1,7 mm parçacık boyutu) kullanılarak kromatografik ayırma ile bir Acquity UPLC

sistemi üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, 1,0 ila 100,0 mcg / mL aralığında doğrusal olarak bulunmuştur. Plazmadaki vemurafenib için alt ölçüm limiti 0,1 mcg / mL olarak bulunmuştur. Vemurafenib, test edilen tüm seviyelerde, oda sıcaklığında (20°C), + 4°C'de veya -20°C'de saklandığında 1 ay boyunca stabil kalmıştır. Bu yöntem, oral uygulamadan sonra bir hastada vemurafenibin plazma farmakokinetik çalışmasını başarıyla gerçekleştirmek için kullanılmıştır. Bu sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi yönteminin plazmada vemurafenib miktarının belirlenmesi için kullanılan basit, hızlı, hassas, doğru, hassas ve güvenilir olduğu bulunmuştur.

Vikingsson, S., ve ark. (2016), Vemurafenib analizi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada LC-MS / MS yöntemlerini ters fazlı HPLC ve bir C18 kolonu, formik asit ile kombine edilmiş metanolden oluşan bir mobil faz sistemi ile kullanmıştır.

Rousset, M., ve ark.'ın (2017), yaptıkları bir çalışmada, BRAF inhibitörü olan vemurafenibin ölçümü için UPLC-MS/MS metodunu kullanmışlardır. Örnekler, sisteme verilmeden önce katı faz ekstraksiyon ile ön deriştirme işlemine tabii tutulmuştur. Kalibrasyon eğrisi aralığı, 0,4-100 µg / ml'dir.

Güven, G.'nin (2019) yapmış olduğu bir çalışmada, vemurafenibin HPLC ile analizinde kullanılan mobil faz, fosfat tamponu (pH 9.0, 10 mM) ve asetonitril-su (60:40, v / v) karışımından oluşur ve 7 dakika boyunca 1 mL / dak'lık bir akış oranında sisteme verilir. Kromatografi 25°C'de yapılır. Absorbans değerleri 249 nm'de kaydedilir.

2.2. DLLME Yönteminin Kullanımı ile İlgili Çalışmalar

Farajzadeh, M.A., ve ark. (2007) yaptığı çalışmada, sulu örneklerdeki Irganox 1010, Irganox 1076 ve Irgafos 168 antioksidanlarının DLLME yöntemiyle ekstraksiyonunu ve HPLC-DAD kullanarak tayinini gerçekleştirerek yeni bir yöntem sunmuşlardır. Alt faz, 100 µL şırınga yardımıyla alınıp diğer konik tüpe aktarılmış ve çözücü buharlaştırıldıktan sonra, 50 µL metanolde çözülerek HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Jahromi, E.Z. ve ark. (2007), Cd tayininde GFAAS için DLLME yöntemi kullanılarak çalışılmıştır. Burada ekstraksiyon çözücüsü olarak 34 μL CCl_4 , dispersif çözücü olarak 500 μL metanol ve Şelatlayıcı reaktif olarak amonyum pirolidin ditiyokarbamat kullanılmıştır. Ekstraksiyon sonrası örnek GFAAS'ye enjekte edilmiştir. Gözlenebilme sınırı 0,6 ng L^{-1} ve zenginleştirme faktörü 125 olarak bulunmuşlardır. Yöntem deniz suyu, çeşme suyu ve deniz suyuna uygulanmıştır.

Farajzadeh, M.A. ve ark. (2008) FAAS ile Cu iyonları tayininde DLLME yöntemi kullanılmıştır. Belirli derişimde Cu iyonu ihtiva eden örnek çözeltiye asetat tamponu (pH:7) ve 8-hidroksi kinolin eklenmiştir. Üzerine CHCl_3 içeren metanol ilave edilmiştir. Sediment faz ayrıldıktan sonra nitrik asit ilave edilip, FAAS'de Cu iyonu tayin edilmiştir.

Xiong, C., ve ark., (2009). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ultraviyole dedektörü (HPLC-UV) ile birlikte dağıtıcı sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon (DLLME) olarak adlandırılan basit, hızlı ve hassas bir yöntem, üç psikotrop ilacın (amitriptin, klomipramin ve tioridazin) idrarda belirlenmesi için kullanılmıştır. Belirleme, optimal kromatografik koşullar altında bir C8 kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir (mobil faz: amonyum asetat (0,03 mol L^{-1} , pH 5,5) –asetonitril (60:40, v/v); akış hızı: 1,0 mL min^{-1} ; dalga boyu: 238 nm). İlaçların pH, ekstraksiyon ve dağıtıcı çözücü türü ve hacimleri, ekstraksiyon süresi ve iyon gücü gibi ekstraksiyon verimliliğini etkileyen çeşitli faktörler incelenmiş ve optimize edilmiştir. Optimal DLLME koşulları altında, idrar örneklerinden amitriptin, klomipramin ve tioridazin mutlak geri kazanımları sırasıyla %96, 97 ve 101 bulunmuştur. Önerilen yaklaşımın tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) amitriptin için sırasıyla 3 ve 10 ngmL^{-1} , klomipramin için 7 ve 21 ngmL^{-1} ve tioridazin için 8 ve 25 ngmL^{-1} olmuştur. 0,100 μgmL^{-1} derişimdeki ilaçlar için dokuz tekrar sonucu ölçülen relatif standart sapmalar (RSD'ler) %4,8'den azdır. İncelenen derişim aralıklarında iyi doğrusallık değerleri elde edilmiştir ($R^2 > 0,998$). Önerilen yöntem, amitriptin ve klomipramin tedavisi altında iki kadın hastadan alınan gerçek idrar örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Mohammadi S.Z. ve ark. (2009) FAAS'de Ag iyonlarının tayini için DLLME yöntemini kullanmışlardır. Yöntemde 8 mL örnek çözeltiye 1 mL 0,1 mol/L fosfat tamponu (pH:5) ve 1 mL 1% NaCl çözeltisi eklenmiştir. Dispersif çözücü olarak 0.5

mL etanol, ekstraksiyon çözücüsü olarak 15 µL karbon tetraklorür kullanılmıştır. Sediment faz ayrıldıktan sonra 0,5 mL dimetil formamid (DMF) eklenerek alevli AAS'de Ag iyonları tayin edilmiştir. Zenginleştirme faktörü 16 ve gözlenebilme sınırı 1,2 ng mL⁻¹ olarak bulmuşlardır. Geliştirilen bu yöntem atık su, musluk suyu ve kaynak suyuna uygulanmıştır.

Chen, H. ve ark. (2010), Cr⁷⁺ tayini için DLLME yöntemi uygulanmış ve analit GFAAS'de tayin edilmiştir. 5 ng mL⁻¹ Cr⁷⁺ içeren 8 mL örnek çözelti üzerine %4'lük 10 µL APDC ilave edilmiştir. Çeşme suyu ve göl suyuna uygulanabilen bu yöntemde, gözlenebilme sınırı 0,07 ng mL⁻¹ ve zenginleşme faktörü 300 bulunmuştur.

Hashemi, P., ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada, ters faz DLLME kullanılarak zeytin yaprağında ve zeytin karasuyunda HPLC-UV ile oleuropein tayini yapılmıştır. Ekstraksiyon çözgeni su seçilmiştir. Dağıtıcı çözgen ise etil asetattır. Karasuda ve zeytin yaprağında, geri kazanım değerleri %96,2-109,2 aralığında bulunmuştur.

Hashemi, P., ve ark., (2011) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, ters faz DLLME kullanılarak zeytinyağında HPLC-UV ile hidroksitirozol ve tirozol tayini yapılmıştır. Ekstraksiyon çözücüsü olarak 100 µL su, dağıtıcı çözücü olarak 200 µL etilasetat kullanılmıştır. Hidroksitirozol ve tirozol için ortalama geri kazanım değerleri sırasıyla %104,3 ve %97,6 olarak bulunmuştur.

Ho., M.Y., ve ark. (2013) yaptığı bir çalışmada, dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (DLLME) ve ardından gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) kullanılarak üç farklı matris tipinde (taze meyveler, taze sebzeler ve kurutulmuş otlar) on organofosfor pestisitinin analizi için basit bir örnek ön arıtma prosedürünü açıklamaktadırlar. Matris uyumlu validasyon çalışmasında, DLLME koşullarını optimize etmek için, 0,1 ile 1000 µg L⁻¹ arasında geniş bir doğrusal aralık içinde hedef OPP'ler belirlenmiştir. Organik ekstraktların sınırlı kullanımı ile, 100 kata kadar kayda değer zenginleştirme faktörleri elde edilmiştir.

Padro', J.M., ve ark. (2013), yaptığı bir çalışmada, insan plazmasındaki nifurtimox ve benznidazolün belirlenmesi için sıvı kromatografisi ve UV ile birleştirilmiş

dispersif sıvı sıvı mikro ekstraksiyonu kullanılmıştır. DeneySEL parametrelerin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkileri, iyonik sıvı ve dağıtıcı çözücünün tipi ve hacmi, pH, tuzun doğası ve derişimi ve santrifüj ve ekstraksiyon süresi optimize edilmiştir. Matris etkisi tespit edildiği için ölçüm için standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. Bu mikroekstraksiyon prosedürü, literatürde daha önce bildirilenlere göre önemli gelişmeler sağlamıştır ve yüksek gün içi tekrarlanabilirlik (bağıl standart sapma = nifurtimox ve benznidazol için sırasıyla %1,02 ve %6,66) dahil olmak üzere birçok avantaja sahiptir, son derece düşük tespit limiti vardır (Sırasıyla nifurtimox ve benznidazol için $15,7 \text{ ngmL}^{-1}$ ve $26,5 \text{ ngmL}^{-1}$) ve minimum miktar numune ve ekstraksiyon solventi gerekli olmuştur. Geri kazanımlar yüksek bulunmuştur (nifurtimox ve benznidazol için sırasıyla %98,0 ve %79,8).

Emídio, E.S ve ark., (2015), su örneklerinde Zearalenon ve türevlerini tayin etmeden önce bunları DLLME yöntemi ile zenginleştirmişlerdir. Çalışmada ekstraksiyon çözücüsü olarak bromosikloheksan kullanmışlardır. Geliştirdikleri yöntemin doğruluğunu göstermek için su örneklerine analitlerin standart çözeltilerinden eklemeler yapmışlar ve %81-118 aralığında geri kazanım elde etmişlerdir.

Martins, A.F. ve ark. (2017), yaptıkları bir çalışmada hastane atık su örneklerinde kokain ve metabolitlerini, sıvı kromatografisi kullanılarak hızlı bir yöntem ile ölçmüşlerdir. Örnek hazırlama aşamasında katı faz ekstraksiyonu ve dispersif sıvı sıvı mikro ekstraksiyon yöntemi uygulanmışlardır. DLLME sırasında, mikroekstraksiyon için optimum koşulları bulmada farklı kimyasal çözücüler ve çözücü kombinasyonları test etmişlerdir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak 150 μL kloroform ve dağıtıcı çözücü olarak 350 μL metanol optimum olarak seçilirken, uygun pH'ı 9, eklenecek tuz miktarını da 0.3 mol L^{-1} NaCl olarak belirlemişlerdir. Kokain geri kazanımı, % 98.3'e kadar yükselmiştir. Sonuç olarak DLLME ile basit, uygun fiyatlı ve hızlı bir analiz yapmanın yanı sıra sadece küçük bir hacim çözücü ve numune ile çalışarak kantitatif olarak ölçüm yapmışlardır.

Wu, J., ve ark. (2019), yaptıkları bir çalışmada sirke içindeki, sirke kalitesinin aktif bir göstergesi olan tetrametilpirazin (TMP) derişimini dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu (DLLME) ile ön deriştirme işlemine tabi tuttuktan sonra HPLC-UV ile okuma işlemi yapmışlardır. Geliştirilen yöntem için $R^2 > 0.999$ korelasyon katsayısı ile 0,050–80,000 mg L^{-1} derişim aralığında iyi bir doğrusallık sergilemiştir.

Ayrıca, geliştirilen yöntemi kullanarak sirke içindeki TMP'nin geri kazanım yüzdesini %97,97-105,24 aralığında bulmuşlardır.

Raoufi, A., ve ark. (2019), yaptıkları bir çalışmada, kan örneklerindeki Atenolol, Metoprolol ve Propranololu analizlemek için HPLC-DAD ile birleştirilmiş, iyonik sıvıları kullanılarak uygulanan DLLME yöntemini kullanmışlardır. Uygulamış oldukları bu yöntemin daha önceki yöntemlerle karşılaştırılması sonucu, önerilen yöntemin kan örneğindeki ilaçların ekstraksiyonu ve tayini için tekrarlanabilir, hızlı ve güvenilir bir numune ön deriştirme tekniği olduğunu göstermiştir.

Yao, T., ve ark. (2020), yaptıkları bir çalışmada dört organik manyetik iyonik sıvı sentezlemiş ve karakterize etmişlerdir. Süt örneklerinde eser miktarda sülfonamidi ayırmak, ön deriştirmek ve belirlemek için HPLC ile birleştirilmiş dağıtıcı sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon yöntemi uygulamışlardır. Valide ettikleri yöntemi, gerçek süt örneklerinde 5 sülfonamidin eşzamanlı analizinde başarıyla uygulamışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

- Vemurafenib (propan-1-sülfonik asit{3-[5-(4-klorofenil)-1H-pirol[2,3-b]piridin-3-karbonil]-2,4diflorofenil}-amit (99,5%, Roche F. Hoffmann-LaRoche Ltd, Basel, İsviçre),
- HPLC saflıkta asetonyitril (Merck),
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck),
- Dikloroetan (Merck),
- Kloroform (Lab-Scan),
- Diklorometan (Sigma-Aldrich),
- Klorobenzen (Sigma-Aldrich),
- Aseton (HPLC saflıkta, Sigma-Aldrich),
- Etanol (Merck),
- Metanol (Merck),
- Sodyum klorür (Merck),
- Orto-fosforik asit (85%, Merck),
- Sodyum hidroksit (Merck)
- Amonyak çözeltisi (25%, Merck)
- Üre (Merck)
- Disodyum hidrojen ortofosfat, anhidrat (Merck)
- Potasyum dihidrojen ortofosfat (Merck)
- Amonyum klorür (Merck)
- Sodyum sülfat, hidrat (J. T. Baker)
- Ürik asit (98%, Sigma-Aldrich)
- Potasyum klorür (Merck)
- Kalsiyum klorür (Kimetsan)
- Potasyum sülfat (Merck)
- Magnezyum sülfat (Tekkim)
- Amonyum klorür (Merck)
- HPLC saflıkta Deiyonize ultra saf su (0,45 µm milipor filtreli, Milipore Company, USA) (Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.)

3.1.1. Vemurafenib Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Öncelikle stok çözelti hazırlanmıştır. Bunun için 100 mg/L Vemurafenib, DMSO içinde çözülerek hazırlanmış ve karanlıkta, +4°C’de saklanmıştır. Bu stok çözelti kullanılarak her gün taze çözeltiler hazırlanmıştır. Çalışma aralığına bağlı olarak kalibrasyon çözeltileri, hazırlanan stok çözelti kullanılarak taze şekilde hazırlanmıştır.

3.1.2. Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

0,34 mL fosforik asit tartılıp 100 mL’lik balonjojeye konulmuştur üzerine bir miktar su eklenip pH metre ile ölçerek NaOH ile pH 7’ye ayarlanmıştır. Daha sonra üzeri su kullanılarak 100 mL hacme tamamlanmıştır.

3.1.3. Mobil Fazın Hazırlanması

1 litrelik balonjojeye, 10 mM olacak şekilde fosforik asit eklenip yaklaşık 300 ml suda çözülmüştür ve 600 mL asetonitril eklendikten sonra NaOH çözeltisi kullanılarak pH metre ile pH 9’a ayarlanmıştır. Ardından çözelti, 1000 mL’ye su ile tamamlanmıştır.

3.2. Kullanılan Ekipman ve Cihazlar

Yapılacak çalışmalarda kullanılacak olan;

- HPLC (bir kuaterner pompa-G1311B, otoenjektör-G1329B ve DAD dedektör-G4212B ile donatılmış Agilent Teknolojileri 1260 infinity LC sistemi),
- Sabit faz olarak kullanılan X-Terra RP-18 84.60 x 250 mm I.D., 5 µm kolonu,
- Santrifüj cihazı (Hettich EBA 8S),
- Manyetik karıştırıcı (Wisd Lab. Ins. MSH-20D),
- Dijital pH metre (Weil-heim - WTW 315i),
- Tartım cihazı (GC1603S-OCE, Sartorius),
- Etüv (Nüve FN 400),

- Saf su cihazı (GFL 2001/4),
- pH metre (Hanna Instruments HI2211),
- Otomatik pipetler (Microlit ve Isolab),
- Buzdolabı (Vestel) gibi cihaz ve ekipmanlar Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

Deneylerde kullanılan;

- Ultra safsu cihazı (Millipore - Simplicity),
- Su banyosu (Nüve BS 402),
- Çoklu çalkalayıcı (Heidolph promax 202),
- Vorteks karıştırıcı (Velp Scientifica) Adnan Menderes Üniversitesi Kimya Bölüm Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.3. Vemurafenib Tayini İçin Optimizasyon Çalışmaları

Belirli bir miktar örnek, konik tabanlı santrifüj tüpüne alınarak Vemurafenib'in farklı miktarları ilave edilmiştir. Tampon çözeltisinin ardından belirlenen miktarda ekstraksiyon çözücüsü içeren dağıtıcı çözücü hızlıca bir şırınga yardımı ile tüpe aktarılmıştır. Karışım nazıkçe çalkalanmıştır. Santrifüj tüpünde bulutlu çözelti oluşunca belirlenen süre ve hızdaki santrifüj cihazına alınıp santrifüjlenmiştir. Dipte toplanan sediment fazı mikroşırınga yardımıyla alınmış ve HPLC cihazında analizlenmiştir.

Bu işlemler, Ekstraksiyon çözücüsünün seçimi ve hacmi, dağıtıcı çözücü seçimi ve hacmi, pH'ın, tuz eklemenin ekstraksiyona etkisi, sıcaklığın belirlenmesi, santrifüj hızının ve süresinin, ekstraksiyon süresinin belirlenmesi gibi optimizasyon parametreleri incelerken tekrarlanmıştır.

Vemurafenib tayini için optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen bulgular Bölüm4.1.'de verilmiştir.

3.3.1. Ekstraksiyon Çözücüsü ve Dağıtıcı Çözücü Seçimi

Optimum koşullar belirlenirken ekstraksiyon çözücüsü olarak 1,2-dikloroetan (DKE), Kloroform (K), Diklorometan (DKM), Klorobenzen (KB) ile çalışırken, dağıtıcı çözücü olarak Aseton (A), Etanol (E), Asetonitril (ACN) ve Metanol (M) kullanılmıştır.

İlk deneme olarak ortamda 0,01 mg/L vemurafenib olacak şekilde 5 mL'lik, kapaklı, konik, plastik bir santrifüj tüpüne stok çözeltiden gerekli miktar eklenmiştir. Tüpe 1 mL fosfat tamponu (pH=7) ilave edilmiş, toplam hacim 4500 µL olacak şekilde su ile tamamlanmıştır. Sulu örnek içerisine dağıtıcı çözücü (400 µL) ve ekstraksiyon çözeltisi (100 µL) karışımı hızlı bir şekilde enjekte edilmiştir. Örnek çözeltisine, yapılan bu enjeksiyon örnek içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün küçük damla yapılarının oluşmasına yol açmıştır. Karışım vortekslenip santrifüjlendiğinde küçük damlalar konik tüpün dibinde toplanmıştır. Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak doğrudan HPLC ile tayin edilmiştir. DKM ile yapılan çalışmalarda 100µL ekstraksiyon çözücüsü yeterli olmamıştır. Sadece DKM ile yapılan çalışmalarda, 400µL dağıtıcı çözücü, 200µL ekstraksiyon çözücüsü eklenip hafifçe karıştırılmış, vortekslenip, santrifüjlenmiştir ve alt fazı mikrosiringa ile alınıp vial insert e konmuş ve direkt olarak HPLC cihazına verilmiştir. Bu çalışma şartlarında Vemurafenibe dair herhangi bir pik elde edilememiştir. Bu ilk denemede pik elde edemeyişin nedeni HPLC'ye direkt olarak verilen ekstraksiyon çözücüsünün varlığından olabilir diye düşünülüp ikinci ekstraksiyon denemesi yapılmıştır.

İkinci deneme ortamdaki Vemurafenib 0,50 mg/L olacak şekilde tekrarlanmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak, bir vial insert içine konulmuştur. Ardından 40°C'de çözücü buharlaştırılmıştır. Çözücü tamamen buharlaşınca 50 µL dimetil sülfoksit (DMSO) ve 150 µL mobil faz eklenip bir HPLC ile tayin edilmiştir. DKM ile yapılan çalışmalarda yine 100µL ekstraksiyon çözücüsü yeterli olmamıştır. Sadece DKM ile yapılan çalışmalarda, 400µL dağıtıcı çözücü, 200µL ekstraksiyon çözücüsü eklenip hafifçe karıştırılmış, diğer işlemler aynı şekilde uygulanmıştır. Bu denemelerde pik gözlenmiş fakat olması gerekenden çok yüksek derişimler elde edilmiştir. Deneme 2'de piklerin yüksek olmasının nedeni tampon kullanımından olabilir diye düşünülüp deneme 3 yapılmıştır.

Üçüncü deneme ortamdaki Vemurafenib 0,50 mg/L olacak şekilde tekrarlanmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak, bir vial insert içine konulmuştur. Ardından 40°C’de çözücü buharlaştırılmıştır. Çözücü tamamen buharlaşınca 50 µL dimetil sülfoksit (DMSO) ve 150 µL mobil faz eklenip bir HPLC ile tayin edilmiştir. DKM ile yapılan çalışmalarda yine 100µL ekstraksiyon çözücüsü yeterli olmamıştır. Sadece DKM ile yapılan çalışmalarda, 400µL dağıtıcı çözücü, 200µL ekstraksiyon çözücüsü eklenip hafifçe karıştırılmış, diğer işlemler aynı şekilde uygulanmıştır. Tampon kullanılmadan yapılan denemelerde verimin düştüğü görülmüş fakat yine çok yüksek derişimler gözlemlenmiştir. Deneme 3’de piklerin yüksek olmasının nedeni kullanılan vemurafenib derişiminin yüksek olmasından olabilir diye düşünülüp deneme 4 yapılmıştır.

Dördüncü deneme ortamdaki Vemurafenib 0,05 mg/L olacak şekilde tekrarlanmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak, bir vial insert içine konulmuştur. Ardından 40°C’de çözücü buharlaştırılmıştır. Çözücü tamamen buharlaşınca 50 µL dimetil sülfoksit (DMSO) ve 150 µL mobil faz eklenip bir HPLC ile tayin edilmiştir. Yine DKM ile yapılan çalışmalarda yine 100µL ekstraksiyon çözücüsü yeterli olmamıştır. Sadece DKM ile yapılan çalışmalarda, 400µL dağıtıcı çözücü, 200µL ekstraksiyon çözücüsü eklenip hafifçe karıştırılmış, diğer işlemler aynı şekilde uygulanmıştır. Pik gözlenmiş olup, yine olması gerekenden çok yüksek derişimler elde edilmiştir. Vial insertte uçurma gerçekleştikten sonra DMSO ve mobil faz eklendiğinde iyi karışmadığı ihtimali göz önünde bulundurulup bir sonraki deneme yapılmıştır.

Bir sonraki denemede, ortamda 0,05 mg/L vemurafenib olacak şekilde 5 mL’lik, kapaklı, konik, plastik bir tüpe stok çözeltiden gerekli miktar eklenmiştir. Tüpe 1 mL fosfat tamponu (pH=7) ilave edilmiş, toplam hacim 4500 µL olacak şekilde su ile tamamlanmıştır. Sulu örnek (Şekil 1.3.-I) içerisine dağıtıcı çözücü (400 µL) ve ekstraksiyon çözeltisi (100 µL) karışımı hızlı bir şekilde enjekte edilmiştir (Şekil 1.3.-II). Bu şekilde yapılan enjeksiyon, örnek içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün küçük damlacık formlarının oluşmasına yol açmıştır (Şekil 1.3.- III). Bu adımda kimi çözeltide bulutlanma oluşurken kimi çözeltelerde oluşmamıştır. Dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözücüsü seçiminde bu durum da önemli bir değerlendirme faktörü olmuştur. DLLME’de ekstraksiyon karışımının, sulu çözeltide ekstraksiyon

çözücüsünün iyi damlacık formlarının oluşturmada dağıtıcı çözücü anahtar rol oynar. Hidrofobik bir madde olan vemurafenib, toplam sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilmiştir. Karışım vortekslenip sanrifüjlendiğinde küçük damlacıklar konik tüpün dibinde toplanmıştır (Şekil 1.3.-IV). Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak, bir vial insert içine konulmuştur. Ardından 40°C’de çözücü buharlaştırılmıştır. Çözücü tamamen buharlaşınca, 100µL DMSO eklenip DMSO nun iyice karışması sağlandı ve HPLC ile ölçülmüştür.

Ekstraksiyon çözücüsü ve dağıtıcı çözücü seçimi çalışmaları sonucu elde edilen değerler Bölüm 4.1.1.’de verilmiştir.

3.3.2. Ekstraksiyon Çözücüsü ve Dağıtıcı Çözücü Hacminin Belirlenmesi

Ortamda 0,1 mg/L vemurafenib olacak şekilde 5 mL’lik, kapaklı, konik, plastik bir tüpe stok çözeltiden gerekli miktar eklenmiştir. Tüpe 1 mL fosfat tamponu (pH=7) ilave edilmiş, kullanılacak ekstraksiyon çözgeni ve dağıtıcı çözgen miktarı da hesaplanıp çözeltinin toplam hacim 5000 µL olacak şekilde su ile tamamlanmıştır. Sulu örnek (Şekil 1.3.-I) içerisine dağıtıcı çözücü (200, 400, 600, 800, 1000 µL) ve ekstraksiyon çözeltisi (50, 100, 150, 200 µL) (Çizelge 3.1.) karışımı hızlı bir şekilde enjekte edilmiştir (Şekil 1.3.-II).

Çizelge 3.1. Denemelerde kullanılan ekstraksiyon çözücüsü ve dağıtıcı çözücü hacimleri

Kullanılan ekstraksiyon çözücü hacimleri (µL)	
1,2-dikloroetan	50
	100
	150
	200
	200

Kullanılan dağıtıcı çözücü hacimleri (µL)	
Etanol	200
	400
	600
	800
	1000

Örnek çözeltisine, bu yapılan enjeksiyon örnek içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün küçük damla yapılarının oluşmasına neden olmuştur (Şekil 1.3.-III). DLLME’de ekstraksiyon karışımının, sulu çözelti içinde ekstraksiyon çözücüsünün iyi damlacık yapılarının oluşturmada dağıtıcı çözücü anahtar büyük oynar. Hidrofobik bir madde olan vemurafenib, toplam sulu çözelti içerisindeki ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilmiştir. Karışım vortekslenip sanrifüjlendiğinde küçük damlacıklar konik tüpün dibinde toplanmıştır (Şekil Şekil 1.3.-IV). Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak, bir vial insert içine konulmuştur. Ardından 40°C’de çözücü buharlaştırılmıştır. Çözücü tamamen buharlaşınca, 100µL DMSO eklenip, DMSO nun iyice karışması sağlanıp HPLC ile ölçülmüştür.

Ekstraksiyon çözücüsü ve dağıtıcı çözücü hacminin belirlenmesi çalışmaları sonucu elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2.’de verilmiştir.

3.3.3. pH’ın Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Ekstraksiyon verimi üzerindeki pH etkisi ekstraksiyon ve mikro ekstraksiyon tekniklerinde araştırılmaktadır. DLLME’de, farklı pH aralıklarında (pH=2, 4, 6, 7, 8, 10) çalışılarak en uygun pH seçilmiştir.

Ortamda 0,1 mg/L vemurafenib olacak şekilde 5 mL’lik, kapaklı, konik, plastik bir tüpe stok çözeltiden gerekli miktar eklenmiştir. Tüpe 1 mL fosfat tamponu (pH=2, 4, 6, 7, 8, 10) ilave edilmiş, 200 µL ekstraksiyon çözgeni ve 800 µL dağıtıcı çözgen eklenip hacim 5000 µL olacak şekilde su ile tamamlanmıştır. Sulu örnek (Şekil 1.3-I) içerisine dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözeltisi karışımı hızlı bir şekilde enjekte edilmiştir (Şekil 1.3-II). Örnek çözeltisine, bu şekilde yapılan enjeksiyon örnek içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün küçük damla formlarının oluşmasına neden olmuştur (Şekil 1.3-III). DLLME’de ekstraksiyon karışımının, sulu çözelti içinde ekstraksiyon çözücüsünün iyi damlacıklar oluşturmada dağıtıcı çözücü anahtar rol oynar. Hidrofobik bir madde olan vemurafenib, toplam sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilmiştir. Karışım vortekslenip sanrifüjlendiğinde küçük damlacıklar konik tüpün dibinde toplanmıştır (Şekil 1.3-IV). Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak, bir vial insert içine konulmuştur. Ardından 40°C’de çözücü buharlaştırılmıştır. Çözücü tamamen buharlaşınca, 100µL DMSO eklenip, DMSO nun iyice karışması sağlanıp HPLC ile ölçülmüştür.

pH'ın Vemurafenib'in DLLME verimine etkisi üzerine yapılan çalışmalara ait bulgular Bölüm 4.1.3.'te verilmiştir.

3.3.4. Tuz Eklemeinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Ekstraksiyon verimi üzerindeki tuz etkisi ekstraksiyon ve mikro ekstraksiyon tekniklerinde araştırılmaktadır. DLLME'de, tuz ilavesi, ekstraksiyon verimliliğini artırabilir, hedef analitlerin ekstraktaki kütle transferini azaltabilir veya ekstraksiyon verimliliği üzerinde dikkate değer bir etkiye sahip olmayabilir. Bunu anlayabilmek için farklı oranlarda (%2, 4, 6, 8, 10) tuz eklenerek tuz etkisine bakılmıştır.

Ortamda 0,1 mg/L vemurafenib olacak şekilde 5 mL'lik, kapaklı, konik, plastik bir tüpe stok çözeltiden gerekli miktar eklenmiştir. Tüpe 1 mL pH 7 fosfat tamponu ilave edilmiş, 200 µL ekstraksiyon çözgeni ve 800 µL dağıtıcı çözgen eklenip hacim 5000 µL olacak şekilde tuzlu su (%2, 4, 6, 8, 10) ile tamamlanmıştır. Sulu örnek (Şekil 1.3-I) içerisine dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözeltisi karışımı hızlı bir şekilde enjekte edilmiştir (Şekil 1.3-II). Örnek çözeltisine, bu şekilde yapılan enjeksiyon örnek içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün küçük damla formlarının oluşmasına neden olmuştur (Şekil 1.3-III). DLLME'de ekstraksiyon karışımının, sulu çözelti içinde ekstraksiyon çözücüsünün iyi damlacıklar oluşturmada dağıtıcı çözücü anahtar rol oynar. Hidrofobik bir madde olan vemurafenib, toplam sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilmiştir. Karışım vortekslenip sanrifüjlendiğinde küçük damlacıklar konik tüpün dibinde toplanmıştır (Şekil 1.3-IV). Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak, bir vial insert içine konulmuştur. Ardından 40°C'de çözücü buharlaştırılmıştır. Çözücü tamamen buharlaşınca, 100µL DMSO eklenip, DMSO nun iyice karışması sağlanıp HPLC ile ölçülmüştür.

Tuz eklemenin Vemurafenib'in DLLME verimine etkisi üzerine yapılan çalışmalara ait bulgular Bölüm 4.1.4.'te verilmiştir.

3.3.5. Sıcaklığın Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Ekstraksiyon verimi üzerindeki sıcaklık etkisi ekstraksiyon ve mikro ekstraksiyon tekniklerinde araştırılan diğer bir parametredir. DLLME'de, sıcaklığın artması,

ekstraksiyon verimliliğini artırabilir, azaltabilir veya ekstraksiyon verimliliği üzerinde dikkate değer bir etkiye sahip olmayabilir. Bunu anlayabilmek için denemeler farklı sıcaklıklarda (5 °C, 15 °C, 25 °C, 35 °C, 45 °C) çalışılarak sıcaklık etkisine bakılmıştır.

Öncelikle ortam sıcaklıklarını değiştirebilmek için su banyosu kullanılmıştır. Ortamda 0,1 mg/L vemurafenib olacak şekilde 5 mL'lik, kapaklı, konik, plastik bir tüpe stok çözeltiden gerekli miktar eklenmiştir. Tüpe (seçilen sıcaklıktaki su banyosunda bekleyen) pH 7 fosfat tamponundan 1mL ilave edilmiş, 200 µL ekstraksiyon çözgeni ve 800 µL dağıtıcı çözgen eklenip hacim 5000 µL olacak şekilde (seçilen sıcaklıktaki su banyosunda bekleyen) su ile tamamlanmıştır. Tüp, hızlıca vortekslenip, seçilen sıcaklıklarda hazırlanan su banyosu içinde çalkalanarak bekletilmiştir. Sulu örnek (Şekil 1.3-I) içerisine dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözeltisi karışımı hızlı bir şekilde enjekte edilmiştir (Şekil 1.3-II). Örnek çözeltisine, bu şekilde yapılan enjeksiyon örnek içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün küçük damla formlarının oluşmasına neden olmuştur (Şekil 1.3-III). DLLME'de ekstraksiyon karışımının, sulu çözelti içinde ekstraksiyon çözücüsünün iyi damlacıklar oluşturmasında dağıtıcı çözücü anahtar rol oynar. Hidrofobik bir madde olan vemurafenib, toplam sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilmiştir. Karışım santrifüjlendiğinde küçük damlacıklar konik tüpün dibinde toplanmıştır (Şekil 1.3-IV). Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak, bir vial insert içine konulmuştur. Ardından 40°C'de çözücü buharlaştırılmıştır. Çözücü tamamen buharlaşınca, 100µL DMSO eklenip, DMSO nun iyice karışması sağlanıp HPLC ile ölçülmüştür.

Sıcaklığın Vemurafenib'in DLLME verimine etkisi üzerine yapılan çalışmalara ait bulgular Bölüm 4.1.5.'te verilmiştir.

3.3.6. Santrifüj Hızının ve Süresinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Ekstraksiyon verimi üzerindeki santrifüj etkisi ekstraksiyon ve mikro ekstraksiyon tekniklerinde araştırılan diğer bir parametredir. Ekstraksiyon prosedürü gereği kullanılan santrifüjün optimum hızını ve süresini belirlemek için farklı hızlarda (1000, 1500, 2000, 3000, 4000 rpm) ve farklı sürelerde (1, 5, 10, 15 dk) santrifüj işlemi uygulanıp optimum koşullar belirlenmiştir.

Ortamda 0,1 mg/L vemurafenib olacak şekilde 5 mL'lik, kapaklı, konik, plastik bir tüpe stok çözeltiden gerekli miktar eklenmiştir. Tüpe pH 7 fosfat tamponundan 1mL ilave edilmiş, 200 µL ekstraksiyon çözgeni ve 800 µL dağıtıcı çözgen eklenip hacim 5000 µL olacak şekilde su ile tamamlanmıştır. Tüp, hızlıca vortekslenip, seçilen santrifüj hızı ve süresi koşullarında santrifüjlenmiştir. Sulu örnek (Şekil 1.3-I) içerisine dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözeltisi karışımı hızlı bir şekilde enjekte edilmiştir (Şekil 1.3-II). Örnek çözeltisine, bu şekilde yapılan enjeksiyon örnek içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün küçük damla formlarının oluşmasına neden olmuştur (Şekil 1.3-III). DLLME'de ekstraksiyon karışımının, sulu çözelti içinde ekstraksiyon çözücüsünün iyi damlacıklar oluşturmasında dağıtıcı çözücü anahtar rol oynar. Hidrofobik bir madde olan vemurafenib, toplam sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilmiştir. Karışım santrifüjlendiğinde küçük damlacıklar konik tüpün dibinde toplanmıştır (Şekil 1.3-IV). Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak, bir vial insert içine konulmuştur. Ardından 40°C'de çözücü buharlaştırılmıştır. Çözücü tamamen buharlaşınca, 100µL DMSO eklenip, DMSO nun iyice karışması sağlanıp HPLC ile ölçülmüştür.

Santrifüj hızı ve süresinin, Vemurafenib'in DLLME verimine etkisi üzerine yapılan çalışmalara ait bulgular Bölüm 4.1.6.'da verilmiştir.

3.3.7. Ekstraksiyon Süresinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Ekstraksiyon verimini etkileyen parametreler içinde ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon ve mikro ekstraksiyon tekniklerinde araştırılan diğer bir parametredir. Ekstraksiyon prosedürü sırasında optimum süreyi belirlemek için farklı sürelerde (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 dakika) çalkalayıcıda bekletilen tüpler, belirlenen süre sonunda vortekslenildikten sonra santrifüj işlemi uygulanıp optimum koşul belirlenmiştir.

Ortamda 0,1 mg/L vemurafenib olacak şekilde 5 mL'lik, kapaklı, konik, plastik bir tüpe stok çözeltiden gerekli miktar eklenmiştir. Tüpe pH 7 fosfat tamponundan 1mL ilave edilmiş, 200 µL ekstraksiyon çözgeni ve 800 µL dağıtıcı çözgen eklenip hacim 5000 µL olacak şekilde su ile tamamlanmıştır. Tüp, çalkalayıcıda belirli bir süre (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 dakika) bekletildikten sonra, hızlıca vortekslenip, seçilen santrifüj hızı ve süresi koşullarında santrifüjlenmiştir. Sulu örnek (Şekil 1.3-I)

içerisine dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözeltisi karışımı hızlı bir şekilde enjekte edilmiştir (Şekil 1.3-II). Örnek çözeltisine, bu şekilde yapılan enjeksiyon örnek içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün küçük damla formlarının oluşmasına neden olmuştur (Şekil 1.3-III). DLLME’de ekstraksiyon karışımının, sulu çözelti içinde ekstraksiyon çözücüsünün iyi damlacıklar oluşturmasında dağıtıcı çözücü anahtar rol oynar. Hidrofobik bir madde olan vemurafenib, toplam sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilmiştir. Karışım sanrifüjlendiğinde küçük damlacıklar konik tüpün dibinde toplanmıştır (Şekil 1.3-IV). Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak, bir vial insert içine konulmuştur. Ardından 40°C’de çözücü buharlaştırılmıştır. Çözücü tamamen buharlaşınca, 100µL DMSO eklenip, DMSO nun iyice karışması sağlanıp HPLC ile ölçülmüştür.

Ekstraksiyon süresinin, Vemurafenib’in DLLME verimine etkisi üzerine yapılan çalışmalara ait bulgular Bölüm 4.1.7.’de verilmiştir.

3.4. Optimize Edilen Metodun Yapay İdrar Numunesine Uygulanması

Optimize edilen yöntemin uygulaması için iki farklı yapay idrar numunesi hazırlanmıştır. 1 nolu yapay idrar numunesi, Pickering Laboratuvarları tarafından hazırlanıp satılan ürünün içeriğine göre hazırlanmıştır. 2 nolu idrar numunesi ise, insan idrarında bulunan içeriğe göre birçok kaynakta belirtilen değerler incelenip hazırlanmıştır.

Optimize edilen metodun yapay idrar numunesine uygulanmasına dair yapılan çalışmalara ait bulgular Bölüm 4.2.’de verilmiştir.

3.4.1. 1 Nolu Yapay İdrar Numunesinin Hazırlanması

Bu yapay idrar numunesi Pickering Laboratuvarında üretilen ve satışa sunulan sentetik idrar değerlerine göre hazırlanmıştır. Pickering Laboratuvarı’nın ürünü olan yapay idrar numunesi için, Çizelge 3.2’ de verilen bileşen derişimlerinde maddeler tartılıp 1 litrelik balonjojeye konulmuş, üzeri saf su ile tamamlanmıştır.

Çizelge 3.2. Pickering Laboratuvarı DIN EN 1616:1999 yapay idrar örneği

	Bileşen derişimi (g/L)
Üre	25
Sodyum klorür	9,0
Disodyum hidrojen ortofosfat, anhidrat	2,5
Potasyum dihidrojen ortofosfat	2,5
Amonyum klorür	3,0
Kreatinin	2,0
Sodyum sülfid, hidrat	3,0

1 nolu yapay idrar numunesi için optimum koşullarda uygulanan DLLME sonrasında elde edilen bulgular Bölüm 4.2’de, sonuç değerler Çizelge4.10 ve Şekil4.9’da görülmektedir.

3.4.2. 2 Nolu Yapay İdrar Numunesinin Hazırlanması

Bu konuda yayınlanmış birçok kaynak incelenmiş verilen tüm değerler bir tabloda (Çizelge 3.3.) birleştirilmiştir. Çizelgede, kaynaklardan direkt olarak alınan değerler ve g/L’ye çevrilmiş değerler birlikte verilmiştir. Bazı kaynaklarda 1 günde toplanan idrar miktarı içindeki değerler g/gün ya da mol/gün olarak yazılmıştır. Bu değerleri g/L’ye çevirme işlemi, günde ortalama kaç litre idrar üretimi olduğu dikkate alınarak yapılmıştır.

Çizelge 3.3. İnsan idrarının yayınlarda belirtilen bileşenleri

KAYNAKLAR	(1*)	(2*)	(3*) (0,5-2L idrar/gün) Ortalama 1,25 litre	(4*)	(5*) (1-2 L idrar/gün) Ortalama 1, 5 litre	(6*)	(7*)	(8*)	(9*) /gün (0,5-2L idrar/gün) Ortalama 1,25 litre	(10*)**	(11*)
SU	950 g/L	950 g/L			%90-95	%95,6			%96		
g/L	950 g/L	950 g/L			900-950 g/L	956 g/L			960 g/L		
ÜRE(CH ₄ N ₂ O)	9,3 g/L	(9,3- 23,3 g/L)	20-35 g/gün	9,3- 23,3 g/L	20-30 g/gün	14,23 g/L	17,3 g	<35 g/L	15-20 g/gün		17 g/L
g/L	9,3 g/L	9,3- 23,3 g/L	16-28 g/L	9,3- 23,3 g/L	13,3-20 g/L	14,23 g/L	17,3 g	<35 g/L	12-16 g/L		17 g/L
ÜRİK ASİT (C ₅ H ₄ O ₃ N ₄)		0,3 g/L	0,3- 2,0g/gün	0,04- 0,67 g/L	0,6-1 g/gün	0,37 g/L			0,3- 2,0g/gün	119-380 µmol/L	

Çizelge 3.3. İnsan idrarının yayınlarda belirtilen bileşenleri (devam)

g/L		0,3 g/L	0,24-1,6 g/L	0,04- 0,67 g/L	0,4-0,67 g/L	0,37 g/L			0,24- 1,6g/L	0,02 0,06 g/L	
KLORÜR(Cl⁻)	1,87 g/L	1,87- 8,4 g/L	120-240 mmol/gün	1,87- 8,4 g/L					6-10 g/gün	98-112 mmol/L	9,60 g/L
g/L	1,87 g/L	1,87- 8,4 g/L	3,41-6,82 g/L	1,87- 8,4 g/L					4,8-8 g/L	3,48- 3,98 g/L	9,60 g/L
SÜLFAT(SO₄²⁻) (MA:96)		1,8 g/L	30-60 mmol/gün		1 g/gün				0,8 g/gün		1,35 g/L
		1,8 g/L	24-48 mmol/L		0,67 g/L				0,64 g/L		1,35 g/L
g/L		1,8 g/L	2,3-4,61 g/L		0,67 g/L				0,64 g/L		1,35 g/L
FOSFAT(PO₄³⁻) (MA:95)		1,2 g/L	10-40 mmol/gün		1 g/gün				1,2 g/gün	0,81- 1,29 mmol/L	
		1,2 g/L	8-32 mmol/L		0,67 g/L				0,96 g/L	0,81- 1,29 mmol/L	

Çizelge 3.3. İnsan idrarının yayınlarda belirtilen bileşenleri (devam)

POTASYUM KLORÜR (KCl) (MA: 74,5)				1,641 mg/L			2,8g				
g/L				0,0016 g/L			2,8g				
KALSİYUM KLORÜR (CaCl₂) (MA: 110,98)							0,6 g				
POTASYUM SÜLFAT (K₂SO₄) (MA: 174,26)				2,632 mg/L							
g/L				0,0026 3 g/L							
MAGNEZYUM SÜLFAT (MgSO₄) (MA: 120)				789 mg/L			0,43 g				
g/L				0,789 g/L			0,43 g				
MAGNEZYUM KARBONAT (MgCO₃)				143 mg/L							

Çizelge 3.3. İnsan idrarının yayınlarda belirtilen bileşenleri (devam)

POTASYUM BİKARBONAT (KHCO₃)				661 mg/L							
POTASYUM FOSEFAT (K₃PO₄)				234 mg/L							
KALSİYUM FOSEFAT (Ca₃(PO₄)₂)				32 mg/L							
FOSFORİK ASİT (H₃PO₄)						2,12 mL/L					
SÜLFİRİK ASİT (H₂SO₄)						1,70 mL/L					
TOTAL FOSFOR (P)				0,47- 1,07							
İNORGANİK SÜLFÜR (S)		0,163- 1,80		0,163- 1,80	0,1 g/gün						
HİPPÜRİK ASİT			0,15g	0,05- 1,670					0,6 g/gün		
SİTRİK ASİT				0,09- 0,93							
GLUKURONİK ASİT (C₆H₁₀O₇)				0,07- 0,88							
AMONYUM (NH₄⁺) (MA: 18)			30-50 mmol							<50 mmol/g ün	

Çizelge 3.3. İnsan idrarının yayınlarda belirtilen bileşenleri (devam)

g/L			0,54-0,9 g							< 0,9 g/L	
AMONYAK (NH₃) (MA: 17)		0,5 g/L		0,2-0,73 mL	0,5-0,5 g/gün		1,9 mL		0,7 g/gün		
		0,5 g/L		0,2-0,73 mL	0,33 g/L		1,9 mL		0,56 g/L		
mL/L		0,55 mL/L		0,2-0,73 mL	0,37 mL/L		1,9 mL		0,62 mL/L		
KREATİN (HN:C(NH₂)N(CH₃).CH₂.CO₂H.H₂O			0,05-0,10 g	0-0,53					0,05-0,10 g erkeklerde çok az		
KREATİNİN (C₄H₇N₃O)	0,67 0 g/L	1 g/L (0,670 -2,15)	1-1,5 g	0,67-2,15	1,33 g/L (erkek) 0,67 g/L (kadın)			<300mg/g (kadın) <128mg/g (erkek)	0,4-0,8 g/L	20-100 µmol/L	

Çizelge 3.3. İnsan idrarının yayınlarda belirtilen bileşenleri (devam)

g/L	0,67 g/L	1 g/L	0,8-1,2 g/L	0,67- 2,15	1,33 g/L (erkek) 0,67 g/L (kadın)			<0,3 g/g (kadın) <0,128 g/g (erkek)	0,4-0,8 g/L	0,002- 0,011 g/L	
pH			(4,8-7,5)		5,5-6,5			4,5-8,00	4,8-7,0	5,8-7,0	

** Bir insan için günlük idrar miktarı belirtilmediği için diğer kaynaklara bakarak yaklaşık 1,25 litre varsayarak birimler /gün'den /L'ye dönüştürülmüştür.

(1*) Gordon, E., 2019

(7*)<http://docplayer.net/52958387-Exercise-11-macroscopic-and-chemical-examination-of-urine.html>

(2*) Helmenstine, A.M., 2019

(8*) Kasap Demir, B., 2016

(3*) Baig, A., 2011

(9*) Altınışık, M., 2017

(4*) Putnam, D.F., 1971

(10*) İpekçi, T. ve ark, 2015

(5*) Sa, D.J. 2015

(11*) Stolarz, A., ve ark, 2005

(6*) Smith, E.F. ve Marshall, J., 1881

Yukarıdaki Çizelge 3.3, insan idrarı bileşenleri ve miktarlarının yayınlandığı çeşitli kaynaklardan elde edilen bilgilerle hazırlanmıştır. Bu bilgiler incelenmiş ve 2 nolu yapay idrar numunesine eklenecek kimyasallar ve miktarları karar verilmiştir. Hazırlanan 2 nolu yapay idrar numunesi için kullanılacak kimyasallara ve miktarlarına hangi yollarla karar verildiği aşağıdaki Çizelge 3.4.'te açıklanmaktadır.

Çizelge 3.4. 2 nolu yapay idrar numunesi için içerik ve miktar belirlenmesinde izlenen yol

İÇERİK	BELİRLENEN MİKTAR VE NASIL BELİRLENDİĞİ
SU	2 nolu yapay idrar numunesini hazırlarken kullanılacak tüm kimyasalların miktarı belirlendikten sonra 100 g idrar numunesi hazırlamak için gereken su miktarının yüzde olarak hesapmalası ~ % 96'dır.
ÜRE (CH₄N₂O)	Üre miktarı genelde belirli bir derişim aralığı şeklinde verilmiştir. Gerek kaynaklarda verilen referans aralıklara bakılarak gerekse en sık rastlanan değere bakılarak değerlendirildiğinde. En düşük ve en yüksek aralıklar dikkate alındığında ortalama alınması sonucu çıkan rakam, çok tekrar eden sayı (20 g/L) ile birbirine çok yakındır. Bu bilgiler dikkate alınarak kullanılacak miktar 20 g/L olarak karar verilmiştir.
ÜRİK ASİT (C₅H₄O₃N₄)	2.kaynakta verilen 0,30 gram/L değeri diğer birçok kaynaktaki referans aralık değerlerinin de içinde olduğu için 0,30 g/L, kullanılacak ürik asit miktarı olarak belirlenmiştir.
Na⁺	Na ⁺ miktarı belirlenirken belirli bir aralık için belirtilen değerlere sahip kaynaklar dikkate alınmıştır. Bu yaklaşımla 1,2,6,11 nolu kaynaklar tek değer belirttiği için elenmiştir. 10 nolu kaynakta aralık olarak verilen değerlerin birbirine olan yakınlığından dolayı tek bir değermiş gibi değerlendirilip diğer kaynaklar gibi elenmiştir. 3. ve 4. kaynaklar için verilen değerlerin ortalaması alındığında ise elde edilen değer olan 2,51 g/L eklenecek olan Na ⁺ için belirlenen değer oluşturun. Daha önceden hazırlanan 1 nolu yapay idrar numunesin NaCl'den gelen Na ⁺ miktarı daha yüksek olduğu ve sonuçların oldukça iyi çıktığı, herhangi bir girişim gözlenmediği için 2 nolu yapay idrar numunesi için düşük miktar Na ⁺ seçilmesinde bir sakınca görülmemiştir

Çizelge 3.4. 2 nolu yapay idrar numunesi için içerik ve miktar belirlenmesinde izlenen yol (devam)

SODYUM KLORÜR (NaCl)	Na⁺ miktarının belirlenmesinin ardından tablodaki idrar içeriğindeki bileşenlere bakıldığında suda çözünmesi sonucu ortama Na⁺ iyonu verecek kimyasal olarak NaCl kullanılması kararına varılmıştır Yapay idrar numunesine eklenecek NaCl miktarı incelenirken Na⁺ ve Cl⁻ miktarları birlikte incelenmiştir. Kimi kaynaklar NaCl miktarı şeklinde belirtirken kimi kaynaklar da sudaki iyon hallerinde yani Na⁺ ve Cl⁻ şeklinde miktarlarını iyon derişimleri şeklinde ayrı ayrı vermiştir. Fakat tabloda belirtilen Cl⁻ iyonlarının tamamı NaCl'ye ait değildir. Örneğin; idrar numunesinde bulunan NaCl de, KCl ve CaCl₂ gibi, Cl⁻ iyonlarını içerdiği için bu kimyasalların miktarları belirlenirken hem içerdikleri toplam Cl⁻, belirlenen değer kadar içermeli hem de Na⁺ miktarı karar verilen Na⁺ miktarı kadar içermelidir. Bunları göz önünde bulundurarak miktarlar belirlenmiştir. 2,51 g/L Na⁺ iyonu içeren NaCl miktarı hesaplandığında 6,37 g/L olarak bulunmuş, tartılmış ve 2 nolu yapay idrar numunesini hazırlamak için sulu çözeltiye diğer maddelerle birlikte eklenmiştir.
K⁺	8 nolu kaynakta belirtilen değer diğer kaynaktakilere göre aşırı yüksek olduğu için hesaplamalara dâhil edilmemiştir. Geri kalan tüm değerlerin ortalaması alındığında çıkan sonuç olan 1,41 g/L'dir. 0,75 g/L ve altındaki değerler hesaba katılmadan ortalama alındığında ise çıkan sonuç 2,22 g/L'dir. Ortama K⁺ iyonu sağlaması için KCl ve K₂SO₄ kullanılmıştır. Bu bileşenler için kullanılacak miktar belirlenirken KCl için hem K⁺ hem de Cl⁻ için limit değerler arasında kalacak bir miktar olmasına dikkat edilmiştir.

Çizelge 3.4. 2 nolu yapay idrar numunesi için içerik ve miktar belirlenmesinde izlenen yol (devam)

K⁺	Aynı şekilde K ₂ SO ₄ için de hem K ⁺ hem de SO ₄ ²⁻ için verilen değerler arasında kalacak bir miktar seçilmiştir. Buna göre,yapılan hesaplamalar sonucu kullanılan K ⁺ miktarı, KCl'den 0,86 g/L, K ₂ SO ₄ 'den 1,17 g/L, toplamda 2,03 g/L olarak belirlenmiştir.
POTASYUM KLORÜR (KCl)	2 nolu yapay idrar numunesine eklenecek optimum KCl miktarı belirlenirken de NaCl miktarı için yapılan matematiksel hesaplar aynen uygulanmıştır. KCl miktarı için yayınlardaki aralık 1,64-2,8 g/L şeklindedir. İyonları için baktığımızda K ⁺ için 0,20-2,61 g/L, Cl ⁻ için 1,87-9,60 g/L olarak görülmektedir. Bu aralıklar dikkate alınarak bu iyonları içeren diğer kimyasalların da ekleneceği düşünülerek eklenecek miktar 1,64 g/L olarak seçilmiştir.
Ca²⁺	Yapay idrar numunesinin içereceği Ca ²⁺ miktarını belirlerken kaynaklar incelendiğinde 1 nolu kaynakta verilen değer olan 0,15 g/L, aralık şeklinde değerler olarak verilen 2 ve 3 nolu kaynakların referans aralığı içinde yer alıyor olarak görülmektedir. Bu nedenden dolayı kullanılacak Ca ²⁺ miktarı 0,15 g/L şeklinde belirlenmiş olup Ca ²⁺ kaynağı olarak CaCl ₂ kullanılmıştır.
KALSİYUM KLORÜR (CaCl₂)	Ca ²⁺ kaynağı olarak CaCl ₂ kullanıldığı için miktarı belirlenirken de belirlenen Ca ²⁺ iyon değerini içerecek şekilde hesaplama yapılmıştır. Cl ⁻ derişim değerleri toplamı Cl ⁻ derişim aralığı içinde olacak miktar için gerekli hesaplamalar yapıldığında değer yaklaşık olarak 0,44 g/L olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.4. 2 nolu yapay idrar numunesi için içerik ve miktar belirlenmesinde izlenen yol (devam)

AMONYUM KLORÜR (NH₄Cl)	Na⁺ miktarının belirlenmesinin ardından suda çözünmesi sonucu ortama Na⁺ iyonu verecek kimyasal olarak kaç g/L NaCl kullanılacağı kararına varılmıştır. Bu şekilde düşünerek, Na⁺ miktarı belirlendikten sonra eklenecek NaCl miktarı, K⁺ miktarı belirlendikten sonra eklenecek KCl miktarı, Ca²⁺ miktarı belirlendikten sonra eklenen CaCl₂ miktarı belirlendikten ve bu bileşikler yapay idrar numunesi hazırlamak için eklendikten sonra ortamdaki toplam Cl⁻ miktarı hesaplanmıştır. Eksik kalan Cl⁻ miktarını tamamlamak için 1 nolu idrar numunesinin de içeriğinin incelenmesi üzerine NH₄Cl şeklinde eklenmesi uygun bulunmuştur. Yukarıdaki Cl⁻ içeren tüm kimyasalların miktarı belirlenince arda kalan Cl⁻ miktarı ve NH₄Cl'den gelecek NH₄⁺'ün de 3. Ve 10. kaynakta verilen derişim aralığı koşulunu sağlayacak şekilde 0,52 g/L olarak hesaplanır.
Cl⁻	Cl⁻ iyonunu içeren birçok bileşen olduğu için kullanılacak miktar belirlenirken 4g/L ve altındaki değerler hesaplamaya dâhil edilmemiştir. Geri kalan değerlerin ortalaması alındığında çıkan sayı 7,67 g/L olmuştur. Yani yaklaşık olarak eklenecek Cl⁻ miktarı 7,67 g/L ile en yüksek limit olan 9,60 g/L değeri arasında bir değer seçilmesi uygun görüşmüştür. Yapay idrar numunesi hazırlanırken kullanılan Cl⁻ miktarını bulmak için tartılan NaCl, KCl ve CaCl₂ ve NH₄Cl bileşenlerinin içerdikleri toplam Cl⁻ hesaplandığında çıkan sonuç 7,84 g/L olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.4. 2 nolu yapay idrar numunesi için içerik ve miktar belirlenmesinde izlenen yol (devam)

Mg²⁺	Mg ²⁺ miktarı belirlenirken 2, 3, 4, 11 nolu kaynaklarda verilen değerler dikkate alınmıştır. Bu kaynaklardan verilen değerlerin ortalaması alınarak, yapay idrar numunesindeki kullanılacak Mg ²⁺ miktarı belirlenmiştir. 9 ve 10 nolu kaynaklar için verilen Mg ²⁺ miktarı g/gün olarak geçmektedir fakat günde kaç mL idrar numunesi baz alınarak hazırlanmış tam olarak kaç litre idrar için olduğu belirtilmemiş olmasından dolayı bu kaynak elenmiştir. 6 nolu kaynaktaki değer diğer kaynaklarda verilen değerlere göre aşırı düşük olduğu için elenmiştir. Bu gibi durumlar incelendiğinde 2., 3., 4. ve 11. kaynaklar için verilen değerlerin ortalaması alınarak, kullanılacak olan Mg ²⁺ miktarı belirlenmiştir. Ortalamaları alındığında ise elde edilen değer olan 1,19 g/L eklenecek olan Mg ²⁺ için belirlenen değer oluştur. 2 nolu yapay idrar numunesini hazırlamak için sulu çözeltiye diğer maddelerle birlikte eklenmiştir.
SO₄²⁻	Verilen kaynaklar incelendiğinde SO ₄ ²⁻ için en düşük değer 0,64 g/L, en yüksek değer de 4,61 g/L ve tüm değerlerin ortalaması 1,90 g/L olarak gözlemlenmiştir. SO ₄ ²⁻ kaynağı olarak K ₂ SO ₄ ve MgSO ₄ kullanılmak üzere gereken hesaplamalar yapıldığında ve SO ₄ ²⁻ miktarları toplandığında çizelgedeki değerler arasında kalan miktar olan 2,21 g/L değerine karar verilmiştir.
MAGNEZYU M SÜLFAT (MgSO₄)	Mg ²⁺ kaynağı olarak seçilen MgSO ₄ , Çizelgedeki verilen Mg ²⁺ ve SO ₄ ²⁻ derişimlerini karşılayacak ve K ₂ SO ₄ ' deki SO ₄ ²⁻ miktarının da dâhil olacağını düşünüp yapılan hesaplamalar sonucu miktar 0,99 g/L olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. 2 nolu yapay idrar numunesi için içerik ve miktar belirlenmesinde izlenen yol (devam)

POTASYUM SÜLFAT (K₂SO₄)	Yapay idrar numunesi hazırlandığında ortamdaki K ⁺ , KCl'den gelecek olan miktar da düşünülerek ve SO ₄ ²⁻ iyon derişimi de MgSO ₄ ' den gelecek olan değer de düşünülüp aralığı da sağlayacak şekilde yapılan hesaplamalar sonucu kullanılacak miktar 2,61 g/L olarak belirlenmiştir.
AMONYAK (NH₃)	Kaynaklarda verilen değerler incelendiğinde 7 nolu kaynaktaki değer diğer kaynaklarda verilen değerlere göre aşırı yüksek olduğu için elenmiştir. Diğer kaynaklarda verilen NH ₃ miktarları ortalaması alınması sonucu kullanılacak amonyak miktarı 0,49 mL/L olarak bulunmuştur.
KREATİNİN (C₄H₇N₃O)	Kaynaklardaki değerlere bakıldığında kullanılacak kreatinin miktarı, en sık rastlanan değer olan 0,67 g/L olarak belirlenmiştir.
DİĞER	Sayıca az kaynakta verilmiş değerler olmasından dolayı diğer içerikler 2 nolu yapay idrar numunesi için kullanılmamıştır.
pH	Tüm hesaplamalar sonucu çözelti hazırlanmak üzere eklenen kimyasallar sonunda ölçülen pH 6,45 olarak bulunmuştur. Bu değer kaynaklarda belirtilen pH aralığı içinde yer aldığı için pH ayarı için ekstra bir kimyasal kullanılmamıştır.

Bu bilgiler göz önünde bulundurularak hazırlanan 2. yapay idrar numunesi için içerik ve derişimler Çizelge 3.5' te verilmiştir.

Çizelge 3.5. 2 nolu yapay idrar içeriği

İÇERİK	DERİŞİM
SU	~% 96
ÜRE($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)	20 g/L
ÜRİK ASİT($\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_3\text{N}_4$)	0,30 g/L
SODYUM KLORÜR(NaCl)	6,37 g/L
POTASYUM KLORÜR(KCl)	1,64 g/L
KALSİYUM KLORÜR(CaCl_2)	0,44 g/L
POTASYUM SÜLFAT (K_2SO_4)	2,61 g/L
MAGNEZYUM SÜLFAT(MgSO_4)	0,99 g/L
AMONYUM KLORÜR(NH_4Cl)	0,52 g/L
AMONYAK(NH_3)	0,49 mL/L
KREATİNİN ($\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$)	0,67 g/L
pH	6,45

Metot validasyon çalışmaları dâhilinde 3000 μL yapay idrar numunesine ortamda 0,02, 0,1 ve 0,2 mg/L vemurafenib olacak şekilde 5 mL'lik, kapaklı, konik, plastik bir tüpe vemurafenib stok çözeltisinden gerekli miktar eklenmiştir. Tüpe pH 7 fosfat tamponundan 1mL ilave edilmiş, 200 μL ekstraksiyon çözgeni ve 800 μL dağıtıcı çözgen eklenip hacim 5000 μL 'ye tamamlanmıştır. Tüp, çalkalayıcıda 30 dk bekletildikten sonra, hızlıca vortekslenip, seçilen santrifüj hızı ve süresi koşullarında santrifüjlenmiştir. Sulu çözelti (Şekil 1.3 - I) içerisine dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözeltisi karışımı hızlı bir şekilde enjekte edilmiştir (Şekil 1.3-II). Örneğe, bu şekil yapılan enjeksiyon örnek içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün küçük damlaların oluşmasına neden olmuştur (Şekil 1.3-III). DLLME'de ekstraksiyon karışımının, sulu çözeltiye ekstraksiyon çözücüsünün iyi damlacıklar oluşturmasında dağıtıcı çözücü anahtar rol oynar. Hidrofobik bir madde olan vemurafenib, toplam sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilmiştir. Karışım santrifüjlendiğinde küçük damlacıklar konik tüpün dibinde toplanmıştır (Şekil 1.3-IV). Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon

çözücüsü, mikroenjektörle alınarak, bir vialinsert içine konulmuştur. Ardından 40°C’de çözücü buharlaştırılmıştır. Çözücü tamamen buharlaşınca, 100µL DMSO eklenip, DMSO nun iyice karışması sağlanıp HPLC ile ölçülmüştür.

2 nolu yapay idrar numunesi için optimum koşullarda uygulanan DLLME sonrasında elde edilen bulgular Bölüm 4.2’de, analiz sonuçları Çizelge 4.11 ve Şekil4.10’da verilmiştir.

3.5. Optimize Edilen Metodun Çeşme Suyu Numunesine Uygulanması

Optimize edilen metodun uygulaması için diğer bir matris olarak Adnan Menderes Üniversitesi Analitik Kimya Laboratuvarı’nın musluğundan akan su numunesi kullanılmıştır.

Metot validasyon çalışmaları dâhilinde 3000 µL musluk suyu numunesine ortamda 0,02, 0,1 ve 0,2 mg/L vemurafenib olacak şekilde 5 mL’lik, kapaklı, konik, plastik bir tüpe vemurafenib stok çözeltisinden gerekli miktar eklenmiştir. Tüpe pH 7 fosfat tamponundan 1mL ilave edilmiş, 200 µL ekstraksiyon çözgeni ve 800 µL dağıtıcı çözgen eklenip hacim 5000 µL’ye tamamlanmıştır. Tüp, çalkalayıcıda 30 dk bekletildikten sonra, hızlıca vortekslenip, seçilen santrifüj hızı ve süresi koşullarında santrifüjlenmiştir. Sulu örnek (Şekil 1.3-I) içerisine dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözeltisi karışımı hızlı bir şekilde enjekte edilmiştir (Şekil 1.3-II). Örnek çözeltisine, bu şekilde yapılan enjeksiyon örnek içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün küçük damla formlarının oluşmasına neden olmuştur (Şekil 1.3-III). DLLME’de ekstraksiyon karışımının, sulu çözelti içinde ekstraksiyon çözücüsünün iyi damlacıklar oluşturmasında dağıtıcı çözücü anahtar rol oynar. Hidrofobik bir madde olan vemurafenib, toplam sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilmiştir. Karışım santrifüjlendiğinde küçük damlacıklar konik tüpün dibinde toplanmıştır (Şekil 1.3-IV). Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak, bir vial insert içine konulmuştur. Ardından 40°C’de çözücü buharlaştırılmıştır. Çözücü tamamen buharlaşınca, 100µL DMSO eklenip, DMSO nun iyice karışması sağlanıp HPLC ile ölçülmüştür.

Çeşme suyu numunesi için optimum koşullarda uygulanan DLLME sonrasında elde edilen bulgular Bölüm 4.3'te, veriler Çizelge 4.12 ve Şekil 4.11'de bildirilmiştir.

3.6. Metodun Validasyonu

Validasyon, bir metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun belirlenmesi için, metod parametrelerinin belirlenerek incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır.

Vemurafenib metodu validasyonu için incelenen performans kriterleri; seçicilik, LOD (Tespit Limiti), LOQ (Tayin Limiti), ölçüm aralığı ve linearite, doğruluk (geri kazanım) ve kesinlik (tekrarlanabilirlik-tekrar üretilebilirlik) parametrelerinden oluşmaktadır.

Bu kapsamda validasyon çalışmaları için kullanılan matrisler yapay idrar ve çeşme suyudur.

Yapılan denemeler sonucunda elde edilen verilere göre metod uygunluk açısından değerlendirilip bulunanlar Bölüm 4.4'te verilmiştir.

3.6.1. Seçicilik

Seçiciliğin belirlenebilmesi için öncelikle Vemurafenib içermeyen kör numune HPLC cihazında 249nm'de ölçülmüştür. Aranılan analit (1 mg/L Vemurafenib) eklenerek kromatogramların incelenmesi sonucu girişim oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir.

Seçicilik parametresi için elde edilen bulgular Bölüm 4.4.1'de verilmiştir.

3.6.2. LOD ve LOQ

LOD ve LOQ çalışmaları için, *Vemurafenib* içeren standart karışımından ölçüm sonucu 1,00 mg/L olacak şekilde hazırlanan spike numuneleri kullanılmış ve 10 kez ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçümlerin standart sapması 3 ile çarpılarak LOD'nin ve 10 ile çarpılarak LOQ'nun sayısal değeri belirlenmiştir.

LOD ve LOQ çalışmalarına ait veriler Bölüm 4.4.2’de verilmiştir.

3.6.3. Ölçüm Aralığı ve Doğrusallık

Kalibrasyon eğrisini çizmek için, metotta belirtilen standart çözelti ile 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 mg/L *Vemurafenib* içeren çözeltiler hazırlanıp değerler HPLC’de okunmuştur. Toplam 6 farklı düzeyde hazırlanan numunelerin HPLC’ye enjeksiyonuyla elde edilen analiz sonuçları ile MS Excel programından yararlanılıp kalibrasyon eğrisi grafiği çizilmiş ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Doğrusallığın belirlenmesi için ANOVA regresyon analizi kullanılmış ve F-testi yapılmıştır. *Vemurafenib*’e ait kalibrasyon eğrisi, cihazdan her bir derişim için okunan sonuçların kalibrasyon eğrisi denklemi ile hesaplanarak olması gereken derişimlere karşı grafik oluşturulmuştur.

Ölçüm aralığını ve doğrusallık çalışmalarına ait bulgular Bölüm 4.4.3’te verilmiştir.

3.6.4. Doğruluk (Geri Kazanım)

Geri kazanımı hesaplamak için, çalışılan matrislerde (1 nolu yapay idrar, 2 nolu yapay idrar ve musluk suyu), çalışma aralığına giren üç farklı derişimde (1,0; 5,0; 10,0 mg/L) ve her bir derişim için 3’er adet olmak üzere; *Vemurafenib* eklenmiş idrar numuneleri hazırlanarak aynı günde analiz edilmiştir. Veriler, hazırlanan kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan sistematik hatanın gerçek değerle arasında önemli bir farkının bulunup bulunmadığı t- testi yapılarak kontrol edilmiştir.

Doğruluk (geri kazanım) çalışmalarına ait bulgular Bölüm 4.4.4’te verilmiştir.

3.6.5. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik-Tekrar Üretilirlik)

Kesinlik çalışmaları için, üç farklı derişimde (1,0; 5,0; 10,0 mg/L) *vemurafenib* eklenerek her bir derişim için 5’er adet hazırlanan numunelerin aynı günde analiz edilmesiyle veriler elde edilmiştir. Bu veriler kullanılarak hesaplanan %RSD değerleri yöntemin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için kullanılmıştır.

Kesinlik (tekrarlanabilirlik-tekrar üretilebilirlik) çalışmalarına ait bulgular Bölüm 4.4.5’te verilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Vemurafenib Tayini İçin Optimizasyon Çalışmaları

Vemurafenib tayini için optimizasyon çalışmaları yapılırken ekstraksiyon veriminin en yüksek olduğu şartlar seçilmiştir. Bu optimum şartları belirlemek için ekstraksiyon çözücüsünün seçimi ve hacmi, dağıtıcı çözücü seçimi ve hacmi, pH'ın, tuz eklemenin ekstraksiyona etkisi, sıcaklığın belirlenmesi, santrifüj hızının ve süresinin, ekstraksiyon süresinin belirlenmesi gibi parametreler incelenmiş sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü ve Dağıtıcı Çözücü Seçimi

Optimum koşullar belirlenirken ekstraksiyon çözücüsü olarak 1,2-dikloroetan (DKE), Kloroform (K), Diklorometan (DKM), Klorobenzen (KB) ile çalışırken, dağıtıcı çözücü olarak Aseton (A), Etanol (E), Asetonitril (ACN) ve Metanol (M) kullanılmıştır.

DKM ile yapılan denemelerde ekstraksiyon çözücüsünün fazla miktarlarının harcanmasından, ekstraksiyon sırasında bulutlanmanın olmamasından, ekstraksiyon veriminin düşük olmasından dolayı DKM ekstraksiyon çözücüsü olarak uygun bulunmamıştır. Bu nedenle bu aşamada yapılan denemelere DKM dâhil edilmemiştir.

0,05 mg/L başlangıç derişimindeki Vemurafenib'in DLLME yöntemi ile önderiştirilmesi sonucu 5,00 mL'lik örnek hacminden 100 µL'lik hacme deriştirilmesi ile 50 kat derişik hale gelmesi beklenir. Bu durumda 0,05 mg/L olan Vemurafenib derişiminin DLLME yöntemiyle önderiştirme sonrası HPLC cihazında okuma işlemi sonucu elde edilecek Vemurafenib derişiminin 2,50 mg/L olması beklenir.

DLLME sonrasında 2,50 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in farklı dağıtıcı ve ekstraksiyon çözücüsü türleri kullanılarak yapılan DLLME yöntemi sonrasında ölçülen derişimleri ve % geri kazanım için sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Elde edilen % geri kazanım değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmış şekli grafiksel olarak

Şekil 4.1.'de ve ekstraksiyon sırasında oluşan bulanıklıklar Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı dağıtıcı ve ekstraksiyon çözücüsü kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 2,50 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve % geri kazanım değerleri

Ekstraksiyon Çözücüsü	Dağıtıcı Çözücü	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L)	%Geri Kazanım
DKE	A	2,50±0,39	99,87
DKE	E	2,72±0,12	108,88
DKE	ACN	2,31±0,38	92, 24
DKE	M	2,93±0,52	117,35

KB	A	2,85±0,21	114,10
KB	E	2,93±0,86	117,11
KB	ACN	3,98±0,96	159,26
KB	M	6,24±1,56	249,61

K	A	2,56±0,26	102,48
K	E	2,18±0,32	87,02
K	ACN	3,18±1,06	127,40
K	M	2,23±0,41	89,04

DKE: 1,2-dikloroetan

KB: Klorobenzen

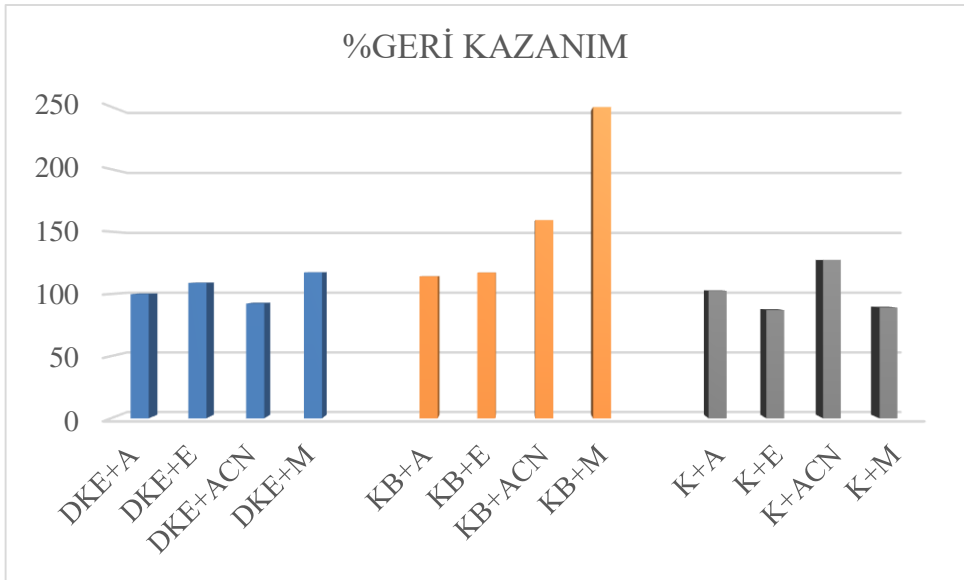
K: Kloroform

A: Aseton

E: Etanol

ACN: Asetonitril

M: Metanol



Şekil 4.1. Farklı dağıtıcı ve ekstraksiyon çözütüsü kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 2,50 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in % geri kazanım değerleri üzerine etkisi

Çizelge 4.2. Denemelerde ekstraksiyon sırasında oluşan bulanıklıklar

	1. DENEME	2. DENEME	3. DENEME	4. DENEME	5. DENEME
DKE+A	-	-	-	-	-
DKE+E	+	+	+	+	+
DKE+ACN	+	⌘	⌘	-	-
DKE+M	-	+	⌘	⌘	⌘

Çizelge 4.2. Denemelerde ekstraksiyon sırasında oluşan bulanıklıklar (devam)

K+A	×	×	×	×	×
K+E	-	×	-	+	×
K+ACN	×	-	×	-	-
K+M	×	×	-	+	×

DKM+A	-	-	-	-	-
DKM+E	-	-	-	-	-
DKM+ACN	-	-	-	-	-
DKM+M	-	-	-	-	-

KB+A	×	×	-	×	+
KB+E	+	×	+	+	+
KB+ACN	×	×	×	×	×
KB+M	×	-	×	+	+

+: bulanık -: bulanık değil ×: az bulanık

İyi bir dağıtıcı çözücü, ekstraksiyon çözücüsünde çözünelmeli ve örnekteki çözücü ile tam karışarak sulu faz içerisinde ekstraksiyon çözücüsünü küçük damlacıklar halinde dağıtıp bulutlu çözelti oluşturmalıdır. Bu durum, sulu kısım ile ekstraksiyon çözücüsünün arasındaki büyük yüzey alanının temelini oluşturur, böylece ekstraksiyon verimliliği artırılabilir.

İyi bir ekstraksiyon çözücüsü, yoğunluğu sudan daha fazla olmalı ve santrifüjleme ile sulu fazdan kolaylıkla ayrılabilmesi, iyi kromatografik davranış sergilemelidir.

DKM ile yapılan denemelerde ekstraksiyon çözücüsünün fazla miktarlarının harcanmasından, ekstraksiyon sırasında bulutlanmanın olmamasından, ekstraksiyon veriminin düşük olmasından dolayı DKM ekstraksiyon çözücüsü olarak uygun bulunmamıştır. Bu nedenle DKM uygun bir ekstraksiyon çözgeni olarak seçilmemiştir.

KB ile yapılan denemelerde ekstraksiyon veriminin olması gerekenden çok daha fazla çıkmasından dolayı KB ekstraksiyon çözücüsü olarak uygun bulunmamaktadır. Bu nedenle KB de uygun bir ekstraksiyon çözgeni olarak seçilmemiştir.

K ile yapılan denemelerde dağıtıcı çözücü olarak asetonun kullanıldığı ekstraksiyonlarda ekstraksiyon verimleri oldukça yüksek bulunmuştur fakat kloroformun zehirli olması ve bulanıklığın az olması nedeniyle K da uygun bir ekstraksiyon çözgeni olarak seçilmemiştir.

Ekstraksiyon verimi, ekstraksiyon sırasında oluşan bulanıklıklar, piklerin oluşumu göz önüne alındığında **ekstraksiyon çözgeni olarak dikloroetan (DKE), dağıtıcı çözgen olarak etanol (E) seçilmiştir.**

4.1.2. Ekstraksiyon Çözgeni ve Dağıtıcı Çözgen Hacminin Belirlenmesi

Ekstraksiyon çözücü hacmi ekstraksiyon işleminde önemli bir parametredir. Ekstraksiyon çözücü hacmi arttıkça, santrifüjleme sonrası elde edilen sediment faz hacmi artar, bu durum, hedeflenen analitin organik fazdaki derişimini azaltır. Bununla birlikte, her ne kadar ekstraksiyon geri kazanımı sabit olsa da zenginleştirme faktörü düşer. Bu sonuç, hedeflenen bileşiklerin tayinindeki duyarlılığı düşürür. Bundan dolayı, uygun ekstraksiyon hacminin hem yüksek zenginleştirme faktörü için hem de santrifüj sonrasını takip eden tayin için yeterli miktarda olması gerekir.

Dağıtıcı çözücü hacminin değişmesi sediment faz hacmini değiştirir. Bu yüzden sabit sediment faz hacmi elde etmek için dispersif çözücü ve ekstraksiyon çözücüsünün hacimlerinin optimize edilmesi gerekir. İyi bir bulutlanma elde etmek, dispersif çözücünün hacmi, sulu faz ve ekstraksiyon çözücü hacimleri optimizasyonu ile ilgilidir

0,10 mg/L başlangıç derişimindeki Vemurafenib'in DLLME yöntemi ile önderştirilmesi sonucu 5,00 mL'lik örnek hacminden 100 µL'lik hacme derştirilmesi ile 50 kat derişik hale gelmesi beklenir. Bu durumda 0,10 mg/L olan Vemurafenib derişiminin DLLME yöntemiyle önderştirme sonrası HPLC cihazında okuma işlemi sonucu elde edilecek Vemurafenib derişiminin 5,00 mg/L olması beklenir.

DLLME sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in, farklı dağıtıcı ve ekstraksiyon çözücüsü miktarları kullanılarak yapılan DLLME yöntemi sonrasında ölçülen derişimleri ve % geri kazanımlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. Hesaplanan % geri kazanım değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmış şekli grafiksel olarak Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı dağıtıcı ve ekstraksiyon çözücü hacimlerinin kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve % geri kazanım değerleri

Dağıtıcı Çözücü Hacmi (µL)	Ekstraksiyon Çözücüsü Hacmi (µL)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L)	%Geri Kazanım
200	50	3,00±0,20	60,09
200	100	4,14±0,11	82,85
200	150	4,21±0,13	84,30
200	200	4,53±0,23	90,67

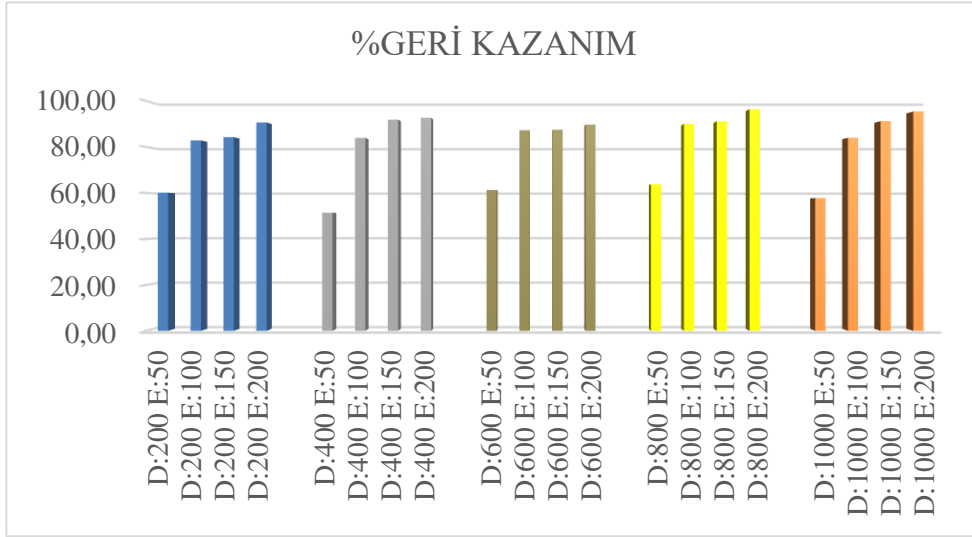
Çizelge 4.3. Farklı dağıtıcı ve ekstraksiyon çözücü hacimlerinin kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve % geri kazanım değerleri (devam)

400	50	2,57±0,19	51,37
400	100	4,20±0,12	83,95
400	150	4,60±0,15	91,92
400	200	4,64±0,23	92,72

600	50	3,06±0,40	61,24
600	100	4,37±0,31	87,31
600	150	4,38±0,14	87,51
600	200	4,49±0,21	89,76

800	50	3,19±0,43	63,75
800	100	4,50±0,22	90,06
800	150	4,56±0,16	91,17
800	200	4,82±0,08	96,48

1000	50	2,89±0,28	57,79
1000	100	4,20±0,15	84,00
1000	150	4,56±0,12	91,27
1000	200	4,77±0,10	95,43



Şekil 4.2. Farklı dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözücü hacimlerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi

Yapılan denemeler sonucunda ekstraksiyon verimi göz önüne alındığında ekstraksiyon çözücüsünün 50 mL, 100 mL ve 150 mL' sinin yeterli miktar olmadığı görülmüştür. Dağıtıcı çözelti miktarları incelendiğinde 200 mL, 400 mL ve 600 mL için geri kazanım değerleri, 800 mL için olan değere göre düşük bulunmuştur. Fakat dağıtıcı çözücü miktarı daha da artırılıp 1000 mL yapıldığında % geri kazanımın düştüğü görülmüştür. Sonuç olarak **ekstraksiyon çözgeninin hacmi 200µL olarak, dağıtıcı çözgenin hacmi de 800µL olarak seçilmiştir.**

4.1.3. pH'ın Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Ekstraksiyon verimi üzerindeki pH etkisi ekstraksiyon ve mikro ekstraksiyon tekniklerinde araştırılmaktadır. DLLME'de, farklı pH aralıklarında (pH=2, 4, 6, 7, 8, 10) çalışılarak en uygun pH seçilmiştir.

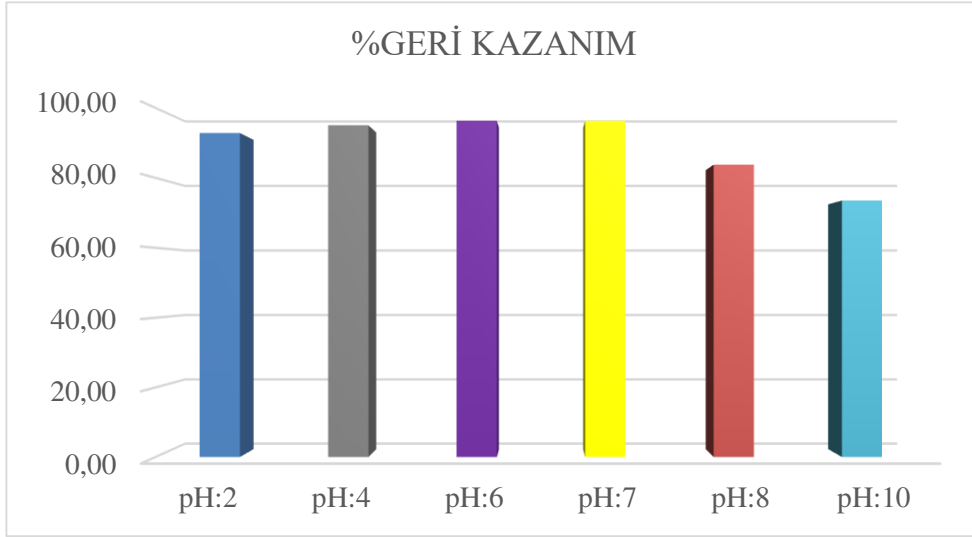
0,10 mg/L başlangıç derişimindeki Vemurafenib'in DLLME yöntemi ile önderiştirilmesi sonucu 5,00 mL'lik örnek hacminden 100 µL'lik hacme deriştirilmesi ile 50 kat derişik hale gelmesi beklenir. Bu durumda 0,10 mg/L olan Vemurafenib derişiminin DLLME yöntemiyle önderiştirme sonrası HPLC

cihazında okuma işlemi sonucu elde edilecek Vemurafenib derişiminin 5,00 mg/L olması beklenir.

Ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in, farklı pH değerlerinde yapılan DLLME sonrasında ölçülen derişimleri ve % geri kazanım sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir. Elde edilen % geri kazanım değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmış şekli grafik olarak Şekil 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı pH değerlerinin kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve % geri kazanım değerleri

pH	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L)	% Geri Kazanım
2	4,64±0,01	92,81
4	4,75±0,11	95,04
6	4,82±0,04	96,35
7	4,82±0,04	96,35
8	4,19±0,28	83,77
10	3,68±0,02	73,51



Şekil 4.3. Farklı pH değerlerinin, ekstraksiyon sonrasında 5 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi

Yapılan denemeler sonucunda ekstraksiyon verimi ve yöntemin kullanılacağı uygulama alanının pH'ı 7 olan insan vücut sıvıları olması göz önüne alındığında denemeler için en uygun **pH değeri 7 olarak belirlenmiştir.**

4.1.4. Tuz Eklemenin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

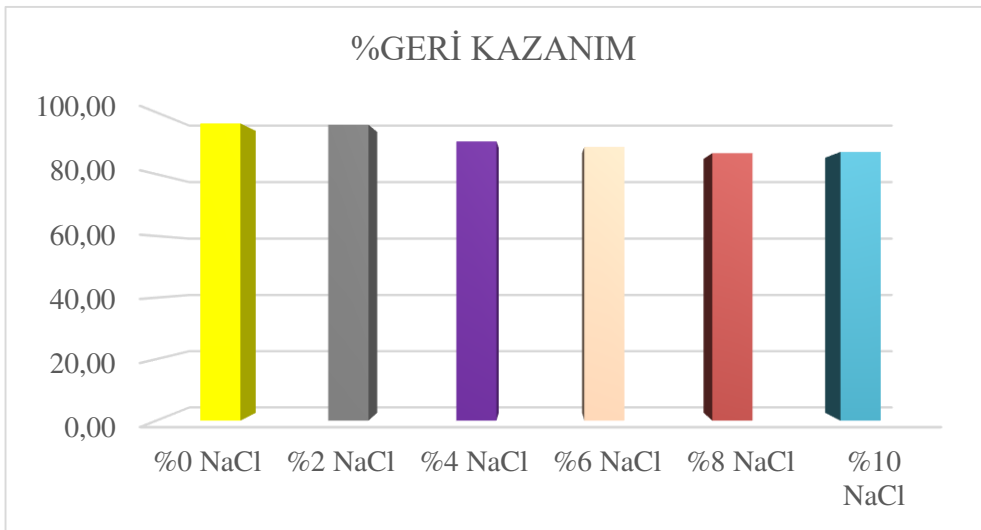
Ekstraksiyon verimi üzerindeki tuz etkisi ekstraksiyon ve mikro ekstraksiyon tekniklerinde araştırılmaktadır. DLLME'de, tuz ilavesi, ekstraksiyon verimliliğini artırabilir, hedef analitlerin ekstraktaki kütle transferini azaltabilir veya ekstraksiyon verimliliği üzerinde dikkate değer bir etkiye sahip olmayabilir. Bunu anlayabilmek için farklı oranlarda (%2, 4, 6, 8, 10) tuz eklenerek tuz etkisine bakılmıştır.

0,10 mg/L başlangıç derişimindeki Vemurafenib'in DLLME yöntemi ile önderiştirilmesi sonucu 5,00 mL'lik örnek hacminden 100 µL'lik hacme deriştirilmesi ile 50 kat derişik hale gelmesi beklenir. Bu durumda 0,10 mg/L olan Vemurafenib derişiminin DLLME yöntemiyle önderiştirme sonrası HPLC cihazında okuma işlemi sonucu elde edilecek Vemurafenib derişiminin 5,00 mg/L olması beklenir.

Ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in, farklı miktarlarda tuz eklenerek yapılan DLLME sonrasında ölçülen derişimleri ve % geri kazanım değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir. Elde edilen % geri kazanım değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmış şekli grafiksel olarak Şekil 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı %NaCl değerlerinin kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve % geri kazanım değerleri

Tuz %	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L)	% Geri Kazanım
0	4,82±0,02	96,40
2	4,80±0,10	96,00
4	4,53±0,04	90,60
6	4,44±0,09	88,80
8	4,34±0,13	86,80
10	4,36±0,11	87,20



Şekil 4.4. Farklı %NaCl değerlerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi

Ekstraksiyona tuzun etkisi bakılırken yapılan çalışmaların tekrarlanan sonuçlar elde edilememesi ve artan tuz miktarının ekstraksiyon verimini artırmaması sonucunda bundan sonra yapılacak çalışmalar için kullanılacak **NaCl miktarı %0** olarak belirlenmiştir.

4.1.5. Sıcaklığın Ekstraksiyon Verimine Etkisi

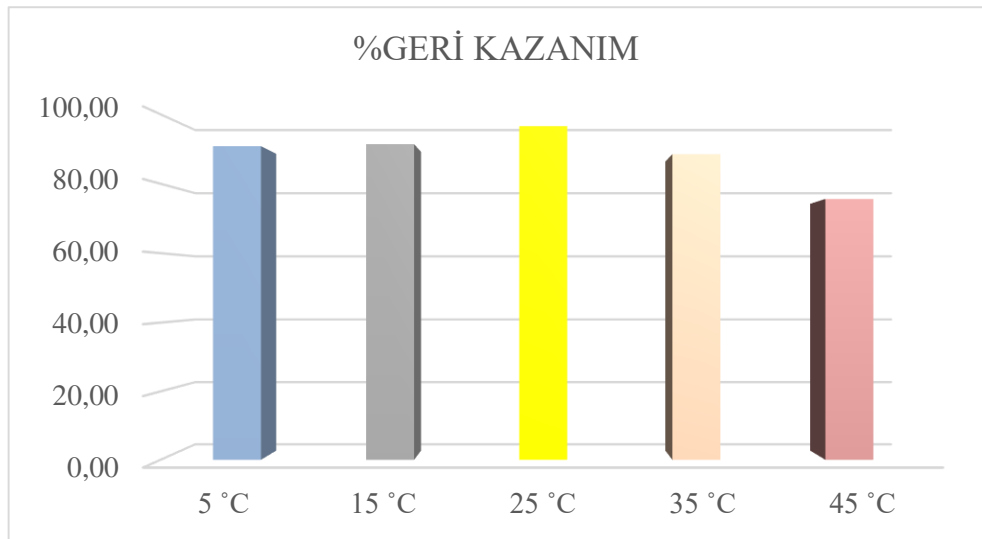
Ekstraksiyon verimi üzerindeki sıcaklık etkisi ekstraksiyon ve mikro ekstraksiyon tekniklerinde araştırılan diğer bir parametredir. DLLME'de, sıcaklığın artması, ekstraksiyon verimliliğini artırabilir, azaltabilir veya ekstraksiyon verimliliği üzerinde dikkate değer bir etkiye sahip olmayabilir. Bunu anlayabilmek için denemeler farklı sıcaklıklarda (5 °C, 15 °C, 25 °C, 35 °C, 45 °C) çalışılarak sıcaklık etkisine bakılmıştır.

0,10 mg/L başlangıç derişimindeki Vemurafenib'in DLLME yöntemi ile önderiştirilmesi sonucu 5,00 mL'lik örnek hacminden 100 µL'lik hacme deriştirilmesi ile 50 kat derişik hale gelmesi beklenir. Bu durumda 0,1 mg/L olan Vemurafenib derişiminin DLLME yöntemiyle önderiştirme sonrası HPLC cihazında okuma işleminin sonucu elde edilecek Vemurafenib derişiminin 5,00 mg/L olması beklenir.

Ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in, farklı sıcaklıklarda yapılan DLLME sonrasında ölçülen derişimleri ve % geri kazanım değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. Elde edilen % geri kazanım değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmış şekli grafiksel olarak Şekil 4.5.'te verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı sıcaklık değerlerinin kullanımı sonucu, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve % geri kazanım değerleri

Sıcaklık (°C)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L)	% Geri Kazanım
5	4,54±0,12	90,80
15	4,57±0,27	91,40
25	4,83±0,07	96,58
35	4,42±0,26	88,49
45	3,78±0,15	75,60



Şekil 4.5. Farklı sıcaklık değerlerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi

Farklı sıcaklıklarda yapılan denemeler sonucunda 5 °C ve 15 °C’de ekstraksiyon veriminde düşme olmuştur. 25°C’de ekstraksiyon verimi en yüksek olarak gözlemlenirken 35°C ve 45 °C’ de ekstraksiyon verimi düşmüştür. Yapılan bu çalışmaların sonucunda en yüksek verimi sağlayan sıcaklık olan oda sıcaklığı yani **25°C**, optimum koşul olarak belirlenmiştir.

4.1.6. Santrifüj Hızının ve Süresinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

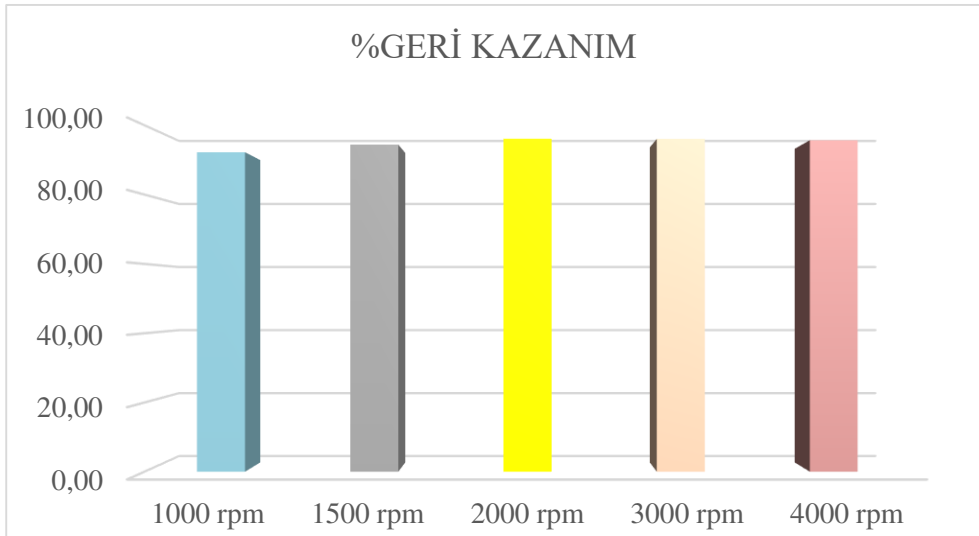
Ekstraksiyon verimi üzerindeki santrifüj etkisi ekstraksiyon ve mikro ekstraksiyon tekniklerinde araştırılan diğer bir parametredir. Ekstraksiyon prosedürü gereği kullanılan santrifüjün optimum hızını ve süresini belirlemek için farklı hızlarda (1000, 1500, 2000, 3000, 4000 rpm) ve farklı sürelerde (1, 5, 10, 15 dk) santrifüj işlemi uygulanıp optimum koşullar belirlenmiştir.

0,10 mg/L başlangıç derişimindeki Vemurafenib’in DLLME yöntemi ile önderiştirilmesi sonucu 5,00 mL’lik örnek hacminden 100 µL’lik hacme deriştirilmesi ile 50 kat derişik hale gelmesi beklenir. Bu durumda 0,10 mg/L olan Vemurafenib derişiminin DLLME yöntemiyle önderiştirme sonrası HPLC cihazında okuma işlemi sonucu elde edilecek Vemurafenib derişiminin 5,00 mg/L olması beklenir.

Ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib’in, farklı santrifüj hızlarında yapılan DLLME sonrasında ölçülen derişimleri ve % geri kazanım değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Elde edilen % geri kazanım değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmış şekli grafiksel olarak Şekil 4.6.’da verilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı santrifüj hızlarının, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve %geri kazanım değerleri

Santrifüj Hızı (rpm)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L)	% Geri Kazanım
1000	4,61±0,09	92,20
1500	4,72±0,10	94,41
2000	4,81±0,02	96,11
3000	4,80±0,04	96,08
4000	4,78±0,10	95,66

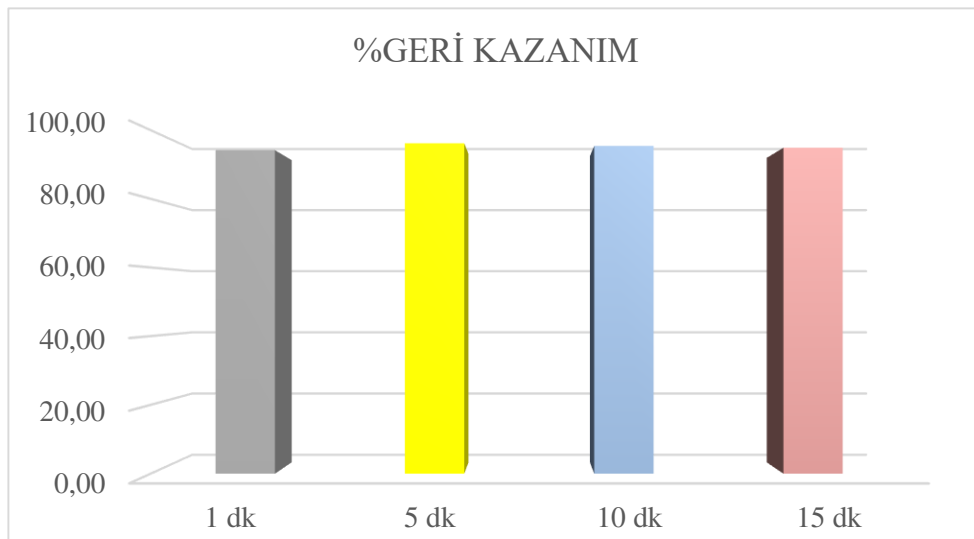


Şekil 4.6. Farklı santrifüj hızlarının, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi

Ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in, farklı santrifüj sürelerinde yapılan DLLME sonrasında ölçülen derişimleri ve % geri kazanım değerleri Çizelge 4.8'de verilmiştir. Elde edilen % geri kazanım değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmış şekli grafiksel şekilde Şekil 4.7.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. Farklı santrifüj sürelerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve %geri kazanım değerleri

Santrifüj Süresi (dk)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L)	% Geri Kazanım
1	4,71±0,08	94,17
5	4,81±0,14	96,16
10	4,77±0,10	95,42
15	4,74±0,03	94,88



Şekil 4.7. Farklı santrifüj sürelerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi

Farklı santrifüj hızı ve süresi uygulanarak yapılan bu çalışmaların sonucunda en yüksek verimi sağlayan santrifüj hızı **olarak 2000 rpm**, ve en yüksek verimi sağlayan santrifüj süresi olarak **5 dk** optimum koşul olarak belirlenmiştir.

4.1.7. Ekstraksiyon Süresinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Ekstraksiyon verimini etkileyen parametreler içinde ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon ve mikro ekstraksiyon tekniklerinde araştırılan diğer bir parametredir. Ekstraksiyon prosedürü sırasında optimum süreyi belirlemek için farklı sürelerde (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 dakika) çalkalayıcıda bekletilen tüpler, belirlenen süre sonunda vortekslelendikten sonra santrifüj işlemi uygulanıp optimum koşul belirlenmiştir.

0,10 mg/L başlangıç derişimindeki Vemurafenib'in DLLME yöntemi ile önderiştirilmesi sonucu 5,00 mL'lik örnek hacminden 100 µL'lik hacme deriştirilmesi ile 50 kat derişik hale gelmesi beklenir. Bu durumda 0,10 mg/L olan Vemurafenib derişiminin DLLME yöntemiyle önderiştirme sonrası HPLC cihazında okuma işlemi sonucu elde edilecek Vemurafenib derişiminin 5,00 mg/L olması beklenir.

Ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in, farklı ekstraksiyon sürelerinde yapılan DLLME sonrasında ölçülen derişimleri ve % geri kazanım değerleri Çizelge 4.9'da verilmiştir. Elde edilen % geri kazanım değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmış şekli grafiksel olarak Şekil 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı ekstraksiyon sürelerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve %geri kazanım değerleri

Ekstraksiyon Süresi (dk)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L)	% Geri Kazanım
0	4,79±0,05	95,76
5	4,80±0,04	96,08

Çizelge 4.9. Farklı ekstraksiyon sürelerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in DLLME sonrasında ölçülen derişim ve %geri kazanım değerleri (devam)

10	4,81±0,04	96,30
15	4,89±0,12	97,70
30	5,05±0,03	101,03
45	4,87±0,14	97,44
60	4,68±0,17	93,63



Şekil 4.8. Farklı ekstraksiyon sürelerinin, ekstraksiyon sonrasında 5,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib'in geri kazanım değerleri üzerine ekisi

Farklı ekstraksiyon süresi uygulanarak yapılan bu çalışmaların sonucunda en yüksek verimi sağlayan ekstraksiyon süresi olarak **30 dk** optimum koşul olarak belirlenmiştir.

4.2. Optimize Edilen Metodun Yapay İdrar Numunesine Uygulanması

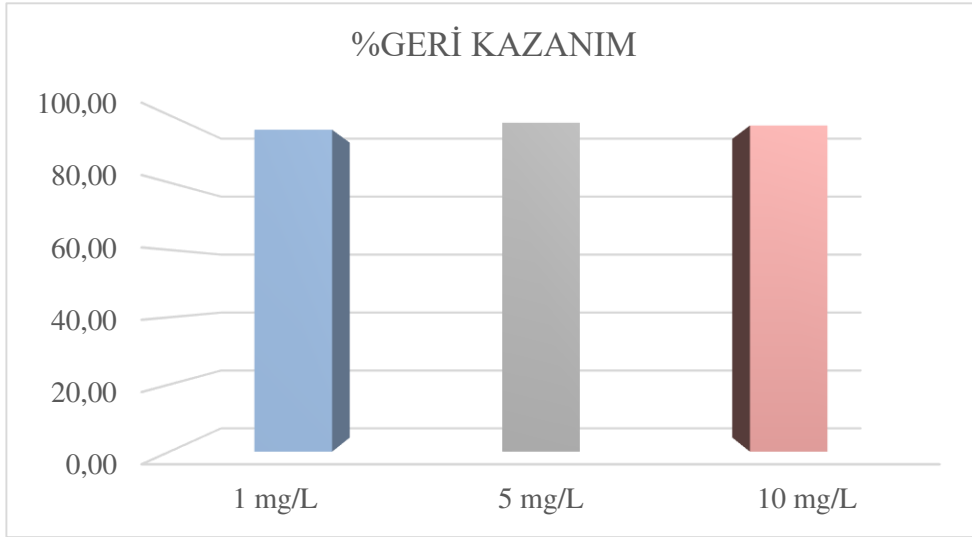
Optimize edilen yöntemin uygulaması için 1 nolu yapay idrar numunesi ve 2 nolu yapay idrar numunesi Bölüm 3.4.1 ve Bölüm 3.4.2’de belirtildiği şekilde iki farklı yapay idrar numunesi hazırlanmıştır.

1 nolu yapay idrardaki 0,02 mg/L, 0,10 mg/L ve 0,20 mg/L başlangıç derişimlerindeki Vemurafenib’in DLLME yöntemi ile önderiştirilmesi sonucu 5,00 mL’lik örnek hacminden 100 µL’lik hacme deriştirilmesi ile 50 kat derişik hale gelmesi beklenir. Bu durumda 0,02 mg/L, 0,10 mg/L ve 0,20 mg/L olan Vemurafenib derişimlerinin, DLLME yöntemiyle önderiştirme sonrası HPLC cihazında okuma işlemi sonucu elde edilecek Vemurafenib derişimlerinin 1,00 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,00 mg/L olması beklenir.

Ekstraksiyon sonrasında 1,00 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,00 mg/L derişimlerinde Vemurafenib içeren 1 nolu yapay idrar numunesine optimum koşullarda yapılan DLLME sonrasında ölçülen derişimleri ve % geri kazanım değerleri Çizelge 4.10’da verilmiştir. Elde edilen % geri kazanım değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmış şekli grafiksel olarak Şekil 4.9.’da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Ekstraksiyon sonrasında 1,00 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib içeren 1 nolu yapay idrar numunesi geri kazanım değerleri

1 NOLU YAPAY İDRAR NUMUNESİ		
	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L)	% Geri Kazanım
(Spike:1mg/L Vemurafenib)	0,96±0,09	95,70
(Spike:5mg/L Vemurafenib)	4,89±0,74	97,77
(Spike:10mg/L Vemurafenib)	9,70±0,76	96,96



Şekil 4.9. 1 nolu yapay idrar numunesinde Vemurafenib'in % geri kazanım değerleri.

Yapılan çalışmalar sonucu geri kazanım değerlerinin %95'in üzerinde olduğu saptanmıştır.

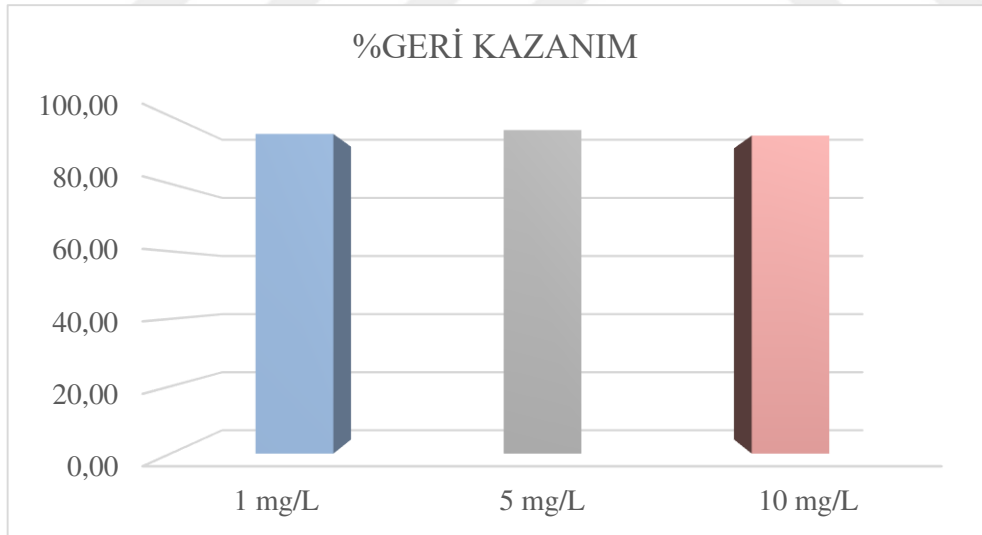
2 nolu yapay idrardaki 0,02 mg/L, 0,10 mg/L ve 0,20 mg/L başlangıç derişimlerdeki Vemurafenib'in DLLME yöntemi ile önderiştirilmesi sonucu 5,00 mL'lik örnek hacminden 100 µL'lik hacme deriştirilmesi ile 50 kat derişik hale gelmesi beklenir. Bu durumda 0,02 mg/L, 0,10 mg/L ve 0,20 mg/L olan Vemurafenib derişimlerinin, DLLME yöntemiyle önderiştirme sonrası HPLC cihazında okuma işlemi sonucu elde edilecek Vemurafenib derişimlerinin 1,00 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,00 mg/L olması beklenir.

Ekstraksiyon sonrası 1,00 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,00 mg/L derişimlerinde Vemurafenib içeren 2 nolu yapay idrar numunesine optimum koşullarda yapılan DLLME sonrasında ölçülen derişimleri ve % geri kazanım değerleri Çizelge 4.11'da verilmiştir. Elde edilen % geri kazanım değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmış şekli grafiksel olarak Şekil 4.10.'da verilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucu geri kazanım değerlerinin %94'ün üzerinde olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.11. Ekstraksiyon sonrası 1,00 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib içeren 2 nolu yapay idrar numunesi geri kazanım değerleri

2 NOLU YAPAY İDRAR NUMUNESİ		
	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L)	%Geri Kazanım
(Spike:1mg/L Vemurafenib)	0,95±0,10	94,77
(Spike:5mg/L Vemurafenib)	4,80±0,25	95,92
(Spike:10mg/L Vemurafenib)	9,43±0,31	94,27



Şekil 4.10. 2 nolu yapay idrar numunesinde Vemurafenib'in % geri kazanım değerleri

4.3. Optimize Edilen Metodun Çeşme Suyu Numunesine Uygulanması

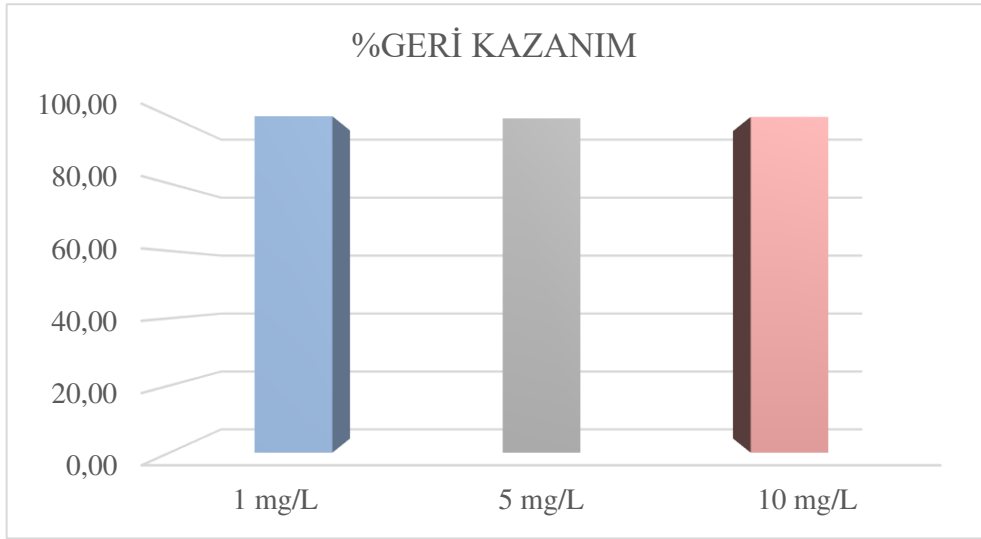
Optimize edilen yöntemin uygulaması için Adnan Menderes Üniversitesi Analitik Kimya Laboratuvarı'nın musluğundan akan çeşme suyu numunesi kullanılmıştır.

Çeşme suyundaki 0,02 mg/L, 0,10 mg/L ve 0,20 mg/L başlangıç derişimlerindeki Vemurafenib'in DLLME yöntemi ile önderiştirilmesi sonucu 5,00 mL'lik örnek hacminden 100 µL'lik hacme deriştirilmesi ile 50 kat derişik hale gelmesi beklenir. Bu durumda 0,02 mg/L, 0,10 mg/L ve 0,20 mg/L olan Vemurafenib derişimlerinin, DLLME yöntemiyle önderiştirme sonrası HPLC cihazında okuma işlemleri sonucu elde edilecek Vemurafenib derişimlerinin 1,00 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,00 mg/L olması beklenir.

Ekstraksiyon sonrasında 1,00 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,00 mg/L derişimlerinde Vemurafenib içeren çeşme suyu numunesine optimum koşullarda yapılan DLLME sonrasında ölçülen derişimleri ve % geri kazanım değerleri Çizelge 4.12'de verilmiştir. Elde edilen % geri kazanım değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmış şekli grafiksel veri şeklinde Şekil 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Ekstraksiyon sonrasında 1,00 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,00 mg/L olması beklenen Vemurafenib içeren çeşme suyu numunesi geri kazanım değerleri

ÇEŞME SUYU NUMUNESİ		
	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L)	%Geri Kazanım
(Spike:1mg/L Vemurafenib)	1,04±0,13	104,49
(Spike:5mg/L Vemurafenib)	4,97±0,40	99,35
(Spike:10mg/L Vemurafenib)	9,98±0,29	99,81



Şekil 4.11. Çeşme suyu numunesinde Vemurafenib'in geri kazanım değerleri

Yapılan çalışmalar sonucu geri kazanım değerlerinin %99'un üzerinde olduğu saptanmıştır. Geri kazanım değerleri %99'un altına düşmediği için, çeşme suyunun içindeki iyonların Vemurafenib için bir girişim yapmadığını söyleyebiliriz.

4.4. Metodun Validasyonu

Geliştirilen metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için, geçerlilik metod parametreleri belirlenip incelenmiştir. Metodun, sürecin, cihazın ve sistemin beklendiği gibi çalıştığını ve istenen sonuçları verdiğini kanıtlamak için metod validasyonu gerçekleştirilmiştir. Metod validasyonu için incelenen performans kriterleri; seçicilik, LOD (Tespit Limiti), LOQ (Tayin Limiti), ölçüm aralığı ve linearite, doğruluk (geri kazanım) ve kesinlik (tekrarlanabilirlik-tekrar üretilebilirlik) parametrelerinden oluşmaktadır.

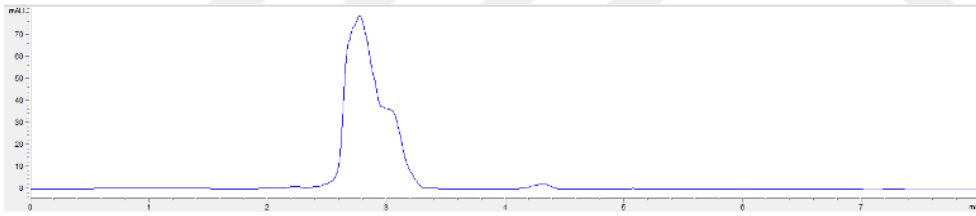
Bu kapsamda validasyon çalışmaları için kullanılan matrisler yapay idrar ve çeşme suyudur.

Yapılan denemeler sonucunda elde edilen verilere göre metod uygunluk açısından değerlendirilmiştir.

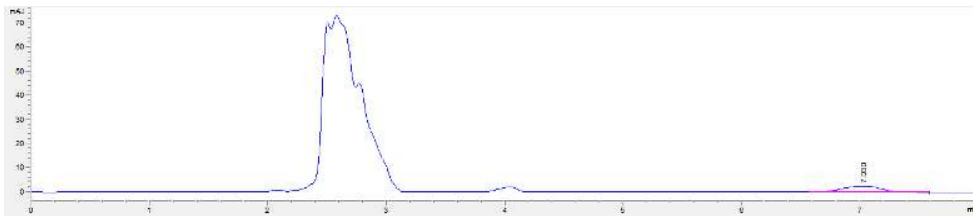
4.4.1. Seçicilik

Seçicilik, bir metodun ilgilenilen analiti, bir örnek matriksindeki diğer bileşenler varlığında ve deneyde belirtilen koşullar altında, doğru ve spesifik olarak tayin etme kabiliyetidir.

Seçiciliğin belirlenebilmesi için kör numuneye (Şekil 4.12) aranan analit (1mg/L Vemurafenib) eklenerek (Şekil 4.13) girişim oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Şekillerden de görüldüğü üzere 1,00 mg/L Vemurafenib içeren numunenin kromatogramında Vemurafenib pikinin geldiği dakikada bir pik gözlenmesine rağmen; Vemurafenib içermeyen numunenin kromatogramında Vemurafenib pikinin geldiği dakikada herhangi bir pik gözlenmemiştir. Bu durumda aşağıdaki şekillerden de görüldüğü gibi Vemurafenibin alıkonma zamanlarında numuneden kaynaklı girişim piki bulunmadığı saptanmıştır. Diğer bir deyişle geliştirilen yöntem Vemurafenib için seçicidir.



Şekil 4.12. Kör numuneye ait kromatogram



Şekil 4.13. 1 mg/L Vemurafenib içeren analite ait kromatogram

4.4.2. LOD ve LOQ

LOD ve LOQ değerlerini hesaplamak için, 10 bağımsız ölçüm yapılmıştır. Ardından ölçümlerin standart sapması hesaplanmıştır. Standart sapma 3 ile çarpılarak LOD'nin ve 10 ile çarpılarak LOQ'nun sayısal değeri belirlenmiştir. Ölçümler için 1.00 mg/L derişimde Vemurafenib içeren numuneler kullanılmıştır.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{Standart Sapma (SD)}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{Standart Sapma (SD)}$$

Analiz sonuçları Çizelge 4.13.'de yer almaktadır.

Çizelge 4.13. 1,00 mg/L Vemurafenib'in LOD ve LOQ değerleri

ÖLÇÜM SAYISI	VEMURAFENİB DERİŞİMİ (mg/L)
1	0,95
2	0,98
3	0,97
4	0,96
5	0,96
6	0,98
7	0,95
8	0,95
9	0,96
10	0,95
SS:	0,013
LOD	0,039
LOQ	0,130

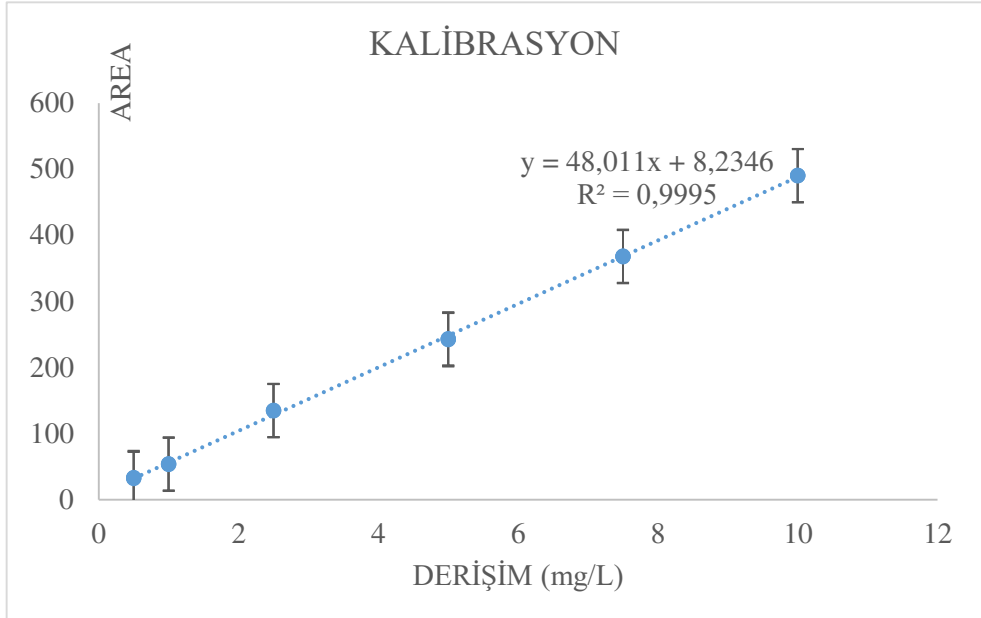
Yapılan 10 tane analiz sonucunda elde edilen verilerin standart sapması düşüktür yani değerler arası önemli bir fark yoktur, değerler birbirine oldukça yakındır.

Tespit limiti (LOD), yani metodun laboratuvar koşullarında örnekteki varlığını tespit edebildiği ancak kesin miktarını ölçemediği en düşük analit derişimi, 0,039 ve tayin limiti (LOQ) ise yani miktarsal olarak tespit edilebilen en düşük analit derişimi, 0,130 olarak hesaplanmıştır.

4.4.3. Ölçüm Aralığı ve Doğrusallık

Metodun uygulama aralığının belirlenmesi için, ölçüm aralığı tespit çalışması yapılmıştır. Ölçüm aralığı, kalibrasyon eğrisinde ölçülen analitin derişimi ve dedektör yanıtının doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır. Kalibrasyon eğrisi, metoda ve ürüne bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenmiştir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans numuneyle veya kör numune içine eklenmiş analitin bilinen derişimi ile yapılır. Bunun için 6 nokta, bir de kör eklenerek toplam 7 nokta belirlenmiştir. Sonuçlar grafiksel olarak verilmiştir ve “regresyon eşitliği” ile “korelasyon katsayısı” belirtilmiştir. Bu şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilmiştir. Regresyon hesabı için Excel’de bulunan formüllerden yararlanılmıştır. Doğrusallık, korelasyon katsayısının hesaplanması yanında ANOVA tablosunda F değeri ile karşılaştırılarak da değerlendirilmiştir. Verilen bilgiler dâhilinde gerekli hesaplamalar yapıp Çizelge 4.14’teki veriler elde edilmiştir.

Vemurafenib’e ait kalibrasyon eğrisi, cihazdan her bir derişim için okunan sonuçların kalibrasyon eğrisi denklemi ile hesaplanıp olması gereken derişimlere karşı oluşturulan grafikler Şekil 4.14’te verilmiştir. Kalibrasyon eğrisine ilişkin regresyon analizi sonuçları Çizelge 4.14’te verilmiştir.



Şekil 4.14. Vemurafenib'in kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.14. Vemurafenib'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel verileri (n=6)

Regresyon denklemi ($y=mx\pm n$)*	$y=48,011x+8,2346$
Determinasyon katsayısı(R^2)	0,9995
Korelasyon katsayısı(r)	0,9997
Eğimin standart hatası	4,59
Kesişimin standart hatası	3,04
p**	0,054>0,05
F***	7850,5 >6,26
y=pik alanı, x=derişim, m=eğim, n=kesişim	
Kesişimin p değeri, *Korelasyon katsayısının F değeri	

Vemurafenib için determinasyon katsayısı (R^2) 0,9995 olarak bulunmuştur. Determinasyon katsayısı değerinin 1,00'e yakın bulunması, çizilen kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğunu göstermektedir.

Anova analizi yapılarak elde edilen F değeri F_{tablo} değeri ile karşılaştırılmış ve Vemurafenib için $F > F_{\text{tablo}}$ olarak bulunduğundan kalibrasyon eğrilerini oluşturan noktaların regresyon doğrusuyla uyumlu olduğu, korelasyon katsayılarının tesadüfen bulunmuş değerler olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır. Ayrıca regresyon analizi sonucu kalibrasyon eğrilerindeki kesişim değerlerinin sıfıra eşit (önemsiz) ($p > 0,05$) olduğu belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar geliştirilen yöntemin doğrusal olduğunu kanıtlamaktadır.

4.4.4. Doğruluk (Geri Kazanım)

Doğruluk, çok sayıdaki ölçüm sonucunun ortalamasının gerçek değere yakınlığıdır. Doğruluk için sistematik hata hesabı yapılmıştır. Sistematik hatanın hesaplanabilmesi için doğru olduğu kabul edilen referans yani gerçek değer bilinmelidir. Gerçek değer; sertifikalı referans materyallerden, valide edilmiş metodun ölçümü sonucu veya yeterlilik testleri sonucunda elde edilebilir.

Doğruluğun tespiti için sertifikalı referans materyal, referans metod ve yeterlilik testinin bulunmadığı durumlarda geri kazanım çalışması yapılır. Geri kazanım çalışmasının en büyük avantajı orijinal matrikste çalışma yapılabilmesidir. Çalışmaların en az 3 farklı derişimde yapılması gerekir. Bu tez çalışmasında geri kazanım çalışması yapılmıştır.

Geri kazanımı hesaplamak için, çalışılan matrislerde (1 nolu yapay idrar, 2 nolu yapay idrar ve musluk suyu), çalışma aralığına giren üç farklı derişimde (1,00; 5,00; 10,0 mg/L) ve her bir derişim için 3'er adet olmak üzere; Vemurafenib eklenmiş idrar numuneleri hazırlanarak aynı günde analiz edilmiştir. Veriler, hazırlanan kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve geri kazanım değerleri Çizelge 4.15 -4.17'de verilmiştir. Hesaplanan sistematik hatanın gerçek değerle arasında önemli bir farkının bulunup bulunmadığı t- testi yapılarak kontrol edilmiştir.

Çizelge 4.15. 1 nolu yapay idrar numunesinde Vemurafenib'e ait geri kazanım verileri

1 NOLU YAPAY İDRAR NUMUNESİ			
Analiz Sayısı	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:1mg/L)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:5mg/L)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:10mg/L)
1	1,03	5,65	8,91
2	0,99	4,18	10,43
3	0,85	4,85	9,75
Ortalama	0,96	4,89	9,70
%Ort. Geri Kazanım	95,70	97,77	96,96
Standart Sapma	0,09	0,74	0,76
%RSD	9,84	15,05	7,85

$$t = \frac{|0,97-1|}{0,53/\sqrt{3}} = 0,10$$

$$t=0,10 < 2,306 (t_{\text{tablo}})$$

Çizelge 4.16. 2 nolu yapay idrar numunesinde Vemurafenib'e ait geri kazanım verileri

2 NOLU YAPAY İDRAR NUMUNESİ			
Analiz Sayısı	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:1mg/L)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:5mg/L)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:10mg/L)
1	0,95	4,60	9,74
2	1,00	5,05	9,13
3	0,89	4,74	9,41
Ortalama	0,95	4,80	9,43
%Ort. Geri Kazanım	94,77	95,92	94,27
Standart Sapma	0,05	0,23	0,31
%RSD	5,73	4,82	3,27

$$t = \frac{|0,95-1|}{0,20/\sqrt{3}} = 0,43 \quad t=0,43 < 2,306 (t_{\text{tablo}})$$

Çizelge 4.17. Çeşme suyunda Vemurafenib'e ait geri kazanım verileri

ÇEŞME SUYU NUMUNESİ			
Analiz Sayısı	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:1mg/L)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:5mg/L)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:10mg/L)
1	0,94	4,60	10,29
2	1,19	4,91	9,71
3	1,00	5,39	9,95
Ortalama	1,04	4,97	9,98
%Ort. Geri Kazanım	104,49	99,35	99,81
Standart Sapma	0,13	0,40	0,29
%RSD	12,55	8,00	2,91

$$t = \frac{|1,01-1|}{0,27/\sqrt{3}} = 0,06 \quad t=0,06 < 2,306 (t_{\text{tablo}})$$

Hesaplanan sistematik hatanın gerçek değerle arasında önemli bir fark yoktur.

4.4.5. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik-Tekrar Üretilirlik)

SANCO dokümanı, tayin limitini (LOQ) metot performans kriterlerinin sağlandığı (%70-120 geri kazanım, $\leq$ %20 RSD) en düşük derişim olarak tanımlanmakta, herhangi bir matematiksel hesaplama yöntemi bildirmemektedir. Buna göre, gittikçe azalan derişimlerde spike yapılarak geri kazanım çalışmaları yapılmalı, geri kazanımın %70-120 aralığında olduğu, RSD değerinin %20'nin altında olduğu en düşük derişim tayin limiti (LOQ) olarak belirlenmelidir (Açar, Ö., Ç., ve ark 2013).

Hesaplanan %RSD değerleri yöntemin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için kullanılmıştır. %RSD değerlerinin kabul edilebilirliği %20'ten küçük olup

olmadığına göre değerlendirilmiştir. Hesaplanan %RSD değerleri Çizelge 4.18’de yer almaktadır.

Çizelge 4.18. Tekrarlanabilirlik parametresine ait %RSD değerleri

Analiz sayısı	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:1mg/L)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:5mg/L)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:10mg/L)
1	0,95	4,88	9,83
2	0,98	4,85	9,96
3	0,97	4,99	10,10
4	0,96	4,77	9,68
5	0,98	4,73	9,94
SS	0,01	0,10	0,16
Xort	0,97	4,84	9,90
%RSD	1,54	2,09	1,60
%RSD	1,54<20	2,09<20	1,63<20

Çizelge 4.19. Vemurafenib'e ait tekrar üretilebilirlik verileri

ANALİZ SAYISI (GÜN)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:1mg/L)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:5mg/L)	DLLME Sonrası Vemurafenib Derişimi (mg/L) (Spike:10mg/L)
1	0,96	4,84	9,90
2	0,94	4,78	9,72
3	0,97	4,77	9,74
4	0,96	4,78	9,75
5	0,94	4,80	9,76
ORTALAMA	0,95	4,80	9,77
STANDART SAPMA	0,01	0,03	0,07
%RSD	0,97	0,63	0,76
%PRSD	16,01	12,56	11,29
HorRat (%RSD/%PRSD)	0,06	0,05	0,07
HorRat	0,06<2	0,05<2	0,07<2

5. SONUÇ

Bu doktora çalışmasında dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi kullanılarak vemurafenibin ön deriştirilmesi, tayini, optimizasyonunu ve validasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu sayede düşük maliyetle, hızlı, yüksek zenginleştirme faktörü elde edilerek Vemurafenib'in eser miktarları da ölçülmüştür.

Vemurafenib tayini için yapılan çalışmalar incelendiğinde; Prasad, G.R., ve ark. (2011), Zheng. Y., ve ark. (2013), Chhabda, P.J. ve ark. (2013), Güven, G. (2019)'nin yaptıkları çalışmalarda Vemurafenib'i ölçmek için bir HPLC-UV yöntemi geliştirilmiştir. Nijenhuis, C.M., ve ark. (2014), Vemurafenib'in tayini için LC-MS yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Bihan. K., ve ark. (2015), UPLC-MS kullanılarak vemurafenib ölçümü için basit bir yöntem geliştirmiştir. Sparidans, R. W., ve ark. (2012), Alvarez, J.C., ve ark. (2014), Vikingsson, S., ve ark. (2016), Vemurafenib için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Rousset, M., ve ark.'ın (2017), yaptıkları bir çalışmada, BRAF inhibitörü olan Vemurafenibin ölçümü için UPLC-MS/MS metodunu kullanmışlardır.

Vemurafenib analizi üzerine yapılan bu çalışmalar incelendiğinde belirlenen güven sınırı dâhilinde yaptıkları yöntemlerle tespit edilebilen en düşük Vemurafenib derişimi 0,1 mg/L olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmamızda ön deriştirme yapılmış olduğu için MS sistemi kullanılmadan da 0,003 mg/L derişimdeki Vemurafenib numunesinin ölçümü kolaylıkla yapılabilmektedir. LC-MS ya da LC-MS/MS gibi MS sistemlerin olmadığı durumlarda HPLC ile analiz yapılacaksa ve bir ön deriştirme işlemine ihtiyaç duyulması durumunda bu tezde optimize edilen DLLME yöntemi ile eser miktardaki Vemurafenib'i ölçmek mümkün olmaktadır.

Bu doktora tezi, geliştirilmiş olan ve çeşitli parametrelerin çalışılmış olduğu özel bir yöntemle bir biyoaktif (farmasötik aktif) maddenin tespiti ve o parametrelerin etkisinin incelendiği bir tezdır. Bunun insanlığa veya biyoteknolojiye uygulamasına baktığımızda ise farmakokinetik özelliklerin incelenmesi, ilaç etkileşimleri, ilacın etkinliğinin tespiti için bu tür maddelerin miktarının tespitine ihtiyaç duyabiliriz. Bu da bize kolaylık, hız ve ucuzluk sağlayacak yeni novel bir yöntem geliştirilmiştir.

Yöntem hedef maddeleri içeren sulu örnek çözeltisi içerisine dağıtıcı çözelti ve ekstraksiyon çözeltisinin karışımının hızlı bir şekilde enjeksiyonuna dayanır. Örnek

çözeltilisine uygulanan bu şekildeki enjeksiyon, örnek içerisinde küçük damlacık yapılarının oluşmasına neden olur. Bu adımda çözeltide bulutlaşma olur. Ekstraksiyon çözücüsü ve örnek çözeltisi arasında büyük yüzey alanı olduğundan dengeye hızlı ulaşır. Hidrofobik maddeler, sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltilisinde zenginleştirilir. Karışım santrifüjlenir ve küçük damlacıklar konik tüpün altında toplanır. Dipte toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikroenjektör yardımıyla alınarak uygun enstrümantal yöntemler ile tayin edilir. Bu yöntemde, ekstraksiyon sonrasında alınan örnek çözücüsü uzaklaştırılıp, DMSO eklenerek yüksek basınç sıvı kromatografi (HPLC)'ye enjekte edilmiştir.

DLLME yönteminde optimizasyon çalışmalarını yapmak için öncelikle Vemurafenib stok çözeltisi, tampon çözeltisi, mobil fazın çözeltisi gibi kullanılacak çözeltiler hazırlanmıştır.

Ekstraksiyon çözücüsü ve dağıtıcı çözücü seçimi ve bunların optimum miktarları, pH, ortama tuz eklemek, sıcaklık, santrifüj hızı ve süresi, ekstraksiyon süresi, geliştirilen yöntem için incelenen ekstraksiyon parametreleridir.

Uygun ekstaksiyon ve dağıtıcı çözücü seçimi için yapılan denemeler sonucu; DKM ile yapılan denemelerde ekstraksiyon çözücüsünün fazla miktarları harcanmış, ekstraksiyon sırasında bulutlanma olmamış, ekstraksiyon verimi düşük bulunmuştur. KB ile yapılan denemelerde ekstraksiyon verimi çok yüksek çıkmıştır. K ile yapılan denemelerde dağıtıcı çözücü olarak asetonun kullanıldığı ekstraksiyonlarda ekstraksiyon verimleri oldukça yüksek bulunmuştur fakat kloroformun zehirli olması ve bulanıklığın az olması nedeniyle K da uygun bir ekstraksiyon çözgeni olarak seçilmemiştir. DKE ile yapılan denemelerde dağıtıcı çözücü olarak M kullanıldığında geri kazanımın (%117,35), E kullanıldığında geri kazanıma (%108,88) göre daha yüksek çıkmasına rağmen dağıtıcı çözücü olarak E seçilmiştir. Bunun nedeni dağıtıcı çözücü olarak M kullanıldığında bulanıklığın çok iyi olmamasıdır.

Ekstraksiyon çözücü miktarının belirlenmesi ile ilgili yapılan denemeler sonucunda ekstraksiyon verimi göz önüne alınmıştır. Ekstaksiyon çözücüsünün 50 mL, 100 mL ve 150 mL' sinin yeterli miktar olmadığı görülmüştür. Dağıtıcı çözelti miktarları incelendiğinde 200 mL, 400 mL ve 600 mL için geri kazanım değerleri, 800 mL

için olan değere göre düşük bulunmuştur. Fakat dağıtıcı çözücü miktarı daha da artırılıp 1000 mL yapıldığında % geri kazanımın düştüğü görülmüştür. Bu gözlemlerin sonucunda ekstraksiyon çözücüsü olarak 200 µL dikloroetan (DKE), dağıtıcı çözgen olarak 800 µL etanol (E) seçilmiştir.

Uygun pH koşulunu belirlemek için yapılan denemeler sonucunda toplanan veriler incelendiğinde pH 6 ve pH 7 değerlerinin aynı %geri kazanıma sahip olduğu görülmüştür. Ekstraksiyon veriminin aynı olması üzerine düşünülen ikinci bir ölçüt de yöntemin kullanılacağı uygulama alanının insan vücut sıvıları olmasıdır. Bu nedenle pH'ı yaklaşık 7 olan insan vücut sıvıları ile yapılacak olan denemeler için en uygun pH değeri 7 olarak belirlenmiştir.

Tuz eklemenin ekstraksiyon verimine etkisini incelerken edinilen veriler ışığında artan tuz miktarının %geri kazanıma olumlu bir etki etmediği görülmüştür.

Uygun sıcaklık koşulunu bulmak için yapılan denemeler sonucunda 15 °C'de 5 °C'ye göre ekstraksiyon veriminde kısmen artış olmuştur. 25°C'de ekstraksiyon verimi en yüksek gözlemlenmiştir. 35°C ve 45 °C' de ekstraksiyon verimi 25 °C'ye göre gittikçe düşmüştür. Yapılan bu çalışmaların sonucunda en yüksek verimi sağlayan sıcaklık olan oda sıcaklığı yani 25°C, uygun değer olarak belirlenmiştir.

Denemelerde en uygun santrifüj koşulları 2000 rpm ve 5dk olarak belirlenmiştir. Denemeler farklı ekstraksiyon süreleri uygulanarak yapıldığında en yüksek verimi sağlayan ekstraksiyon süresi olarak 30 dk optimum koşul olarak belirlenmiştir.

Geliştirilip optimize edilen bu yöntemin verimliliği karışık matrikslerde de incelenmiştir. Bunun için 2 farklı yapay idrar numunesi ve çeşme suyu numunesi kullanılmıştır. Elde edilen verileri değerlendirebilmek adına metod validasyon çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak da incelenmiştir.

Seçiciliğin belirlenebilmesi için kör numuneye aranan analit eklenerek girişim oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Vemurafenib içeren numunenin kromatogramında Vemurafenib pikinin geldiği dakikada bir pik gözlenmesine rağmen; Vemurafenib içermeyen numunenin kromatogramında Vemurafenib

pikinin geldiği dakikada herhangi bir pik gözlenmemiştir. Yani geliştirilen yöntem seçicidir.

LOD ve LOQ değerlerini hesaplamak için, 10 bağımsız ölçüm yapılmıştır. Ardından ölçümlerin standart sapması hesaplanmıştır. Yapılan 10 tane analiz sonucunda elde edilen verilerin standart sapması düşüktür yani değerler arası önemli bir fark yoktur, değerler birbirine oldukça yakındır.

Metodun uygulama aralığının belirlenmesi için, ölçüm aralığı tespit çalışması yapılmıştır. Ölçüm aralığı, kalibrasyon eğrisinden ölçülen analitin derişimi ve dedektör yanıtının doğru orantılı şekilde görüldüğü aralıktır. Elde edilen tüm sonuçlar, geliştirilen yöntemin doğrusal olduğunu kanıtlamaktadır.

Doğruluk, çok sayıdaki ölçüm sonucunun ortalamasının gerçek değere yakınlığıdır. Doğruluk için sistematik hata hesabı yapılmıştır. Hesaplanan sistematik hata ve gerçek değerin arasında önemli bir fark yoktur.

Geliştirilen Vemurafenib analiz yöntemi istatistiksel açıdan incelendiğinde de gerçek numunelere uygulanabilir bir yöntem olarak bulunmuştur. Yapılan ön derişirme sonrasında zenginleştirme faktörü 50'dir.

Bir zenginleştirme yöntemi olarak incelenen DLLME; düşük maliyetli, güvenilir, hızlı ve aynı zamanda çeşitli yapıdaki analitlerin yüksek zenginleştirme faktörü ve yüksek geri kazanımı ile basit bir uygulamaya sahip olması gibi pek çok avantaja sahiptir. Üç farklı çözücü türünün gerekli olması, kullanılacak ekstraksiyon çözücüsünün yoğunluğunun sudan fazla olması gerekliliği nedeniyle çözücü seçiminin sınırlı olması ve santrifüj gerektirmesi yöntemin dezavantajları olarak sayılabilir.

İlaç üretim saffalarından bahsettiğimizde faz 1, faz 2, faz 3 ve faz 4 çalışmalarında bu ilacın miktarının tespiti, sürekli yapılacak analizler için basit olması, hızlı olması, kolay uygulanabilir olması ve ucuz olması oldukça önemlidir. Optimize ettiğim bu DLLME yöntemi, ilaç çalışmalarında da çok iyi bir yöntem olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Açar, Ö.Ç., Kırış, S., Diler, F., Avcı, A. 2013. Pestisit analizleri için metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği hesaplanması açıklamalı uygulama rehberi. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi.
- Açıkgöz, Ş. 2014. Su örneklerinde organik reaktifler ve UV-VIS spektrofotometre kullanarak metal tayini için bir dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) yöntemi geliştirme. Bozok Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Yozgat.
- Agnieszka, Z.G., Tomasz, G. 2011. Dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, 30: 1382-1399.
- Aksoy, B., 2017. İyonik sıvı temelli dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi ile bakır, kurşun, altın, palladyum deriştirilmesi. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Denizli.
- Altınışik, M. 2017. Böbrekler ve İdrar. [<https://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-17.pdf>], Erişim tarihi: 15.12.2019.
- Alver, E., Demirci, A., Özçimder, M. 2012. Microextraction methods. **Journal of Engineering and Natural Sciences**, 30, 75-90.
- Alvarez, J.C., Funck-Brentano, E., Abe, E., Etting, I., Saiag, P. and Knapp, A. 2014. A LC/MS/MS micro-method for human plasma quantification of Vemurafenib. Application to treated melanoma patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 97, 29–32.
- Anonim, 2017. Macroscopic and chemical examination of urine. Erişim [<http://docplayer.net/52958387-Exercise-11-macroscopic-and-chemical-examination-of-urine.html>].

- Baig, A. 2011. Biochemical composition of normal urine. Nature Preceding DOI: 10.1038/npre.2011.6595.1.
Eriřim:[<https://www.researchgate.net/publication/273821932>]
- Balçık, U. 2019. Azo boyar maddelerin dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon sonrası gaz kromatografi kütle spektrometresi ile eser seviyelerde tayinleri. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Başoğlu, A. 2014. Azaflavanon-3-ol bileřiđi ile yeni bir spektrofotometrik demir tayini metodunun geliştirilmesi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, Trabzon.
- Bihan, K., Sauzay, C., Goldwirt, L., Charbonnier-Beaupel, F., Hulot, J.S., Funck-Brentano, C., Zahr, N. 2015. Development and validation of a rapid and simple LC-MS/MS method for quantification of vemurafenib in human plasma: application to a human pharmacokinetic study. **Therapeutic Drug Monitoring**, 37: 132–136.
- Bingöl, N., 2015. Farmakoloji ile İlgili Temel Kavramlar. Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri.
- Chen, H., Du, P., Chen, J., Hu, S., Li, S., and Liu, H., 2010. Separation and preconcentration system based on ultrasonic probe-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction for determination trace amount of chromium (VI) by electrothermal atomic absorption spectrometry, **Talanta**, 81: 177-179.
- Chhabda, P.J., Balaji., M., Srinivasarao, V., Rao, K.M.C.A. 2013. Development and validation of a new simple and stability indicating RP-HPLC method for the determination of vemurafenib in presence of degradant products. **Der Pharma Chemica**, 5: 189-198.

- Çabuk, T., Z., 2018. Bazı asidik ve bazik doping maddelerinin at idrarından analizi için dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon ve sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi geliştirilmesi ve validasyonu. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Demir, B.K., 2016. Tübüler Fonksiyon Testlerinin Değerlendirilmesi. Çocuk Nefroloji Derneği – Eğitim Toplantıları-II.
- Elyas, N., 2011. DLLME Yöntemi ile antimon (III)'ün zenginleştirilmesi, faktöriyel tasarım kullanarak deneysel koşulların optimizasyonu ve FAAS ile tayini. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Denizli.
- Emídio, E.S., Silva, C.P., Marchi, M.R.R., 2015. Determination of estrogenic mycotoxins in environmental watersamples by low-toxicity dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, 1391: 1-8.
- Ertaş, Ö., S., Kayalı, A. 2005. Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış. **Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi**, 34: 41-57.
- Farajzadeh, M.A., Bahram, M., Mehr, B.G., and Jönsson, J.A., 2008. Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction of copper (II) by atomic absorption spectrometry as its oxinate chelate: Application to determination of copper in different water samples, **Talanta**, 75: 832-840.
- FDA. 2013. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM).
- FDA. 2018. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM).

Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., Dwyer, P.J.O., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., Chapman. P.B., 2010. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. **The New England Journal of Medicine**, 363: 809-819.

Gençoğlu, G. 2018. Malign Melanom Hücre Dizilerinde Braf İnhibitörü Direncinin Hif 1 Ekspresyonu ile İlişisinin Araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.

Gordon, E. 2019. Chemistry and Global Awareness, [<https://chem.libretexts.org/link?8658>], Erişim tarihi:01.06.2020

Güngör, H.K., Akay, B.N. 2016 İlerlemiş Melanomada Kullanılan Güncel Tedavi Yöntemleri Current Treatment Modalities in Advanced Melanoma. **Turkish Journal of Dermatology**, 10:137-44.

Hamilton, R.J., Sewel, P.A. (1982). Introductipn to HPLC, 2 nd ed, Chapman and Hall, New York, 1-160.

Hashemi, P., Raeisi, F., Ghiasvand, A.R., Rahimi, A. 2010. Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein. **Talanta**, 80: 1926–1931.

Hashemi, P., Serenkeh, F.N., Ghiasvand, A.R. 2011. Reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction with multivariate optimization for sensitive HPLC determination of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil. *Analytical Sciences*, 27: 943-947.

Helmenstine, A.M. 2019. What Is the Chemical Composition of Urine? [<https://www.thoughtco.com/the-chemical-composition-of-urine-603883>]. Erişim tarihi:01.06.2020.

Ho. Y.M., Tsoi. Y.K., Leung, K.S.Y. 2013. Highly sensitive and selective organophosphate screening in twelve commodities of fruits, vegetables and

herbal medicines by dispersive liquid–liquid microextraction. **Analytica Chimica Acta**, 775:58– 66.

Işık, B., D., 2017. HPLC method development and validation for the simultaneous determination of flurbiprofen and chlorhexidine gluconate. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, İstanbul.

Işık, G., 2015. Çeşitli gıda örneklerindeki zearalenonun iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu ile zenginleştirilerek HPLC ile tayini. Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

İpekçi, T., Ateş, E., Akın, Y. 2015. Üriner Sistem Taş Hastalıklarında Metabolik Değerlendirme. Derman Tıbbi Yayıncılık (Electronic Journal), DOI: 10.4328/3596, Erişim [<http://www.jcam.com.tr/files/KATD-3596.pdf>]

Johrami, E. Z., Bidari, A., Assadi Y., Hosseini, M.R.M. and Jamali, M.R.. 2007. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry Ultra trace determination of cadmium in water samples. **Analytica Chimica Acta**, 585: 305-311.

Karakaplan, M. 2019. Nar, ayva ve elma sularında fenolik bileşiklerin HPLC ve LC-MS/MS ile incelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi. İstanbul.

Köktürk, M., 2013. Gıda Örneklerindeki Bazı Sentetik Antioksidanların Yüksek-Performans Sıvı Kromatografisi ile Belirlenmesi. Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak.

Kumar, V., Bharadwaj, R., Gupta, G., Kumar, S. 2015. An overview on HPLC method development, optimization and validation process for drug analysis. **Pharmaceutical Chemistry Journal** 2: 30-40.

Kutucu, T. 2008. Telmisartan ve Hidroklorotiazit'in YPSK Yöntemleri ile aynı anda analizi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

- Magnusson, B., Örnemark, U. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed.). ISBN 978-91-87461-59-0, Erişim [www.eurachem.org].
- Martins, A.F., Santos, J.B., Todeschini, B.H. 2017. Occurrence of cocaine and metabolites in hospital effluent - A risk evaluation and development of a HPLC method using DLLME. **Chemosphere** 170:176-182
- Mashayekhi, H. A., Azar, P.A., Tehrani, M.S., Husain, S.W. 2010. Rapid determination of carbamazepine in human urine, plasma samples and water using DLLME followed by RP–LC. **Chromatographia**, 71: 517-521.
- Mohammadi, S. Z., Afzali, D., Taher, M.A. and Baghelani, Y. M. 2009. Ligandless-dispersive liquid-liquid microextraction for the separation of trace amounts of silver ions in water samples and flame atomic absorption spectrometry determination, **Talanta**, 80: 875-879.
- Nijenhuis, C.M., Rosing, H., Schellens, J.H., Beijnen, J.H. 2014. Development and validation of a high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay quantifying vemurafenib in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 88: 630–635.
- Ojeda, C. B., and Rojas, F. S., 2009. Separation and Preconcentration by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Procedure: A Review. **Chromatographia**, 79: 11-49.
- Özgür, D., 2011. Anjiyotensin II Reseptör Blokeri Bazı İlaçların Hidroklorotiyazid ile Kombinasyonlarının UPLC Yöntemi ile Aynı Anda Tayini ve Validasyonu. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Ankara.
- Padro', J.M., Marso'n , M.E., Mastrantonio, G.E., Altcheh, J., Garcí'-Bournissen, F., Reta, M. 2013. Development of an ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of nifurtimox and benznidazole in human plasma. **Talanta** 107:95–102

- Pradad, G.R., Babu, P.S., Rao, K.R.S. 2011. New rverse phase- H.P.L.C. method development and validation for the estimation of in vemuraafenib in formulation. **International Journal Of Research And Reviews In Pharmacy And Applied Sciences**, 13: 140-146.
- Putnam, D.F., 1971. Composition And Concentrative Properties Of Human Urine. Nasacontractor Report, NASA CR-1802.
- Raoufi, A., Ebrahimi, M., Bozorgmehr, M.R. 2019. Application of response surface modeling and chemometrics methods for the determination of Atenolol, Metoprolol and Propranolol in blood sample using dispersive liquid–liquid microextraction combined with HPLC-DAD. **Journal of Chromatography B**, 1132: 121823.
- Razmi, R., Shahpari, B., Pourbasheer, E., Boustanifar, M.H., Azari, Z., Ebadi, A. 2016. Preconcentration and determination of ceftazidime in real samples using dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography with the aid of experimental design. **Journal of Separation Science**, 39: 4116–4123.
- Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseinia, M.R.M., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S. 2006. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography. A**, 1116: 1–9.
- Roche S.p.A., 2014, ZELBORAF 240 mg Film Kaplı Tablet Kısa Ürün Bilgisi, İtalya.
- Rousset, M., Rolf, W., Titier, K., Bouchet, S., Dutriaux, C., Ledard, A.P., Prey, S., Raffin, M.C., Molimard, M. 2017. An UPLC-MS/MS method for the quantification of BRAF inhibitors (vemurafenib, dabrafenib) and MEK inhibitors (cobimetinib, trametinib, binimetinib) in human plasma. Application to treated melanoma patients. **Clinica Chimica Acta**, 470: 8–13.
- Sa, D.J. 2015. Normal Constituents Of Urine. Health & Medicine. Erişim [<https://www.slideshare.net/janicedesa/normal-constituents-of-urine>].

- SANCO. 2011. Method Validation And Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis İn Food And Feed. SANCO/12495
- SANCO. 2019. European Commission. Directorate General Health And Consumer Protection. Technical Active Substance And Plant Protection Products: Guidance For Generating And Reporting Methods Of Analysis In Support Of Pre- And Post-Registration Data Requirements For Annex (Section 4) Of Regulation (Eu) No 283/2013 And Annex (Section 5) Of Regulation (Eu) No 284/2013. SANCO/3030/99 rev.5.
- Skoog, D., Holler, F. J., Nieman, T. A. (1998), Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, USA, s. 673-766.
- Smith, E.F. ve Marshall, J. 1881. Chemical Analysis of The Urine. Presley Blakiston, Filadelfiya.
- Solak, M. 2014. Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri'nde takip edilen melanom hastalarının klinik özellikleri, uygulanan tedavi modaliteleri ve sağ kalımlarının incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Ankara.
- Sparidans, R.W., Durmus, S., Schinkel, A.H., Schellens, J.H., Beijnen, J.H. 2012. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for the mutated BRAF inhibitor vemurafenib in human and mouse plasma. **Journal of Chromatography B**, 890: 144– 147.
- Stolarz, A., Alanso, A., Bolle, W.D., Kühn, H, Richter, S., Quetel, C., Ponzevera, E., Verbruggen, A., Wellum, R. 2005. Preparation of Simulated Urine Samples Containing Certified Uranium For The NUSIMEP 4 Campaign. European Commission Directorate Joint Research Centre, Belçika.
- Strömqvist, M. 2014. The Department of Physics, Chemistry and Biology. Master's Thesis. Development of quantitative methods for the determination of vemurafenib and its metabolites in human plasma. Linköping University Department of Physics, Chemistry and Biology 581 83 Linköping.

- Şanlı, S. 2009. Makrolid Kalıntılarının Sütte Analizi İçin Sıvı Kromatografik Yöntemin Optimizasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Isparta.
- TÜRKAK (Türk Akreditasyon Kurumu). 2019. Metodun Geçerli Kılınması Ve Doğrulanması İçin Bilgilendirme Kılavuzu.
- Vikingsson, S., Strömqvist, M., Svedberg, A., Hansson, J., Höiom, V., Gréen, H. 2016. Novel rapid liquid chromatography tandem massspectrometry method for vemurafenib and metabolites in human plasma, including metabolite concentrations at steady state. **Biomedical Chromatography**, 30: 1234–1239.
- Vuran, F.A. 2013. Ters faz dağılımlı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi ile zeytinyağında bazı fenolik bileşiklerin zenginleştirilmesi ve sıvı kromatografi ile tayini. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Aydın.
- Wu, J., Zhao, H., Du, M., Song, L., Xu, X. 2019. Dispersive liquid–liquid microextraction for rapid and inexpensive determination of tetramethylpyrazine in vinegar. **Food Chemistry** 286: 141–145.
- Xiong, C., Ruan, J., Cai, Y., Tang, Y. 2009. Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 49: 572–578.
- Yao, T., Du, K. 2020. Simultaneous determination of sulfonamides in milk: In-situ magnetic ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC. **Food Chemistry**, 331: 127342.
- Yılmaz, A. 2012. Kimyasal analizlerde metod validasyonu ve verifikasyonu. Turklab Rehber, No:01.

Zheng, Yi., Schoemann, A.T., Sakji, L., Rouquette, P.B., Dupin, N., Mortier, L., Vidal, M., Goldwasser, F., Blanchet, B. 2013. An HPLC-UV method for the simultaneous quantification of vemurafenib and erlotinib in plasma from cancer patients, **Journal of Chromatography B**, 928: 93–97.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Pınar ALP
Doğum Yeri ve Tarihi : İZMİR, 1986

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : İzmir Ege Üniversitesi,
Fen Fakültesi, Kimya Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : İzmir Ege Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Doktora Öğrenimi : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Yabancı Diller : İngilizce

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : pinar@alpilaclama.com.tr