

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



**DİSPERSİF SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYONU YÖNTEMİ
İLE IRINOTECAN'IN ÖNDERİŞTİRİLMESİ VE
UV-GÖRÜNÜR BÖLGE SPEKTROFOTOMETRESİ İLE
TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZ UYSAL

BALIKESİR, OCAK - 2016

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



**DİSPERSİF SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYONU YÖNTEMİ
İLE IRINOTECAN'IN ÖNDERİŞTİRİLMESİ VE
UV-GÖRÜNÜR BÖLGE SPEKTROFOTOMETRESİ İLE
TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZ UYSAL

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Derya KARA FISHER (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Nalan TEKİN

Doç. Dr. Sema BAĞDAT

BALIKESİR, OCAK - 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

DENİZ UYSAL tarafından hazırlanan “**DİSPERSİF SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYONU YÖNTEMİ İLE IRINOTECAN’IN ÖNDERİŞTİRİLMESİ VE UV-GÖRÜNÜR BÖLGE SPEKTROFOTOMETRESİ İLE TAYİNİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 18.01.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Derya KARA FISHER

Üye
Prof. Dr. Nalan TEKİN

Üye
Doç. Dr. Sema BAĞDAT


.....

.....

.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

ÖZET

**DİSPERSİF SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYONU YÖNTEMİ İLE
İRİNOTECAN'IN ÖNDERİŞTİRİLMESİ VE UV-GÖRÜNÜR BÖLGE
SPEKTROFOTOMETRESİ İLE TAYİNİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
DENİZ UYSAL
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. DERYA KARA FISHER)**

BALIKESİR, OCAK - 2016

Irinotecan hidroklorür ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi amacı ile dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yönteminin seçilmesinde; uygulama kolaylığı sağlaması, ekonomik olması, zaman tasarrufu sağlaması ve yüksek geri kazanım sunması etkili olmuştur. Seçilen bu yöntemin geliştirilmesi ve uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Bu çalışmanın amacı ekstraksiyon çözücüsü olarak iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) kullanılarak dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yöntemi ile dere suyu, çeşme suyu ve idrar örneklerinde Irinotecan hidroklorür ilaç etken maddesinin önderiştirilmesini sağlayan dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yönteminin geliştirilmesidir. Çalışmanın birinci basamağında iyi bir ekstraksiyon veriminin elde edilebilmesi için; pH, dispersif çözücü hacmi, iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) hacmi, NaCl derişimi gibi farklı parametrelerin etkileri optimize edilmiştir. Bu optimize şartlar altında geliştirilen yöntemin çeşme suyu, dere suyu gibi doğal su örneklerinde ve idrar örneğinde uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Optimize edilen deneysel koşullar altında Irinotecan hidroklorür ilaç etken maddesine ait gözlenebilme sınırı olarak $0,0487 \text{ mg L}^{-1}$ değeri bulunmuştur. Önerilen yöntem çeşme suyu, dere suyu, idrar örneklerin de başarıyla uygulanmış ve iyi geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Analizi yapılan örneklerdeki Irinotecan hidroklorür ilaç etken maddesinin ortalama geri kazanım değerleri; çeşme suyu için % 99,1, dere suyu için % 109,5, idrar örneği için % 96,1 olarak bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu, kanser ilacı, Irinotecan hidroklorür, iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum), önderiştirme, ekstraksiyon.

ABSTRACT

PRECONCENTRATION AND DETERMINATION OF IRINOTECAN USING A DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION TECHNIQUE WITH UV-VIS DETECTION

MSC THESIS

DENIZ UYSAL

**BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
CHEMISTRY**

(SUPERVISOR: PROF. DR. DERYA KARA FISHER)

BALIKESİR, JANUARY 2016

A dispersive liquid-liquid microextraction method for the preconcentration of Irinotecan hydrochloride drug substance was selected because this method provides ease of application, low cost, time saving and a high recovery yield. The development and applicability of the proposed method were investigated.

This study aims to develop a preconcentration method to determine Irinotecan hydrochloride drug substances in river water, tap water and urine samples using ionic liquid (1-Hexyl-3-methylimidazolium) by dispersive liquid liquid microextraction. In the first step of the study, some experimental parameters such as pH, volume of dispersive solvent, ionic liquid volume and NaCl concentration were optimized to investigate the influence of different parameters on the extraction yield. The applicability of the proposed method was investigated under these optimized conditions in tap water, river water and urine.

The limit of detection of Irinotecan was found to be 0.0487 mg L^{-1} under the optimized experimental conditions. The proposed method was successfully applied to samples such as tap water, river water and urine samples and good recovery values were obtained. The average recovery values of Irinotecan determined were 99.1% for the water, 109.5% for the river water and 96.1% for urine samples.

KEYWORDS: dispersive liquid-liquid microextraction, cancer drug, Irinotecan hydrochloride, ionic liquid (1-Hexyl-3-methylimidazolium), preconcentration, extraction.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
2. IRINOTECAN HİDROKLORÜR	4
3. İYONİK SIVI (1-Hegzil-3-metilimidazolyum)	6
4. ÖNDERİŞTİRME	8
4.1 Geri Kazanım Verimi.....	8
4.2 Önderiştirme İşlemlerinde Örnek Miktarı.....	9
4.3 Önderiştirme Teknikleri.....	9
4.3.1 Çöktürme ve Birlikte Çöktürme.....	9
4.3.2 Buharlaştırma.....	10
4.3.3 Katı Faz Ekstraksiyonu.....	10
4.3.4 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu.....	11
4.3.5 İyon Değişimi Ekstraksiyonu.....	11
4.3.6 Sıvı-sıvı Ekstraksiyonu.....	11
4.3.7 Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu.....	12
4.3.7.1 Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu Verimini Etkileyen Parametreler.....	13
4.3.7.2 pH Etkisi.....	13
4.3.7.3 Ekstraksiyon Çözücüsünün Seçimi ve Hacmin Etkisi.....	14
4.3.7.4 Dispersif Çözücünün Seçimi ve Hacminin Etkisi.....	14
4.3.7.5 Ekstraksiyon Süresinin Etkisi.....	15
4.3.7.6 Tuz İlavesi Etkisi.....	15
5. UV-GÖRÜNÜR BÖLGE SPEKTROSKOPİSİ	16
6. ÇALIŞMANIN AMACI	17
7. MATERYAL VE METOT	18
7.1 Materyal.....	18
7.1.1 Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler.....	18
7.1.2 Deneylerde Kullanılan Reaktifler.....	19
7.1.3 Metal Standartları.....	19
7.1.4 Tampon Çözeltilerin Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar.....	20
7.1.5 Kullanılan Asit ve Bazlar.....	20
7.1.6 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	21
7.1.6.1 1. Irinotecan çalışma çözeltisi.....	21
7.1.6.2 2. Irinotecan çalışma çözeltisi.....	21
7.1.6.3 Tampon Çözeltilerin Hazırlanılmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	21
7.1.6.4 Tampon Çözeltileri.....	22
7.2 Yöntem.....	23
7.2.1 Optimum Ekstraksiyon Şartlarının Belirlenmesi.....	23

7.2.1.1 pH'ın Etkisi	23
7.2.1.2 İyonik Sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) Hacminin Etkisi ...	24
7.2.1.3 Dispersif Çözücü Cinsinin Etkisi	25
7.2.1.4 Dispersif Çözücü Hacminin Etkisi	25
7.2.1.5 NaCl Derişiminin Etkisi	26
7.2.1.6 Çalkalama Süresinin Etkisi.....	27
7.2.1.7 Santrifüj Süresinin Etkisi.....	27
7.3 Yabancı İyon Etkisi	28
7.4 Önderiştirme Deneyleri	29
7.5 Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	30
7.6 Geliştirilen Yöntemin Analitik Özellikleri	31
7.7 Örnek Analizleri	31
7.7.1 Çeşme Suyu Analizi	31
7.7.2 Dere Suyu Analizi	33
7.7.3 İdrar Analizi.....	34
8. BULGULAR	36
8.1 Optimum Şartların Belirlenmesi.....	36
8.1.1 pH Etkisi	36
8.1.2 İyonik Sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) Hacminin Etkisi	38
8.1.3 Dispersif Çözücü Cinsinin Etkisi	39
8.1.4 Dispersif Çözücü Hacminin Etkisi	40
8.1.5 NaCl Derişiminin Etkisi	41
8.1.6 Çalkalama Süresinin Etkisi.....	42
8.1.7 Santrifüj Süresinin Etkisi.....	43
8.2 Yabancı İyon Etkisi	44
8.3 Önderiştirme Deneyleri	45
8.4 Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	46
8.5 Geliştirilen Yöntemin Analitik Özellikleri	48
8.6 Örnek Analizleri	48
8.6.1 Çeşme Suyu Analizi	48
8.6.2 Dere Suyu Analizi	50
8.6.3 İdrar Analizi.....	51
9. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
9.1 Optimum Ekstraksiyon Şartlarının Belirlenmesi.....	53
9.1.1 pH Etkisi	53
9.1.2 İyonik Sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) Hacminin Etkisi	53
9.1.3 Dispersif Çözücü Cinsinin Etkisi	53
9.1.4 Dispersif Çözücü Hacminin Etkisi	54
9.1.5 NaCl Derişiminin Etkisi	54
9.1.6 Çalkalama Süresinin Etkisi.....	54
9.1.7 Santrifüj Süresinin Etkisi.....	55
9.2 Yabancı İyon Etkisi	55
9.3 Önderiştirme Deneyleri	55
9.4 Geliştirilen Yöntemin Örneklerde Uygulanması	56
9.4.1 Çeşme Suyu Analizi	56
9.4.2 Dere Suyu Analizi	56
9.4.3 İdrar Analizi.....	57
9.5 Sonuç	57
10. KAYNAKLAR	59

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Kanser hücreleriyle (pembe), lenfositlerin (turuncu) savaşı.	3
Şekil 2.1: Irinotecan hidroklorür molekül yapısı.....	4
Şekil 2.2: Camptotheca Acuminata bitkisi	5
Şekil 3.1: 1-Hegzil-3-metilimidazolyum molekül yapısı	6
Şekil 4.1: Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yönteminin uygulanış şeması	12
Şekil 5.1: Elektromanyetik spektrum	16
Şekil 8.1: pH 4'te elde edilen ekstraktda Irinotecan' ın spektrumu	36
Şekil 8.2: Irinotecan ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi üzerine pH etkisi .	38
Şekil 8.3: Irinotecan ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi üzerine iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) hacminin etkisi.....	39
Şekil 8.4: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine dispersif çözücü hacminin etkisi	41
Şekil 8.5: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine NaCl derişiminin etkisi	42
Şekil 8.6: Irinotecan ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi üzerine çalkalama süresinin etkisi	43
Şekil 8.7: Irinotecan ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi üzerine santrifüj süresinin etkisi	44
Şekil 8.8: Irinotecan ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi amacıyla elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	47
Şekil 8.9: Irinotecan katılan çeşme suyu örneğinde standart katma yöntemi ile Irinotecan ilaç etken maddesi için elde edilen kalibrasyon eğrisi	49
Şekil 8.10: Irinotecan katılan dere suyu örneğinde standart katma yöntemi ile Irinotecan ilaç etken maddesi için elde edilen kalibrasyon eğrisi	51

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 7.1: Metal iyonları ve markaları.....	19
Tablo 7.2: Anyonlar ve markaları	19
Tablo 7.3: Organik madde ve markası	20
Tablo 7.4: Tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler	20
Tablo 7.5: İnorganik asit ve bazlar.....	21
Tablo 7.6: Önderiştirme örnek çözeltileri	29
Tablo 7.7: Standart katma yöntemi için hazırlanan standart çözeltilerin içeriği	32
Tablo 7.8: Standart katma yöntemi için hazırlanan standart çözeltilerin içeriği	33
Tablo 8.1: pH 4'te elde edilen maksimum absorbands değerleri	37
Tablo 8.2: pH 2-9 arasında elde edilen ekstraktların 256 nm'de ki absorbands değerleri.....	37
Tablo 8.3: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) hacminin etkisi.....	39
Tablo 8.4: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine dispersif çözücü cinsinin etkisi	40
Tablo 8.5: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine dispersif çözücü hacminin etkisi	40
Tablo 8.6: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine NaCl derişiminin etkisi	42
Tablo 8.7: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine çalkalama süresinin etkisi.....	43
Tablo 8.8: Irinotecan ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi üzerine santrifüj süresinin etkisi.....	44
Tablo 8.9: Yabancı iyon etkisi	45
Tablo 8.10: Önderiştirme etkisi.....	46
Tablo 8.11: Irinotecan hidroklorür için kalibrasyon değerleri	47
Tablo 8.12: Irinotecan katılan çeşme suyu örneğinden elde edilen sonuçlar.....	49
Tablo 8.13: Çeşme suyu örneğinden elde edilen sonuçlar	49
Tablo 8.14: Irinotecan katılan dere suyu örneğinden elde edilen sonuçlar	50
Tablo 8.15: Dere suyu örneğinden elde edilen sonuçlar	51
Tablo 8.16: İdrar örneğinden elde edilen sonuçlar	52

SEMBOL LİSTESİ

- R** : Geri kazanım
% R : Yüzde geri kazanım
ppb : Milyarda bir birim (Parts per billion)
LOD : Gözlenebilme sınırı (Limit of detection)
LOQ : Tayin sınırı (Limit of quantification)
m : Kalibrasyon grafiğinin eğimi
R² : Korelasyon katsayısının karesi, tayin katsayısı
% RSD : Yüzde bağıl standart sapma

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca hem derslerimde, hem de tez çalışmalarında bana her daim yardımcı olan, anlayış gösteren, ilgi ve alakasını her zaman yanımda hissettiren, kendisini tanıdıkça sevdiğim, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum tez danışmanım, değerli ve saygı değer hocam Prof. Dr. Derya KARA FISHER'a en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimimde de hocam olan ve yüksek lisans öğrenimimde de hem derslerimdeki, hem tezimdeki deneysel çalışmalarında yaşadığım zorluklar ve sıkıntılarda yanımda olan ve pratik çözümler sunan, bu konuda son derece başarılı olan, bana destek olan Doç. Dr. Cennet KARADAŞ'a teşekkür ederim.

Lisans eğitimimin son yıllarında daha iyi tanıma fırsatı yakaladığım ve Yüksek lisans eğitimimin de başından sonuna her aşamasında yanımda olan dostluğunu ve bilgeliğini esirgemeyen yegâne dostum Nesrin TOPAÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu yaşıma kadar maddi manevi her daim yanımda olan, yardımlarının ve varlıklarının bana verdiği huzuru her zaman yanımda hissettiğim canım annem Aynur UYSAL'a, sevgili babam Hasan UYSAL'a ve biricik kardeşim M. Anıl UYSAL'a çok teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun son yıllardaki hızlı artışı ve teknolojinin ilerlemesiyle birlikte, düzensiz kentleşme oranının artması, insanların aşırı tüketim isteği, enerji ve besin yetersizliğinin giderek daha da baş göstermesi, çevre kirliliğini beraberinde getirmiştir [1]. Bu tür çevre ve sağlık sorunlarının giderek artması analitik kimyayı önemli kılmıştır. Bundan dolayı çevre kirliliği, elektronik, sanayi gibi birçok değişik alanda etkilerin araştırılması ve tayinlerinin yapılması yüksek derecede önem kazanmıştır [2, 3].

Analizi yapılacak örneklerde analitik yöntemlerle tayin edilemeyecek kadar küçük derişimlerde bulunan elementlerin, ölçülebilecek seviyeye getirilmesi için önderiştirme yöntemleri kullanılır [4]. Önderiştirme yöntemlerinde kullanılan ayırma ve zenginleştirme işlemleri analitik uygulamalarda oldukça yaygın kullanılan en önemli basamaktır. Bu uygulamalarda kullanılan başlıca yöntemler; birlikte çöktürme, sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE), katı-faz ekstraksiyonu (SPE), iyon değişimi ekstraksiyonu (IE), bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE) ve dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) gibi yöntemlerdir. Bu önderiştirme yöntemlerinin temel prensibi, sulu fazdan bir organik faza veya bir katı destek üzerine analitin aktarılmasıdır. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi, tüm bu yöntemler içinde son yıllarda daha popüler hale gelmiştir. DLLME, sulu çözüldüden eser düzeyde zenginleştirilme yapılabilmesi için basit ve etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde amaç, sulu fazda bulunan analitin, ekstraksiyon çözücüsü kullanılarak organik faza geçirilmesidir [5].

Bu çalışmada dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yöntemi, Irinotecan hidroklorür ilacı etken maddesinin önderiştirilmesinde kullanıldı. Irinotecan hidroklorür ilacı kanser tedavisinde anti kanserojen olarak kullanılan ilaçlardan biridir. Özellikle kolon ve rektum kanserlerinde kullanım alanı bulmuş intravenöz yolla uygulanır. Kamptotesinin suda eriyebilen, kimyasal olarak modifiye edilmiş

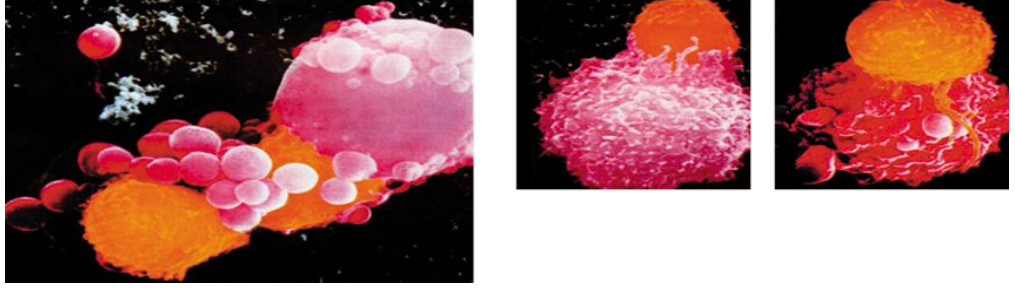
doğal antibiyotik bir türevi olup tümör hücrelerinin gelişimini önleyen ve bağışıklık sistemine baskı uygulayan bir ilaçtır [6].

Kanser, günümüz ve çağımız boyunca süregelen en sık ölüm olayı gözlenen evrensel hastalıklardan biridir. Kanser, vücudumuzda bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz ve kontrolsüz olarak bölünüp çoğalmasıyla meydana gelen anormal hücreler bütünüdür.

Vücudumuzda tüm organlar hücrelerden oluşur. Hücreler vücudumuzun en küçük yapıtaşlarıdır ve ancak mikroskopla görülebilirler. Sağlıklı vücut hücreleri (kas ve sinir hücreleri hariç) bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların (vücut içi ve dışındaki) onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar. Fakat bu yetenekleri de sınırlıdır. Sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre gerektiği yerde ve gerektiği kadar bölüneceğini bilir. Buna apoptosis yani hücrenin programlı ölümü denir [7].

Buna karşın kanser hücreleri, bu bilinci kaybeder, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Kanser hücreleri birikerek tümörleri (kitleleri) oluştururlar, tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir [7].

Kanserler oluşmaya başladıkları organ ve mikroskop altındaki görünüşlerine göre sınıflandırılırlar. Farklı tipteki kanserler, farklı hızlarda büyürler, farklı yayılma biçimleri gösterirler ve farklı tedavilere cevap verirler. Bu nedenle kanser hastalarının tedavisinde, var olan kanser türüne göre farklı tedaviler uygulanır [7]. Şekil 1.1'de kanser hücreleriyle (pembe), lenfositlerin (turuncu) savaşı gösterilmiştir.



Şekil 1.1: Kanser hücreleriyle (pembe), lenfositlerin (turuncu) savaşı.

Kanserin sebebi henüz kesin olarak bilinmemektedir. Kanser hastalığı için iki grup risk faktörü vardır. Kanser için risk faktörleri yaşam şekillerine, yaşa, cinsiyete ve aile öykülerine bağlı olarak değişir. Bir başka risk grubu ise çevresel faktörlerdir [7].

- Sigara, alkol kullanımı,
- Uzun süre ve tehlikeli saatlerde güneş altında kalma,
- Aşırı dozda röntgen ışınına maruz kalma,
- Bazı kimyasal maddeler (katran, benzin, boya maddeleri, asbest vb.)
- Bazı virüsler
- Hava kirliliği
- Radyasyona maruz kalma,
- Kötü beslenme alışkanlığı

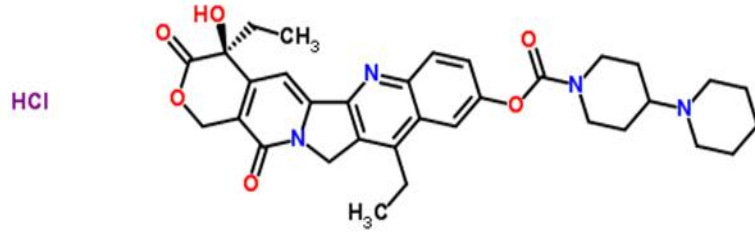
En sık görülen kanser türleri; meme kanseri, prostat kanseri, akciğer kanseri, mide kanseri, bağırsak kanseri, rahim ağzı kanseridir. Kanser hastalığının tedavisinde; kemoterapi, radyoterapi, cerrahi ve immünoterapi yöntemlerinden herhangi biri tedavide kullanılmaktadır. Hastalığın tedavi edilebilirliği açısından erken teşhis önemlidir.

2. IRINOTECAN HİDROKLORÜR

Irinotecan hidroklorür ilacının özellikleri;

Yapısal Formülü:

Şekil 2.1’de irinotecan hidroklorür molekül yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Irinotecan hidroklorür molekül yapısı.

Molekül Formülü: $C_{33}H_{38}N_4O_6$

Molekül Ağırlığı: 623,139 g/mol

Irinotecanın susuz HCl tuzu katı olup, sarı kristal toz halindedir. Suda çok az çözünür, ancak 80 °C de 15 dakika ısıtıldıktan sonra berrak sarı çözeltisi elde edilebilmektedir. Çözelti 365 nm’de UV ışığında mavi/beyaz floresans özelliği göstermektedir. 20 mg/mL lik sulu çözeltisinin pH’ı yaklaşık 3,7’dir. Oda sıcaklığında (25 °C) 18 ay kararlıdır [8].

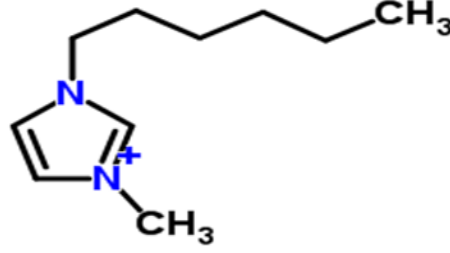
Ayrıca irinotecan, kamptotesinin suda eriyebilen, kimyasal olarak modifiye edilmiş doğal antibiyotik bir türevi olup tümör hücrelerinin gelişimini önleyen ve bağışıklık sistemine baskı uygulayan bir ilaçtır. Çin ve Tibet bölgelerinde doğal olarak yetişen *Camptotheca Acuminata* kaynaklıdır [6]. Şekil 2.2’de *Camptotheca Acuminata* bitkisinin görünümü gösterildi.



Şekil 2.2: Camptotheca Acuminata bitkisi.

3. İYONİK SIVI (1-Hegzil-3-metilimidazolyum)

Şekil 3.1’de 1-Hegzil-3-metilimidazolyum molekül yapısı gösterilmiştir.



Şekil 3.1: 1-Hegzil-3-metilimidazolyum molekül yapısı.

Molekül Formülü: C₁₀H₁₉N₂

Molekül Ağırlığı: 167,271 g/mol

İlk iyonik sıvı Paul Walden tarafından 1914 de keşfedilmiş ethylammonium nitrate ([EtNH₃][NO₃], erime noktası 13-14 °C)’dır [9]. İyonik sıvıların öne çıkan en önemli özellikleri ihmal edilebilir düzeyde buhar basıncına sahip olmaları ve bu yüzden atmosfere karışmasının çok az olması ve geleceğin "yeşil kimya" sı için bir çözüm olarak görülmesidir [10].

İyonik sıvılar, hidrofilik polar uç ve hidrofobik hidrokarbon zincirli amfifilik grup içeren, oda sıcaklığında sıvı halde bulunan ve son zamanlarda yaygın olarak kullanılan çözücülerdir. İyonik sıvıların, uçucu olmayan (çevre dostu), yüksek termal kararlılığa sahip, alev almaz, organik ve inorganik maddeleri iyi çözebilme özellikleri vardır. Bunların dışında yüksek elektrik iletkenlikleri, ayarlanabilir viskozite ile su ve organik çözücüler ile karışabilen özelliklere sahip oldukları için sentezlerde, ayırma proseslerinde, nanomateryal teknolojilerinde, elektrokimyasal uygulamalarda geniş kullanım alanlarına sahiptir [11].

İyonik sıvılar genellikle sudan daha yoğundur. Sonuç olarak bir iyonik sıvı su ile karışmazsa 2 faz oluşur ve aşağıda kalır. Bu çalışmada önderiştirme yöntemi olan dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi uygulanırken, ekstraksiyon çözücüsü olarak bir iyonik sıvı olan 1-Hegzil-3-metilimidazolyum kullanıldı.

1-Hegzil-3-metilimidazolyum'ın birçok reaksiyonlar için çözücü ve yüzey aktif madde, güneş pilleri için elektrolit, katı faz ekstraksiyon çalışmaları için sorbent, kromatografik çalışmalar için sabit faz olarak kullanıldığı birçok değişik kullanım alanları bulunmaktadır.

4. ÖNDERİŞTİRME

Analizi yapılacak örneklerde analitiksel yöntemlerle tayin edilemeyecek kadar küçük derişimlerde bulunan elementlerin, ölçülebilecek seviyeye getirilmesi için önderiştirme yöntemi kullanılır [4]. Önderiştirme yöntemlerinde kullanılan ayırma ve zenginleştirme işlemleri analitik uygulamalarda oldukça yaygın kullanılan en önemli basamaktır. Bu uygulamalarda kullanılan başlıca yöntemler; birlikte çöktürme, sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE), katı-faz ekstraksiyonu (SPE), iyon değişimi ekstraksiyonu (IE), bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE) ve dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) gibi yöntemlerdir. Bu önderiştirme yöntemlerinin temel prensibi, sulu fazdan organik faza analitin geçirilmesidir.

4.1 Geri Kazanım Verimi

Geri kazanım,

$$R=q_c/q_s \quad (4.1)$$

$$\%R=(q_c/q_s).100 \quad (4.2)$$

şeklinde ifade edilir. R geri kazanımı, q_c önderiştirmeden sonraki, q_s önderiştirmeden önceki analit miktarını ifade etmektedir (4.1, 4.2).

Geri kazanımın (R), % 100 ya da daha düşük değerlere sahip olması beklenir. Geri kazanım veriminin düşmesine neden olan etkenler; çözme ve önderiştirme basamakları sırasındaki buharlaşma olayı, ayırmanın tam olarak gerçekleşmemiş olması, dikkatsiz çalışmaya bağlı kayıplardır. Özellikle düşük derişimlerde çalışılırken daha çok kayıp tehlikesi oluşmaktadır. Geri kazanım verimi, örnekteki derişim seviyesi ile de bağlantılıdır [12].

4.2 Önderiştirme İşlemlerinde Örnek Miktarı

Alınacak örnek miktarı, kullanılacak olan tayin tekniğinin gözlenebilme sınırına (LOD), analizi yapılacak olan analitin derişimine bağıdır. Özellikle 0,1-10 gramlık katı örnekler veya 10-100 mL'lik sıvı örnekler ppb veya ppb'den daha düşük seviyedeki analitlerin önderiştirilmesinde kullanılır [12].

4.3 Önderiştirme Teknikleri

4.3.1 Çöktürme ve Birlikte Çöktürme

Çöktürme işlemleri, analizi yapılacak maddenin uygun bir reaktifle az çözünen bir çökelek halinde çöktürülmesidir. Bu çökelek süzülür ve içerisinde bulunabilecek safsızlıklar yıkandıktan sonra uygun ısı ile işlemlerle bileşimi belirli olan bir ürüne dönüştürülür. Bu ürün tartıldıktan sonra madde tayini gerçekteşmiş olur [15].

Çöktürme yöntemi; matriks çöktürülmesi ve eser elementlerin çöktürülmesi olarak iki şekilde olur. Çöktürücü gruplar olarak kuvvetli asitlerin tuzları, zayıf asitlerin tuzları, serbest asitler ve element halindeki maddeler kullanılır [15].

Birlikte çöktürme yönteminde ise madde verilen şartlar altında kendi katı fazını oluşturamıyorsa bazı çökelek oluşturan bileşenler ortama eklenerek yüzey adsorpsiyonu, karışık kristal oluşumu, hapsetme veya mekanik sürüklenme yoluyla çöktürme işlemleri tamamlanır [16].

Ana bileşenden analiti ayırmak için çöktürme yöntemlerinin kullanılması tercih edilmez. Çünkü ana bileşen çökerken analiti de sürükleyebilir ve birlikte çökme gerçekteşerek analizi yapılacak maddenin kaybına neden olur [12].

4.3.2 Buharlaştırma

Bir sıvı çözeltinin, kendisini oluşturan moleküllerinin, sıcaklık ve basınç etkisiyle sıvı yüzeyinden, matriks veya analitin hangisinin uçuculuğu daha yüksek ise o uçurularak gaz evresine dönüşmesi olayıdır. Bu yöntem çok tercih edilmez. Çünkü buharlaştırma sırasında önderiştirilecek analitin buharlaşıp kaybolmasına, yavaş gerçekleşmesinden dolayı zaman kaybına, tayin kaplarının yüzeylerinde çok fazla tortu oluşturarak madde kaybına neden olmaktadır [17].

4.3.3 Katı Faz Ekstraksiyonu

Adsorpsiyon, bir katı veya sıvının iyon ya da moleküllerinin, sınır yüzeyindeki derişimlerinin değişmesi olayıdır. Bu olay katı yüzey molekülleri; gaz ya da sıvının atomları ya da iyonlarını çekip yüzeyinde tutarak birikmesiyle ortaya çıkar. Adsorplayan katı madde adsorban ve birikim gösteren madde adsorbat olarak tanımlanır. Adsorpsiyon hızı ve adsorplanan madde miktarı adsorbanın yüzey büyüklüğüne ve gözenekli yapı gibi özelliklerine bağlı olarak değişir [18].

Katı faz ekstraksiyonu (SPE) yöntemi, temel olarak bir sıvı (numune ve matriks) ve bir katı (sorben) fazdan meydana gelmektedir. Yöntemin amacı, katı bir adsorban madde ile çözelti içindeki analitin saflaştırılmasını ve konsantre edilmesini sağlamaktır. Bu yöntem, sıvı halde bulunan analiti tutan adsorban madde içeren küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kolonu, bir kartuş veya disk içerisine çeşitli tutucu maddelerin doldurularak geçirilmesi işlemidir [26]. Katı faz ekstraksiyonun avantajları; çözücü kullanımını numune hazırlama zamanını çözücüye maruz kalmayı ve atık maliyetini oldukça azaltmasıdır. Bu yüzden kimya, çevre, klinik, gıda ve endüstriyel kimya alanlarında ayırma ve zenginleştirme amacıyla kullanılabilir [27].

4.3.4 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu, ayrılması istenen metal iyonunu içeren çözelti ile etkileşerek kompleksleşir ve yüzey aktif madde ilavesi ile misel yapıyı oluşturur. Daha sonra bu misel yapılı çözeltiye bulutlanma noktasına meydana gelene kadar ısı işlem uygulanarak iki ayrı faz elde edilir. Yüzey aktifçe zengin faz içerisinde ilk basamaktaki çözelti hacmine nazaran çok daha küçük bir hacim içerisine hapsedilmiş yani zenginleştirilmiş olur. Yöntemin avantajları; basit olması, düşük maliyetli olması, güvenilir olması, çevreci olması ve de en önemlisi yüksek önderiştirme faktörüne sahip olmasıdır [29].

4.3.5 İyon Değişimi Ekstraksiyonu

İyon değişimi ekstraksiyonu yönteminde, çözelti içinde bulunan iyonların, temas ettikleri katı maddenin yapısında bulunan aynı yüklü iyonlarla yer değiştirerek dengeye gelmesi esasına dayanır. Örnek çözeltinin iyon değiştirici reçineden geçirilmesi sırasında analit iyonları reçinede tutunmalı ve matriks tutunmayarak akıp gitmelidir. Bu işlem de seçimli bir ayırma sağlar. İyon değiştirici reçineler yalnız toz halinde olmayıp, membran, kağıt, makrogranüller olarak bulunur. Gözenekli, çözünmeyen bileşiklerdir. Katyon değiştiren reçinelere katyonik reçine, anyon değiştiren reçinelere de anyonik reçine denir [27].

4.3.6 Sıvı-sıvı Ekstraksiyonu

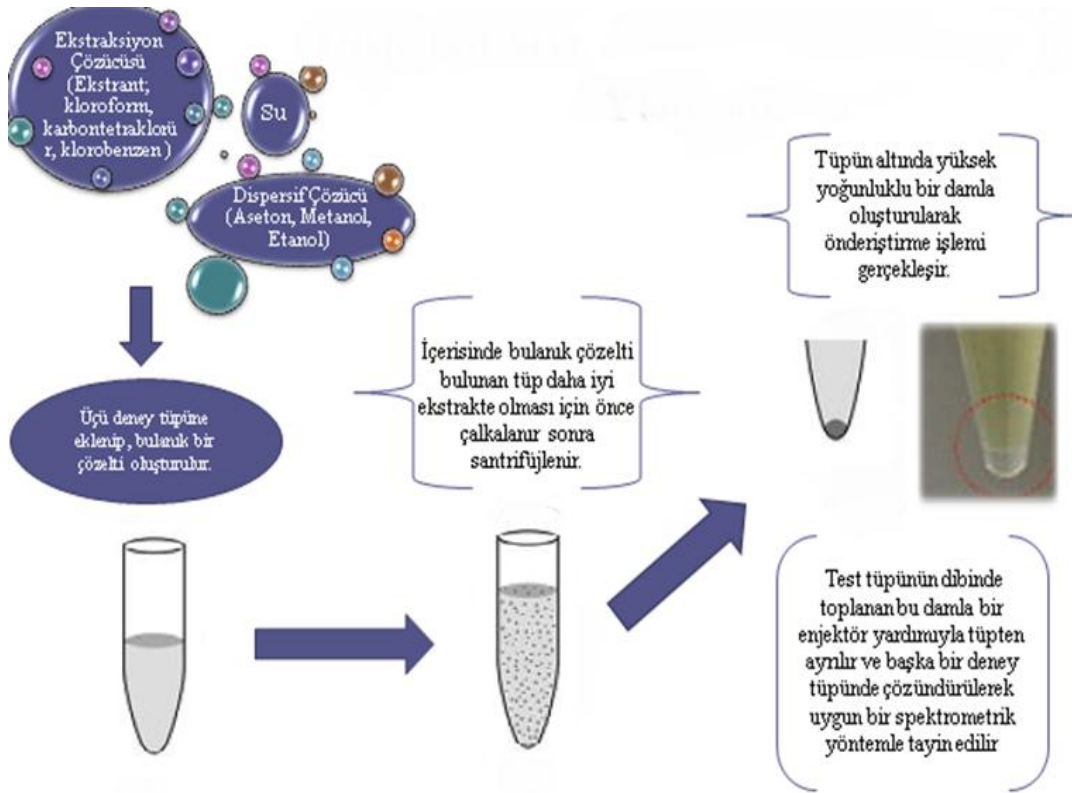
Ekstraksiyon, sulu faz ile organik faz içerir. Birbiriyle karışmayan bu iki sıvı faz arasında bir ya da daha çok çözünen maddenin dağılımı olarak tanımlanır. Ekstraksiyon tekniği kolay, basit, hızlı ve temiz olduğundan ayırma ve önderiştirme işlemleri daha sağlıklı yapılabilmektedir. Bu teknik düşük miktarlardaki örneklere uygulanabileceği gibi, yüksek miktardaki örneklere de uygulanabilmektedir [16].

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, sulu bir örnek (verici faz) içerisinde su ile karışmayan organik çözücü (alıcı faz) yardımıyla çözülmüş maddelerin başka bir

sıvı faz içerisine alınmasıdır. Yöntemin en büyük avantajı hızlı ve basit olması nedeniyle kullanım kolaylığı sağlaması tercih edilme sebebidir [19].

4.3.7 Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu

2006 yılında Assadi ve arkadaşları tarafından geliştirilen ekstraksiyon yöntemi, dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemidir (Rezaee, Assadi, Milani Hosseini, Aghaee, Ahmadi, Sana ve diğer). Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yöntemi, üçlü çözücü sistemine dayanır ki bunlar; dispersiyon çözücüsü, su ve ekstraksiyon çözücüsü şeklindedir. Yöntem hedef maddeleri içeren sulu örnek içerisine dispersiyon çözücüsü ve ekstraksiyon çözücüsü karışımının hızlı bir şekilde ilave edilip, daha iyi ekstrakte olması için santrüflüenerek ekstraksiyon çözücüne geçmiş olan analitin yüksek yoğunluklu mikrodamlacık oluşturularak analitin önderiştirilmesi ilkesine dayanmaktadır. Şekil 4.1’de dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yönteminin uygulanış şeması gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yönteminin uygulanış şeması.

Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yöntemi aynı zamanda hem ayırma hem de önderiştirme yöntemi olarak kullanılabilir. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yönteminin avantajları; hızlı gerçekleşmesi, çalışma kolaylığı sağlaması, ucuz olması, yüksek geri kazanım vermesi, yüksek önderiştirme faktörüne sahip olması, zaman tasarrufu sağlaması, yüksek verimlilik, organik çözücülerin az tüketimi, örnek ve ekstrant damlacıkları arasındaki geniş temas yüzeyi madde transferini hızlandırmasından dolayı geniş kullanım alanına sahiptir. En büyük dezavantajı da, klorlu çözücülerin yüksek pikler vererek hataya sebep olmasıdır. İyonik sıvılar kullanıldığında bu dezavantaj da ortadan kalkar.

4.3.7.1 Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu Verimini Etkileyen Parametreler

Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonun da analitin ekstraksiyon verimini etkileyen parametreleri şu şekildedir:

- o pH etkisi,
- o Ekstraksiyon çözücüsünün seçimi ve hacminin etkisi,
- o Dispersif çözücüsünün seçimi ve hacminin etkisi,
- o Ekstraksiyon süresinin etkisi,
- o Tuz etkisi.

4.3.7.2 pH Etkisi

Analit üzerine ekstraksiyon veriminin incelenmesi için en önemli basamak pH etkisidir. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yönteminin uygulanması sırasında üçlü çözücü olan dispersiyon çözücüsü, su ve ekstraksiyon çözücüsünün analit ile daha iyi etkileşip ekstrakte olması için uygun tampon çözeltiler kullanılarak belli bir pH aralığında çalışılması gereklidir.

4.3.7.3 Ekstraksiyon Çözücüsünün Seçimi ve Hacmin Etkisi

Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yönteminde uygun ekstraksiyon çözücüsünün seçimi yöntemin optimizasyonu açısından en önemli değişkendir. Ekstraksiyon çözücüsünün seçilmesinde iki önemli nüans vardır: ilki sudan daha düşük yoğunluğa sahip olup su ile karışmamasıdır. İkincisi ise ekstrakte yeteneği iyi olmalıdır ki daha iyi ekstraksiyon gerçekleştirilebilsin. Ekstraksiyon çözücüsü olarak genellikle karbon tetraklorür, kloroform, karbon disülfür, diklorometan ve iyonik sıvıların kullanımı söz konusudur [20, 21].

Ekstraksiyon çözücü hacminin, zenginleştirme faktörü üzerine etkisi önemlidir. Çözücü hacminin yüksek olması, santrifüj sonrası elde edilen organik faz hacminin artmasına sebep olduğu gibi zenginleştirme faktörünün de düşük çıkmasına sebep olur. Bu yüzden ekstraksiyon çözücü hacmini düşük tutarak hem zenginleştirme faktörünün yükselmesi hem de hedef analitlerin belirlenmesindeki duyarlılığı artırmış oluruz. Genel ekstraksiyon çözücü hacmi 5-100 µL aralığında bir değerde seçilmektedir [22].

4.3.7.4 Dispersif Çözücünün Seçimi ve Hacminin Etkisi

Dispersif çözücü seçilirken, hem su ile karışabilir olabilmesi hem de ekstraksiyon çözücüsünde çözünebiliyor olması dikkat edilecek önemli noktalardandır. İki faz içinde dağılım gösteren dispersif çözücü bulutumsu (su/dispersif çözücü/ekstraksiyon çözücüsü) bir görüntü oluşturur. Sulu faz ve ekstraksiyon çözücüsü arasındaki yüzey alanına bağlı olarak ekstraksiyon veriminin artması uygun dispersif çözücü seçimiyle gerçekleşir. Yaygın kullanıma sahip dispersif çözücüler metanol, etanol, asetonitril, aseton ve tetrahidrofurandır [22].

Dispersif çözücünün hacmindeki değişimler de santrifüj işlemi sonrası elde edilen organik faz içerisindeki analitin hacmini etkilemektedir. Sabit bir faz hacmi elde edebilmek için dispersif ve ekstraksiyon çözücülerinin hacmini bu doğrultuda değiştirmek gerekir [23].

4.3.7.5 Ekstraksiyon Süresinin Etkisi

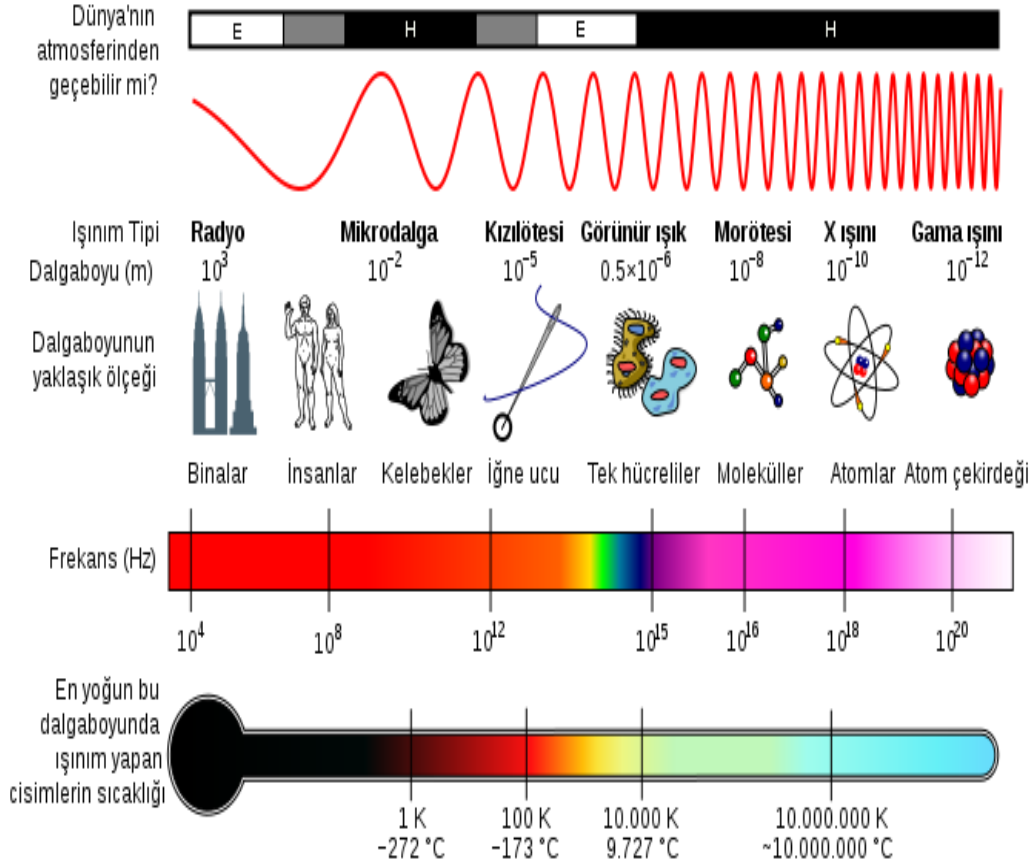
Ekstraksiyon süresinin etkisinin önemi, sulu faz ile ekstraksiyon çözücüsünün bir biri içerisinde dağılarak analitin ekstraksiyon fazına geçebilmesi için geçen süre olmasıdır. Denge durumuna ulaşıp, gerekli optimizasyon şartları sağlandığında da ekstraksiyon işlemi çok kısa sürede gerçekleşir [24].

4.3.7.6 Tuz İlavesi Etkisi

Analitin ekstraksiyon verimini arttırmada genellikle tuz dışlama etkisi nedeniyle tuz eklenir. Tuz dışlama etkisini geliştirmede % 0-10 (w/v) aralığında NaCl derişimi ile çalışılarak ekstraksiyon verimliliği incelenir [25].

5. UV-GÖRÜNÜR BÖLGE SPEKTROSKOPİSİ

Ultraviyole-Görünür bölge (UV-VIS) spektroskopisi moleküllerdeki elektronik geçişlerin verdiği spektrumları konu alır ve analiz edilecek maddenin dalga boyunun bir fonksiyonu olarak numunenin absorbans ya da geçirgenliğini ölçmek için kullanılan bir cihazdır [13,14]. Ultraviyole ve görünür ışınların absorpsiyon ölçümleri çok sayıda inorganik ve organik bileşiğin kalitatif ve kantitatif analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır [14]. Laboratuvarlarda kullanılan spektrofotometre cihazları 190 nm ile 900 nm dalga boyu aralığında çalışılmaktadır. Şekil 5.1’de elektromanyetik spektrumu görünümü verilmiştir.



Şekil 5.1: Elektromanyetik spektrum.

6. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu çalışmada, Irinotecan hidroklorür ilacı etken maddesinin önderiştirilmesi ve UV-Görünür bölge spektroskopisi ile tayini için deriştirme yöntemi olarak sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemlerinden biri olan dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi seçildi. Düşük konsantrasyondaki Irinotecan hidroklorür ilacının uygun ekstraksiyon çözücüsü ve dispersif çözücüsü ile sulu fazdan organik faza ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Sulu ve organik faz santrifüj ile ayrıldıktan sonra tüpün dibinde biriken yüksek yoğunluklu mikrodamlacık yani organik faz alındı. Organik faz alındıktan sonra, uygun dispersif çözücü ile analit çözelti fazına alındı ve UV-Görünür bölge spektroskopisi ile analite ait absorpsiyon sinyalleri okunarak tayini yapıldı. Geliştirilen yöntemin optimizasyon şartları sağlandıktan sonra, yöntem gerçek örneklere uygulandı.

7. MATERYAL VE METOT

7.1 Materyal

7.1.1 Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler

Tüm reaktifler ve çözeltiler 18.2 MΩ dirence sahip deiyonize su ile hazırlandı. Bu amaçla Purelab Option-Q water system (Elga, UK) marka saf su cihazı kullanıldı.

Kütle ölçümleri için Kern ALS model 0,1 mg hassasiyetli analitik terazi kullanıldı.

İstenilen hacimlerde çözücü ve çözelti aktarımı için Brand marka 10-100 µL ve 500-5000 µL otomatik pipetler kullanıldı.

pH ölçümleri Hanna Instruments marka HI 221 Microprocessor model pH metre ile yapıldı.

Çalkalama işlemlerinde (Heidolph, Vibramax 110) marka titreşimli çalkalayıcı kullanıldı.

UV-Görünür bölge spektrofotometresi cihazında ölçüm alabilmek için ISOLAB, Cuvettes “spectrophotometer-quartz-micro“ Q-274 marka kuvars Perlah Elmer marka küvetler kullanıldı.

İrinotecan hidroklorür ilaç etken maddesinin tayini T80 UV/VIS Spectrometer, UK marka UV-Görünür bölge spektroskopisi cihazı ile gerçekleştirildi.

Bulanık çözeltilerde organik fazın çöktürülebilmesi için (Hettich Zentrifgen, Rotofix 32 A) markalı santrifüj cihazı kullanıldı.

7.1.2 DeneYlerde Kullanılan Reaktifler

DeneYler süresince, metal standartları ve tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasalların tümü analitik saflıktadır.

7.1.3 Metal Standartları

DeneYler süresince kullanılan katyon ve anyon çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan bileşikler ve markaları Tablo 7.1, Tablo 7.2 ve Tablo 7.3'de verilmiştir;

Tablo 7.1: Metal iyonları ve markaları.

Metal İyonları	Metal Tuzları	Markası
Cu(II)	Cu (NO ₃) ₂ . 3 H ₂ O	Riel de Haen
Ca(II)	Ca (NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	Merck
Sr(II)	Sr (NO ₃) ₂	Riel de Haen
Ba(II)	Ba (NO ₃) ₂	Fluka
Cr(III)	Cr (NO ₃) ₃ . 9 H ₂ O	Fluka
Mn(II)	Mn (NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	Merck
Fe(III)	Fe (NO ₃) ₃ . 9 H ₂ O	Merck
Ni(II)	Ni (NO ₃) ₂ . 6 H ₂ O	Fluka
Pb(II)	Pb (NO ₃) ₂	Merck
Cd(II)	Cd (NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	Merck
Co(II)	CoCl ₂ . 6 H ₂ O	Merck
Mg(II)	Mg (NO ₃) ₂ . 6 H ₂ O	Fluka

Tablo 7.2: Anyonlar ve markaları.

Anyonlar	Anyon Tuzları	Markaları
Cl ⁻	NaCl	Riel de Haen
PO ₄ ⁻³	Na ₃ PO ₄ . H ₂ O	Fluka
CO ₃ ⁻²	Na ₂ CO ₃	Fluka
NO ₃ ⁻	KNO ₃	Merck

Tablo 7.3: Organik madde ve markası.

Organik Madde	Markası
Hümik asit	Sigma-Aldrich

7.1.4 Tampon Çözeltilerin Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar

Kompleksleşme üzerine pH etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda pH'ı 2-9 arasında tampon çözeltiler hazırlandı ve kullanıldı. Tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasalların markaları Tablo 7.4'de verilmiştir.

Tablo 7.4: Tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kullanılan Kimyasallar	Bileşik Formülleri	Markaları
Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck
Sodyum asetat trihidrat	$\text{CH}_3\text{COO} \cdot \text{Na}_3\text{H}_2\text{O}$	Merck
Amonyum klorür	NH_4Cl	Merck
Potasyum hidrojen ftalat	$\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$	Merck
Sodyum fosfat monobazik dihidrat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Riel de Haen

7.1.5 Kullanılan Asit ve Bazlar

Tampon çözeltilerin pH'larının istenilen değere ayarlanmasında Tablo 7.5'de verilen inorganik asit ve bazlar kullanıldı.

Tablo 7.5: İnorganik asit ve bazlar.

Kimyasal Madde	Markası
HCl	Sigma- Aldrich
NaOH	Fluka
HNO ₃	Sigma- Aldrich

7.1.6 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

7.1.6.1 1. Irinotecan çalışma çözeltisi

Irinotecan hidroklorür ilacını içeren ilaç çözeltisi (20 mg/mL) 100 kat seyreltilerek elde edilen çözelti çalışma şartlarının belirlenmesinde yapılan deneysel çalışmalarda kullanıldı.

7.1.6.2 2. Irinotecan çalışma çözeltisi

Satın alınan saf Irinotecan hidroklorür maddesi kullanılarak hazırlanan çalışma çözeltisi kalibrasyon eğrisinin oluşturulması ve örnek analizleri çalışmalarında kullanıldı. Bu amaçla Irinotecan hidroklorür ilacından 0,0104 gram yüksek hassasiyetli analitik terazide tartıldı. Üzerine 0,5 mL pH= 4 tampon çözeltisi eklenip karıştırıldı. Son hacmi 50 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

7.1.6.3 Tampon Çözeltilerin Hazırlanılmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

a) 0,1 M hidroklorik asit çözeltisi

50 mL'lik bir balon joje içerisine bir miktar saf su konuldu. Üzerine 0,42 mL % 37'lik hidroklorik asit eklendi. Daha sonra son hacim 50 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

b) 0,1 M potasyum hidrojen ftalat çözeltisi

1,0211 gram potasyum hidrojen ftalat katısı bir beher içerisine konuldu, üzerine saf su eklenerek çözüldü. Daha sonra 50 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve son hacmi 50 mL olana kadar saf su ile tamamlandı.

c) 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi

10 mL'lik bir balon jöje içerisine bir miktar saf su alındı, içerisine 0,04 gram katı sodyum hidroksit eklendi. Daha sonra son hacim 10 mL olacak şekilde saf su ilave edildi.

7.1.6.4 Tampon Çözeltiler

Sulu fazın pH değerlerinin ayarlanması için farklı tampon çözeltiler hazırlandı.

a) pH= 2-6-7-8 tampon çözeltileri

1,5601 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp suda çözüldü ve pH metreyle HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak çözeltilerin pH'ı istenilen değere pH metre ile ayarlandı ve çözeltilerin hacmi 50 mL'ye tamamlanarak 0,2 M'lık tampon çözeltiler hazırlandı. Çözeltilerin son pH değerleri pH metre ile kontrol edildi.

b) pH= 3 tampon çözeltisi

Önceden hazırlanan 0,1 M'lık potasyum hidrojen ftalat çözeltisinden 50 mL alındı ve 100 mL'lik balon jöje içerisine aktarıldı. Üzerine yine önceden hazırlanan 0,1 M'lık hidroklorik asit çözeltisinden 22,3 mL eklendi. Daha sonra son hacim 100 mL ye saf su ile tamamlandı ve pH değeri 3'e pH metre ile ayarlandı.

c) pH= 4 tampon çözeltisi

14,29 mL % 100'lük CH_3COOH belirli miktar saf su içerisine alındı ve pH metreyle HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak çözeltinin pH'ı 4'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlanarak 0,5 M'lık tampon çözelti hazırlandı. Çözeltinin son pH değeri, pH metre ile kontrol edildi.

d) pH= 5 tampon çözeltisi

6,805 gram $\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ tartılıp suda çözüldü. pH metreyle HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak çözeltilerin pH'ı 5'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi 100 mL'ye tamamlanarak 0,5 M'lık tampon çözelti hazırlandı. Çözeltinin son pH değeri pH metre ile kontrol edildi.

e) pH= 9 tampon çözeltisi

0,2675 gram NH_4Cl tartılıp suda çözüldü. pH metreyle HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak çözeltilerin pH'ı 9'a ayarlandı. Çözeltinin hacmi 50 mL'ye tamamlanarak 0,1 M'lık tampon çözelti hazırlandı. Çözeltinin son pH değeri pH metre ile kontrol edildi.

7.2 Yöntem

7.2.1 Optimum Ekstraksiyon Şartlarının Belirlenmesi

7.2.1.1 pH'ın Etkisi

Irinotecan hidroklorür etken maddesinin ekstraksiyonu amacı ile geliştirilecek yöntem üzerine pH'ın etkisinin incelenmesi amacıyla pH 2-9 arasındaki değerlerde tampon çözeltiler kullanıldı. Örneklerin işleme hazırlanması 15 mL'lik falkon tüplerle gerçekleştirildi. Her bir pH değeri için 3 paralel örnek hazırlandı. Örneklerin içerisine sırasıyla; 0,30 mL 1. irinotecan çalışma çözeltisi, 1 mL tampon çözeltisi (pH 2-9 arasındaki değerlerde) eklendi ve son hacimleri 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Daha sonra ekstraksiyon çözücüsü

olarak kullanılan iyonik sıvıdan (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) 83 µL ve dispersiyon çözeltisi olan etanolden 0,417 mL eklendi.

Örnek çözeltiler hazırlandıktan sonra titreşimli çalkalama cihazında 10 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde % 99,8'lik etanol eklenerek tamamlandı. Ayrıca her bir pH değeri için içerisinde Irinotecan ilaç etken maddesi bulunmayan kör çözeltileri hazırlanarak yukarıda verilen pH deneyleri tekrar edildi. Elde edilen ekstraktlar UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile alınan ölçümlerde kör çözelti olarak kullanıldı.

UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyal değerleri maksimum absorpsiyon sinyallerinin gözlemlendiği 256 nm'de ölçüldü. Sinyalin en yüksek gözlemlendiği optimum pH değeri belirlendi.

7.2.1.2 İyonik Sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) Hacminin Etkisi

Ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvı hacminin, ekstraksiyon verimi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla farklı hacimlerde iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) içeren örnekler hazırlandı. Örneklerin işleme hazırlanması 15 mL'lik falkon tüplerle gerçekleştirildi. Örneklerin içerisine sırasıyla; 0,30 mL 1.irinotecan çalışma çözeltisi, 1 mL pH= 4 tampon çözeltisi eklendi ve son hacimleri 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Daha sonra ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvı olan 1-Hegzil-3-metilimidazolyum'dan 40-50-60-75-100 µL hacimlerde üzerine eklendi. Son olarak bütün örneklere eşit miktarda 0,55 mL etanol eklendi.

Örnek çözeltiler hazırlandıktan sonra titreşimli çalkalama cihazında 10 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde % 99,8'lik etanol eklenerek tamamlandı. Ayrıca her bir iyonik sıvı (1-Hegzil-3-

metilimidazolyum) hacmi için içerisinde Irinotecan bulunmayan kör çözeltileri hazırlandı.

UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyal değerleri 256 nm'de ölçüldü. Sinyalin en yüksek gözleendiği iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) hacmi optimum çözücü hacmi olarak belirlendi.

7.2.1.3 Dispersif Çözücü Cinsinin Etkisi

Dispersif çözücünün cinsinin ekstraksiyon verimine etkisinin incelenmesi amacıyla aseton, metanol ve etanol çözücüleri ile örnekler hazırlandı. Örneklerin işleme hazırlanması 15 mL'lik falkon tüplerle gerçekleştirildi. Örneklerin içerisine sırasıyla; 0,30 mL 1.irinotecan çalışma çözeltisi, 1 mL pH= 4 tampon çözeltisi eklendi ve son hacimleri 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Daha sonra 0,33 mL ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) ve 1,67 mL farklı dispersif çözücülerden (aseton, etanol ve metanol) içeren karışımdan 0,46 mL örneklerin üzerine eklendi. Hazırlanan örnek çözeltiler titreşimli çalkalama cihazında 10 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde etkisi çalışılan dispersif çözücülerden eklendi.

Ayrıca her bir dispersif çözücü için içerisinde irinotecan bulunmayan kör çözeltileri hazırlandı. UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyal değerleri 256 nm'de ölçüldü. Sinyalin en yüksek gözleendiği dispersif çözücü bundan sonraki çalışmalarda kullanıldı.

7.2.1.4 Dispersif Çözücü Hacminin Etkisi

Dispersif çözücü olarak seçilen etanol hacminin ekstraksiyon verimine etkisinin incelenmesi için farklı hacimlerde etanol içeren örnekler hazırlandı.

Örneklerin işleme hazırlanması 15 mL'lik falkon tüplerle gerçekleştirildi. Hazırlanan örneklerin içerisine sırasıyla; 0,30 mL 1.irinotecan çalışma çözeltisi, 1 mL pH= 4 tampon çözeltisi eklendi ve son hacimleri 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Daha sonra ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvıdan (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) her bir çözeltiliye 60 µL ve dispersif çözücü olarak seçilen etanolden sırasıyla her bir falkon tüpe 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 ve 0,75 mL hacimlerinde eklendi. Hazırlanan örnek çözeltiler titreşimli çalkalama cihazında 10 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde etanol eklendi.

Ayrıca her bir etanol hacmi için içerisinde irinotecan bulunmayan kör çözeltileri hazırlandı. UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyal değerleri 256 nm'de ölçüldü. Sinyalin en yüksek gözlemlendiği etanol hacmi optimum olarak seçildi.

7.2.1.5 NaCl Derişiminin Etkisi

NaCl derişiminin ekstraksiyon verimi üzerine etkisini incelemek için farklı derişimlerde NaCl bulunan örnekler hazırlandı. Örneklerin işleme hazırlanması 15 mL'lik falkon tüplerle gerçekleştirildi. Hazırlanan örneklerin içerisine sırasıyla; 0,30 mL 1.irinotecan çalışma çözeltisi, 1 mL pH= 4 tampon çözeltisi, 2 M NaCl çözeltisinden 0-0,025-0,125-0,250-0,625-1,25-2,5 mL hacimlerinde her bir falkon tüpe sırasıyla eklendi. Son hacimler 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Daha sonra 1,5 mL ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) ve 10 mL etanol içeren karışımdan 0,46 mL her bir örnek üzerine eklendi. Örnek çözeltiler hazırlandıktan sonra titreşimli çalkalama cihazında 10 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde etanol eklendi.

Ayrıca her bir NaCl derişimi için içerisinde irinotecan bulunmayan kör çözeltileri hazırlandı. UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyal değerleri 256 nm'de ölçüldü. Sinyalin en yüksek gözleendiği NaCl derişimi optimum olarak seçildi.

7.2.1.6 Çalkalama Süresinin Etkisi

Çalkalama süresinin ekstraksiyon verimine etkisinin incelenmesi için farklı çalkalama sürelerinde geliştirilen yöntem uygulandı. Örneklerin işleme hazırlanması 15 mL'lik falkon tüplerle gerçekleştirildi. Hazırlanan örneklerin içerisine sırasıyla; 0,30 mL 1.irinotecan çalışma çözeltisi, 1 mL pH= 4 tampon çözeltisi eklendi ve son hacimleri 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Daha sonra 1,5 mL ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) ve 10 mL etanol içeren karışımdan 0,46 mL her bir çözeltiliye eklendi. Hazırlanan örnek çözeltiler titreşimli çalkalama cihazında farklı sürelerde (2-5-7-10-15 dakika) çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde etanol eklendi.

Ayrıca içerisinde irinotecan bulunmayan kör çözeltisi hazırlandı. UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyal değerleri ölçüldü. Sinyalin en yüksek gözleendiği çalkalama süresi optimum olarak seçildi.

7.2.1.7 Santrifüj Süresinin Etkisi

Santrifüj süresinin ekstraksiyon verimine etkisinin incelenmesi için geliştirilen yöntem farklı santrifüj sürelerinde uygulandı. Örneklerin işleme hazırlanması 15 mL'lik falkon tüplerle gerçekleştirildi. Hazırlanan örneklerin içerisine sırasıyla; 0,30 mL 1.irinotecan çalışma çözeltisi, 1 mL pH= 4 tampon çözeltisi eklendi ve son hacimleri 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Daha sonra 1,5 mL ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvı (1-Hegzil-

3-metilimidazolyum) ve 10 mL etanol içeren karışımdan 0,46 mL her bir çözeltiliye eklendi. Hazırlanan örnek çözeltiler titreşimli çalkalama cihazında 2 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda farklı sürelerde (2-5-7-10-15 dakika) santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde etanol eklendi.

Ayrıca içerisinde irinotecan bulunmayan kör çözeltili hazırlandı. UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyal değerleri 256 nm'de ölçüldü. Sinyalin en yüksek gözlemlendiği santrifüj süresi optimum olarak seçildi.

7.3 Yabancı İyon Etkisi

Irinotecan'ın önderiştirilmesi ve tayini amacı ile geliştirilen yöntem üzerine yabancı anyonlar, katyonlar ve hümik asidin etkisi incelendi. Yabancı katyonlar (Fe^{+3} ; Cr^{+3} ; Mn^{+2} ; Ba^{+2} ; Ca^{+2} ; Mg^{+2} ; Co^{+2} ; Pb^{+2} ; Ni^{+2} ; Cd^{+2} ; Sr^{+2} ; Cu^{+2}) ve anyonların (Cl^- ; PO_4^{-3} ; CO_3^{-2} ; NO_3^-) 1000 mg L⁻¹ stok çözeltileri ve hümik asidin 100 mg L⁻¹ lik çözeltileri kullanıldı. 15 mL'lik falkon tüplere ayrı ayrı her bir anyon ve katyon stok çözeltilerinden 0,5 mL ve hümik asit çözeltilisinden de 1 mL eklendi. Bu çözeltilerin üzerine 0,50 mL 1.irinotecan çalışma çözeltili, 1 mL pH= 4 tampon çözeltili eklendi ve çözeltilerin son hacimleri 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Daha sonra 1,5 mL ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) ve 10 mL etanol içeren karışımdan 0,46 mL her bir çözelti üzerine eklendi. Hazırlanan örnek çözeltiler titreşimli çalkalama cihazında 2 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 7 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde etanol eklendi.

Bunlara ek olarak içerisinde yabancı iyon bulunmayan ve sadece irinotecan içeren çözeltiler yabancı iyonların irinotecan'ın sinyal değerine etkisi

olup olmadığını anlamak amacıyla hazırlandı. Ayrıca içerisinde irinotecanında bulunmadığı kör çözeltisi hazırlandı. UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyal değerleri 256 nm’de ölçüldü. Yabancı iyonların sinyal üzerine etkisinin olup olmadığı incelendi. Çalışmalar optimize edilen şartlar altında gerçekleştirildi.

7.4 Önderiştirme Deneyleri

Önderiştirme deneyi, 5 farklı örnek üzerinde yapılarak çalışılan yöntemin önderiştirme için uygunluğu incelendi. Örneklerin işleme hazırlanması 15 mL’lik ve 50 mL’lik falkon tüplerle gerçekleştirildi. Bu denemelerde her bir örneğe eklenen 1.irinotecan çalışma çözeltisi, tampon çözeltisi ve 1,5 mL iyonik sıvı ve 10 mL etanol içeren karışımdan eklenen hacimler ve sulu fazların son hacimleri Tablo 7.6’da verildi.

Tablo 7.6: Önderiştirme örnek çözeltileri.

	1.Örnek	2.Örnek	3.Örnek	4.Örnek	5.Örnek
Sulu faz hacmi (mL)	5	10	20	30	40
1.Irinotecan çalışma çözeltisi hacmi (mL)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Tampon çözeltisi hacmi (mL)	1	2	4	6	8
Karışım hacmi (mL)	0,46	0,92	1,84	2,76	3,68

Tablo 7.6'da ki gibi hazırlanan örnekler titreşimli çalkalama cihazında 2 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 7 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde etanol eklendi.

Ayrıca her biri için ayrı ayrı içerisinde irinotecan bulunmayan kör çözeltileri hazırlandı. UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyal değerleri 256 nm'de ölçüldü. Ölçülen sinyaller sonucunda her bir önderiştirme faktörü için % geri kazanım değerleri hesaplandı ve yöntemin önderiştirme verimi incelendi.

7.5 Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması amacı ile kullanılacak örnekler 15 mL'lik falkon tüplerde hazırlandı. 2. irinotecan çalışma çözeltilerinden 0 mL;0,2 mL;0,4 mL;0,6 mL;0,8 mL hacimlerinde falkon tüpler içerisine alındı üzerine 1 mL pH= 4 tampon çözeltileri eklendi ve son hacimleri 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Daha sonra 1,5 mL ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) ve 10 mL etanol içeren karışımdan 0,46 mL üzerine eklendi. Hazırlanan örnek çözeltiler titreşimli çalkalama cihazında 2 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 7 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde etanol eklendi.

Ayrıca içerisinde Irinotecan bulunmayan tek kör çözeltileri hazırlandı. UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyal değerleri 256 nm'de ölçüldü. Çözeltilerdeki irinotecan hidroklorür ilaç çözeltileri derişimine karşı absorpsiyon değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

7.6 Geliştirilen Yöntemin Analitik Özellikleri

Geliştirilen yöntemde gözlenebilme ve tayin sınırının belirlenmesi için yapılan deneylerde 20 tane farklı kör örneğe geliştirilen önderiştirme yöntemi uygulandı ve elde edilen ekstraktların UV-Görünür bölge spektrofotometresinde 256 nm'de absorbans sinyalleri okutuldu. Gözlenebilme sınırı kör sinyallerinin (n=20) standart sapmasının üç katının kalibrasyon eğrisinin eğimine bölümü ($3S_{bl}/m$), tayin sınırı ise kör sinyallerinin (n=20) standart sapmasının on katının kalibrasyon eğrisinin eğimine bölümü ($10S_{bl}/m$) ile hesaplandı.

7.7 Örnek Analizleri

7.7.1 Çeşme Suyu Analizi

Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin çeşme suyu örneği için uygulanabilirliği incelendi. Bu amaçla laboratuvar içerisinde yer alan çeşmeden bir beher içerisine yeteri miktarda çeşme suyu alındı. Deneyler standart katma yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması sırasında 7.1.6.2'de hazırlanışı verilen 2.irinotecan çalışma çözeltisi kullanıldı. Örneklerin işleme hazırlanması 15 mL'lik falkon tüplerde gerçekleştirildi.

Bu denemelerde her bir örneğe eklenen 2.irinotecan çalışma çözeltisi, tampon çözeltisi ve 1,5 mL iyonik sıvı ve 10 mL etanol içeren karışımdan eklenen hacimler ve sulu fazların son hacimleri Tablo 7.7'de verildi.

Tablo 7.7: Standart katma yöntemi için hazırlanan standart çözeltilerin içeriği.

	Çeşme suyu (mL)	2. Irinotecan çalışma çözeltisi (mL)	Saf su (mL)	pH= 4 tamponu (mL)	Karışım çözeltisi (mL)
Kör	0	0,00	5	1	0,46
1.Standart	5	0,00	0	1	0,46
2.Standart	5	0,05	0	1	0,46
3.Standart	5	0,10	0	1	0,46
4.Standart	5	0,20	0	1	0,46
5.Standart	5	0,25	0	1	0,46
6.Standart	5	0,30	0	1	0,46

Hazırlanan örnek çözeltiler titreşimli çalkalama cihazında 2 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 7 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde etanol eklendi.

Hazırlanan bu örneklerle geliştirilen deneysel yöntem uygulandı. Aynı şekilde bu sefer içerisine belirli miktar irinotecan eklenen çeşme suyu örnekleri yöntemin geri kazanım veriminin belirlenmesi amacıyla yukarıda verilen yöntem kullanılarak analiz edildi. Bu amaçla 30 mL çeşme suyu üzerine, 2. irinotecan çalışma çözeltisinden 1,2 mL eklenerek yeni örnek hazırlandı. Bu çözelti kullanılarak yukarıda Tablo 7.7’de verildiği şekilde kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. Bu örneklerle de geliştirilen yöntem uygulandı. Elde edilen ekstraktlardaki Irinotecan’ ın sinyal değerleri UV-Görünür bölge spektrofotometresi tekniği ile 256 nm’de ölçüldü. Çözeltilerdeki irinotecan derişimine karşı ölçülen absorban değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri oluşturuldu.

7.7.2 Dere Suyu Analizi

Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin dere suyu örneği için uygulanabilirliği incelendi. Bu amaçla deneysel çalışmalar için Balıkesir Küçük Bostancı Deresi'nden alınan örnek kullanıldı. Örneğin analize uygun hale getirilebilmesi için önce Whatman süzgeç kâğıdından daha sonra 0,45 µm gözenek boyutuna sahip olan selüloz asetat membran filtre kâğıdı kullanılarak süzüldü ve polietilen kaba aktarılıp buzdolabında saklandı.

Kalibrasyon eğrisi standart katma yöntemi ile oluşturuldu. Bu denemelerde her bir örneğe eklenen 2. irinotecan çalışma çözeltisi, tampon çözeltisi ve 1,5 mL iyonik sıvı ve 10 mL etanol içeren karışımdan eklenen hacimler ve sulu fazların son hacimleri Tablo 7.8'de verildi.

Tablo 7.8: Standart katma yöntemi için hazırlanan standart çözeltilerin içeriği.

	Dere suyu (mL)	2. Irinotecan çalışma çözeltisi hacmi (mL)	Saf su (mL)	pH= 4 tamponu (mL)	Karışım çözeltisi hacmi (mL)
Kör	0	0,00	5	1	0,46
1.Standart	5	0,00	0	1	0,46
2.Standart	5	0,05	0	1	0,46
3.Standart	5	0,10	0	1	0,46
4.Standart	5	0,15	0	1	0,46
5.Standart	5	0,20	0	1	0,46
6.Standart	5	0,25	0	1	0,46
7.Standart	5	0,30	0	1	0,46

Örnek çözeltiler hazırlandıktan sonra titreşimli çalkalama cihazında 2 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 7 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde etanol eklendi.

Hazırlanan bu örneklere geliştirilen deneysel yöntem uygulandı. Aynı şekilde bu sefer içerisinde belirli miktar Irinotecan eklenen dere suyu örnekleri yöntemin geri kazanım veriminin belirlenmesi amacıyla yukarıda verilen yöntem kullanılarak analiz edildi. Bu amaçla 35 mL dere suyu üzerine 2.irinotecan çalışma çözeltisinden 1,4 mL eklenerek yeni örnek hazırlandı. Bu çözelti kullanılarak yukarıda verildiği şekilde kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. Bu örneklere de geliştirilen yöntem uygulandı.

Elde edilen ekstraktlardaki Irinotecan'ın sinyal değerleri UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile 256 nm'de ölçüldü. Çözeltilerdeki irinotecan derişimine karşı ölçülen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri oluşturuldu.

7.7.3 İdrar Analizi

Geliştirilen dispersif sıvı-sıvı ekstraksiyonu yönteminin idrar örneğinde uygulanabilirliğini incelemek amacıyla Deniz Uysal'dan alınan idrar örneği kullanıldı. Örneğin analize uygun hale getirilebilmesi için önce 50 mL'lik falkon tüpteki idrar örneği 4000 devir/dakika hızda 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonrası falkon tüpün dibinde tortu gözlemlendi ve üsteki süzüntü kısmı başka bir falkon tüpe aktarıldı. Falkon tüpteki süzüntü de daha sonra Whatman süzgeç kâğıdından daha sonra 0,45 µm gözenek boyutuna sahip olan selüloz asetat membran filtre kâğıdı kullanılarak süzüldü. Süzme işleminden sonra idrar örneğinden 4 mL alındı, son hacmi 40 mL olacak şekilde saf su ile seyreltildi. Seyreltilmiş örnek içerisinde 15 mL alınıp geri kalan örnek buzdolabı şartlarında saklandı.

Elde ettiğimiz seyreltilmiş idrar örneğinden 3 ayrı falkon tüpe 5'er mL konulup, üzerine 1 mL pH= 4 tampon çözeltisi eklendi ve son hacimleri 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Daha sonra 1,5 mL ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) ve 10 mL etanol içeren karışımdan 0,46 mL üzerine eklendi. Hazırlanan örnek çözeltiler, titreşimli çalkalama cihazında 2 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 7 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj

işleminde sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde etanol eklendi.

Aynı şekilde bu sefer içerisine belirli miktar irinotecan eklenen idrar örnekleri yöntemin geri kazanım veriminin belirlenmesi amacıyla yukarıda verilen yöntem kullanılarak analiz edildi. 3 ayrı falkon tüpe ayrı ayrı daha önce elde ettiğimiz seyreltilmiş idrar örneğinden 5'er mL, 0,2 mL 2.irinotecan çalışma çözeltisi, 1 mL pH= 4 tampon çözeltisi de eklendi. Son hacimleri 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Daha sonra 1,5 mL ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) ve 10 mL etanol içeren karışımdan 0,46 mL eklendi. Hazırlanan örnek çözeltiler, titreşimli çalkalama cihazında 2 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra örnekler 4000 devir/dakika hızda 7 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sulu faz dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dipte kalan faza, ekstraksiyon çözücüsüne geçen kısım üzerine son hacimler 5 mL olacak şekilde etanol eklendi.

Ayrıca içerisinde irinotecan hidroklorür ilaç çözeltisi bulunmayan tek kör çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltilere geliştirilen yöntem uygulandı. UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile idrar örneğinde irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyal değerleri 256 nm'de ölçüldü. Bölüm 7.5 de verilen yöntemle hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak çözeltilerdeki irinotecan derişimleri hesaplandı.

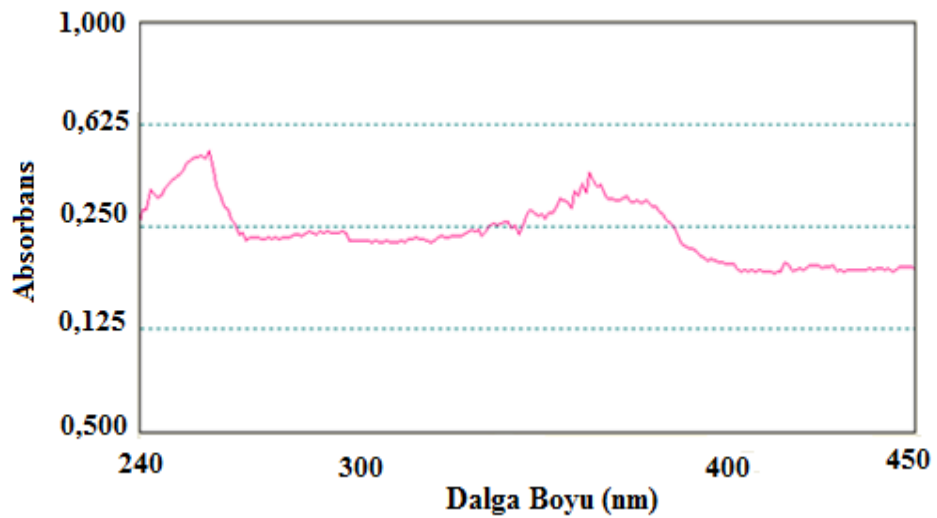
8. BULGULAR

8.1 Optimum Şartların Belirlenmesi

8.1.1 pH Etkisi

Irinotecan ilaç etken maddesinin ekstraksiyonu üzerine pH etkisinin incelenmesi amacıyla pH 2-9 arasında çalışıldı. Irinotecan hidroklorür etken maddesinin ekstraksiyonu amacıyla geliştirilen yöntem üzerine pH' ın etkisinin incelenmesi 7.2.1.1'de verilen şartlarda yapıldı.

Maksimum absorpsiyon değerinin gözlendiği dalga boyunun belirlenmesi amacı ile elde edilen ekstraktların spektrumları 240-450 nm aralığında tarandı. Şekil 8.1'de verilen pH 4'te elde edilen ekstraktın spektrumunda da görüleceği gibi maksimum absorpsiyon değeri 256 nm'de gözlendi. Ayrıca spektrumda gözlenen her iki pike ait absorpsiyon değerleri Tablo 8.1'de verildi. Bu nedenle maksimum absorpsiyon değerlerinin elde edildiği 256 nm dalga boyunda absorpsiyon sinyalleri bundan sonraki çalışmalarda okundu.



Şekil 8.1: pH 4'te elde edilen ekstraktta Irinotecan' ın spektrumu.

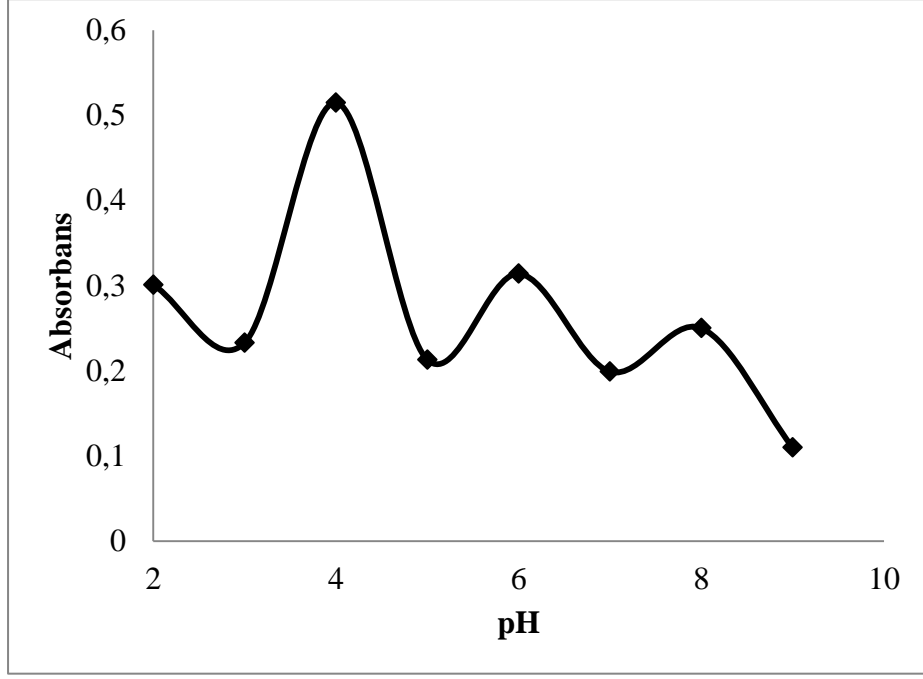
Tablo 8.1: pH 4'te elde edilen maksimum absorbans değerleri.

Dalga boyu (nm)	256	360
Absorbans	0,515	0,450

Irinotecan ilaç etken maddesinin nderiştirilmesi üzerine pH'ın etkisi her bir pH'da 256 nm'de elde edilen absorbans değerleri Tablo 8.2'de ve Şekil 8.2'de verilerek gösterilmiştir.

Tablo 8.2: pH 2-9 arasında elde edilen ekstraktların 256 nm'de ki absorbans değerleri.

pH	Absorbans (256 nm)
2	0,301
3	0,233
4	0,515
5	0,213
6	0,314
7	0,199
8	0,250
9	0,110



Şekil 8.2: Irinotecan ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi üzerine pH etkisi.

Farklı pH tamponları kullanılarak yapılan deneylerden elde edilen spektrumlar ve maksimum absorbans değerleri incelendiğinde en yüksek absorbans değerleri pH 4'te elde edilmiştir. O nedenle bu pH değeri bundan sonraki çalışmalarda deneysel pH değeri olarak seçilmiştir.

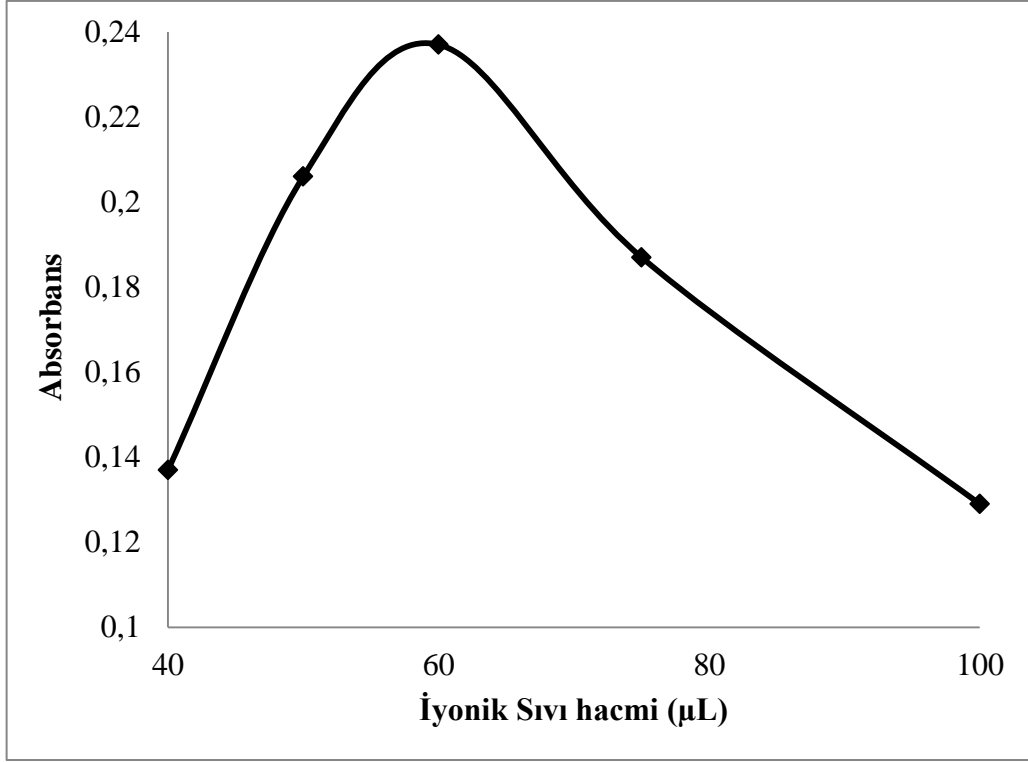
8.1.2 İyonik Sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) Hacminin Etkisi

Geliştirilen yöntemin uygulanması süresince çalışılacak ortamda, ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılacak iyonik sıvının hacminin ekstraksiyon verimine etkisinin incelenmesi amacıyla farklı hacimlerde iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) içeren çözeltiler kullanıldı.

256 nm'de yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar Tablo 8.3, Şekil 8.3'de verildi. Şekil 8.3 ve Tablo 8.3'te görüldüğü üzere 60 µL hacimde iyonik sıvı kullanılarak hazırlanan örneklerde gözlenen sinyallerin en yüksek olduğu bulundu. Bu nedenle aksi söylenmedikçe diğer parametrelerin belirlenmesi amacıyla hazırlanacak örneklerdeki iyonik sıvı hacminin 60 µL olmasına karar verildi.

Tablo 8.3: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) hacminin etkisi.

İyonik Sıvı (μL)	40	50	60	75	100
Absorbans (256 nm)	0,137	0,206	0,237	0,187	0,129



Şekil 8.3: Irinotecan ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi üzerine iyonik sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) hacminin etkisi.

8.1.3 Dispersif Çözücü Cinsinin Etkisi

Geliştirilen yöntemin uygulanması süresince çalışılacak ortamda, dispersif çözücünün cinsinin ekstraksiyon verimine etkisinin incelenmesi amacıyla farklı çözücüler ile hazırlanmış örnekler kullanıldı.

Her bir dispersif çözücü için 256 nm'de elde edilen absorbans sinyal değerleri Tablo 8.4'ta verildi. Tablo 8.4'te görüldüğü üzere etanol kullanılarak hazırlanan örneklerde gözlenen sinyallerin en yüksek olduğu bulundu. Bu nedenle aksi söylenmedikçe diğer parametrelerin belirlenmesi amacıyla hazırlanacak örneklerde dispersif çözücü olarak etanol kullanıldı.

Tablo 8.4: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine dispersif çözücü cinsinin etkisi.

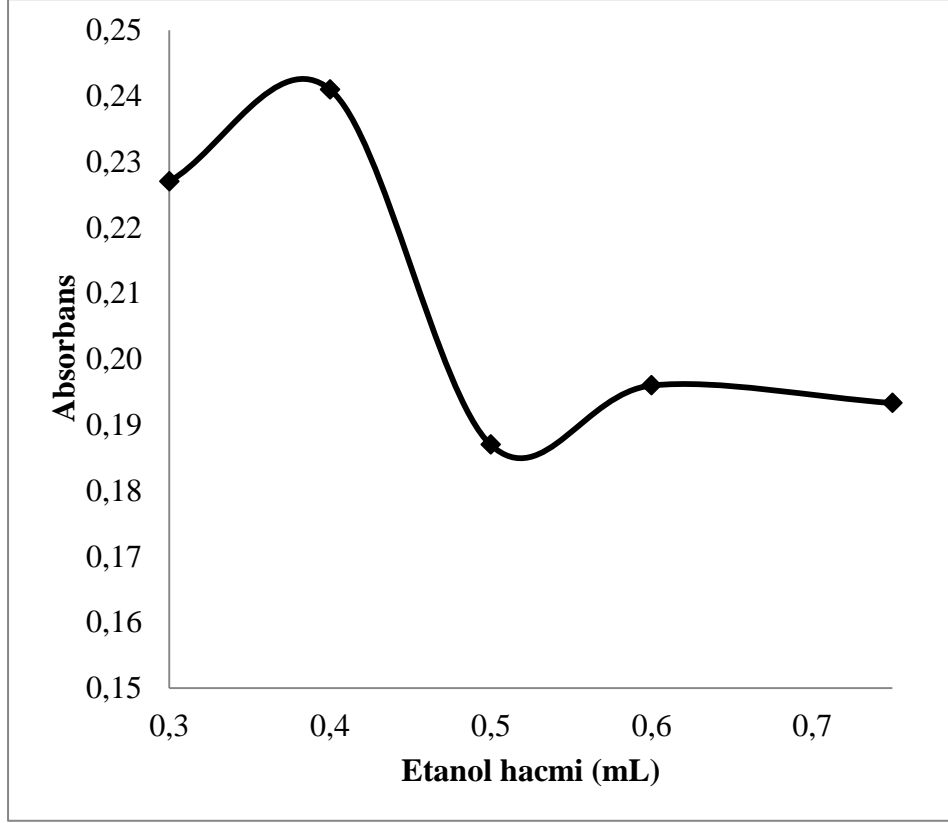
	Absorbans (256 nm)
Aseton	0
Etanol	0,225
Metanol	0,210

8.1.4 Dispersif Çözücü Hacminin Etkisi

Geliştirilen yöntemin uygulanması süresince çalışılacak ortamda, dispersif çözücünün hacminin ekstraksiyon verimine etkisini incelemek amacıyla farklı hacimlerde etanol içeren örnekler hazırlandı. Her bir çözeltide ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvıdan (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) 60 µL ve dispersif çözgen olan etanol çözeltisinden sırasıyla her bir falkon tüpe 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 ve 0,75 mL hacimlerinde eklendi. 256 nm de yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar Tablo 8.5, Şekil 8.4'te verildi. Şekil 8.4 ve Tablo 8.5'te görüldüğü üzere 0,4 mL hacimde etanol kullanılarak hazırlanan örneklerde gözlenen sinyallerin en yüksek olduğu bulundu. Bu nedenle aksi iddia edilmediği sürece diğer parametrelerin belirlenmesi amacıyla hazırlanacak örneklerdeki etanol hacminin 0,4 mL olmasına karar verildi.

Tablo 8.5: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine dispersif çözücü hacminin etkisi.

Etanol miktarı (mL)	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Absorbans (256 nm)	0,227	0,241	0,187	0,196	0,193



Şekil 8.4: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine dispersif çözücü hacminin etkisi.

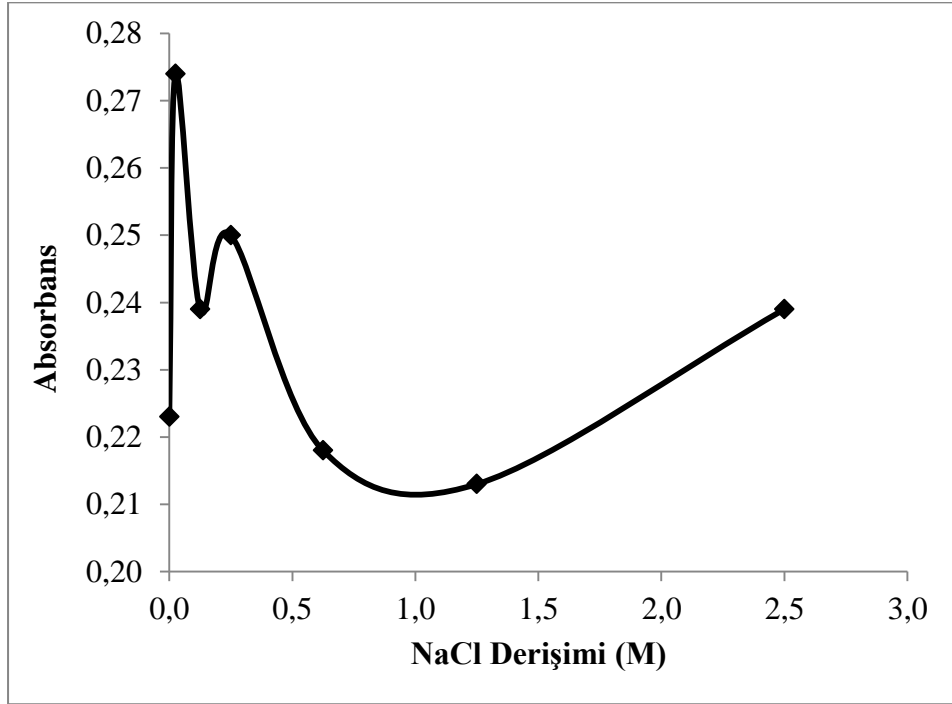
8.1.5 NaCl Derişiminin Etkisi

NaCl derişiminin ekstraksiyon verimi üzerine etkisini incelemek için farklı derişimlerde NaCl bulunan örnekler hazırlandı. Hazırlanan örneklere geliştirilen yöntem uygulandı.

256 nm'de yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar Tablo 8.6, Şekil 8.5'te verildi. Şekil 8.5 ve Tablo 8.6'da görüldüğü üzere eklenen farklı hacimlerdeki NaCl'ün sinyaller üzerine etki etmediği gözlemlendi. O nedenle bundan sonraki örneklere herhangi bir tuz ilavesi yapılmadı.

Tablo 8.6: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine NaCl derişiminin etkisi.

NaCl derişimi (M)	0	0,01	0,05	0,10	0,25	0,50	1,00
Absorbans (256 nm)	0,223	0,274	0,239	0,250	0,218	0,213	0,239



Şekil 8.5: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine NaCl derişiminin etkisi.

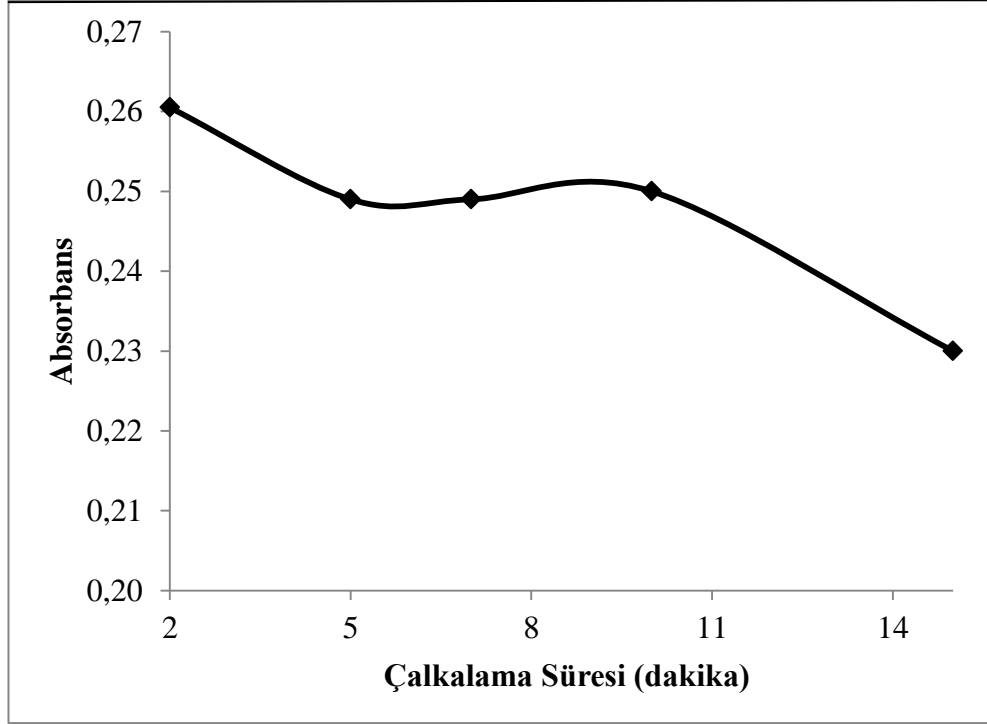
8.1.6 Çalkalama Süresinin Etkisi

Çalkalama süresinin ekstraksiyon verimine etkisinin incelenmesi için farklı çalkalama sürelerinde çalışmak suretiyle örnekler hazırlandı ve geliştirilen yöntem uygulandı.

256 nm'de yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar Tablo 8.7, Şekil 8.6'da verildi. Şekil 8.6 ve Tablo 8.7'de görüldüğü üzere 2 dakikalık bir çalkalama ile maksimum absorbans sinyalleri elde edilmiştir. Bu nedenle aksi söylenmedikçe diğer parametrelerin belirlenmesi amacıyla hazırlanacak örnekler 2 dakika süresince çalkalandı.

Tablo 8.7: Irinotecan Hidroklorür ilacının önderiştirilmesi üzerine çalkalama süresinin etkisi.

Çalkalama süresi (dakika)	2	5	7	10	15
Absorbans (256 nm)	0,261	0,249	0,249	0,250	0,230



Şekil 8.6: Irinotecan ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi üzerine çalkalama süresinin etkisi.

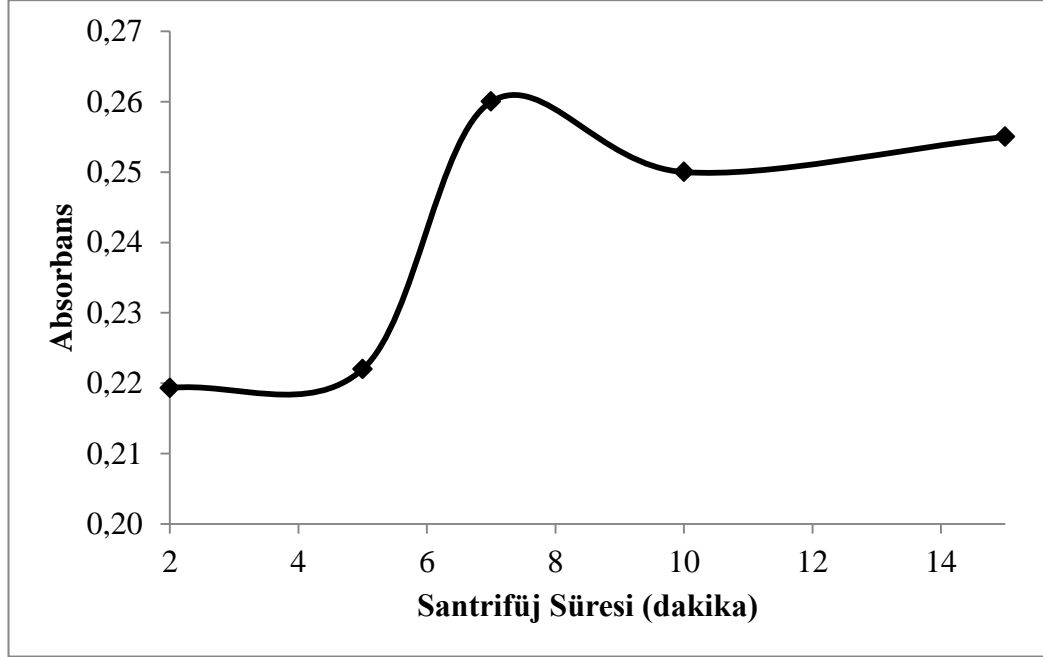
8.1.7 Santrifüj Süresinin Etkisi

Santrifüj süresinin ekstraksiyon verimine etkisinin incelenmesi için farklı sürelerde çalışmak suretiyle örnekler hazırlandı ve geliştirilen yöntem uygulandı.

256 nm'de yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar Tablo 8.8, Şekil 8.7'de verildi. Şekil 8.7 ve Tablo 8.8'de görüldüğü üzere 7 dakikalık bir santrifüj işlemi ile maksimum absorbans sinyalleri elde edilmiştir. Bu nedenle aksi söylenmedikçe diğer parametrelerin belirlenmesi amacıyla hazırlanacak örnekler 7 dakika süresince santrifüjlenmiştir.

Tablo 8.8: Irinotecan ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi üzerine santrifüj süresinin etkisi.

Santrifüj süresi (dakika)	2	5	7	10	15
Absorbans (256 nm)	0,219	0,222	0,260	0,250	0,255



Şekil 8.7: Irinotecan ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi üzerine santrifüj süresinin etkisi.

8.2 Yabancı İyon Etkisi

Irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyaller üzerine varsa girişimcilerin etkilerini belirlemek amacıyla örneklerde sıkça rastlanan iyon türlerinin etkileri incelendi. Geliştirilen yöntem uygulanarak % geri kazanım değerleri hesaplandı.

256 nm'de yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar Tablo 8.9'da verildi. Tablo 8.9'da görüldüğü gibi hümitik asit ve yabancı iyonların ortama eklenmesinin Irinotecanın ekstraksiyonu üzerine bir etki etmediğini göstermiştir.

Tablo 8.9: Yabancı iyon etkisi.

Yabancı iyon ya da bileşik	Yabancı iyon derişimi (mg L ⁻¹)	Eklenen irinotecan derişimi (mg L ⁻¹)	Bulunan irinotecan derişimi (mg L ⁻¹)	Geri kazanım (%)
Hümik asit	10	20,4	21,8±0,8	106,9
PO ₄ ⁻³	100	20,4	20,5±0,4	100,7
CO ₃ ⁻²	100	20,4	22,8±1,5	111,7
NO ₃ ⁻	100	20,4	23,0±3,0	112,7
Cu ⁺²	100	20,4	19,1±2,1	93,7
Fe ⁺³	100	20,4	19,5±1,3	95,8
Cr ⁺³	100	20,4	21,0±3,9	102,9
Mn ⁺²	100	20,4	20,3±2,7	99,7
Ba ⁺²	100	20,4	19,8±1,7	97,2
Ca ⁺²	100	20,4	23,7±3,2	116,1
Mg ⁺²	100	20,4	19,6±2,9	96,0
Co ⁺²	100	20,4	17,1±1,5	83,8
Pb ⁺²	100	20,4	21,3±1,5	104,3
Ni ⁺²	100	20,4	21,0±1,7	103,1
Cd ⁺²	100	20,4	20,0±1,7	98,1
Sr ⁺²	100	20,4	19,4±5,4	95,0

8.3 Önderiştirme Deneyleri

Önderiştirme deneyi, 5 farklı örnek üzerinde yapılarak çalışılan yöntemin önderiştirme için uygunluğu incelendi. Geliştirilen yöntem uygulanarak % geri kazanım ve standart sapmaları hesaplandı.

256 nm'de yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar Tablo 8.10'da verildi. Tablo 8.10'da görüldüğü gibi farklı örnek hacimlerinde elde edilen geri kazanım değerlerinin oldukça iyi olduğu ve kantitatif sonuçlar alındığı görüldü.

Tablo 8.10: Önderiştirme etkisi.

Örnek Hacmi (mL)	Eklenen irinotecan miktarı (mg)	Bulunan irinotecan miktarı (mg)	% Geri kazanım
5	0,1	0,100±0,004	99,7
10	0,1	0,111±0,020	110,7
20	0,1	0,114±0,07	113,6
30	0,1	0,100±0,011	99,7
40	0,1	0,103±0,023	103,3

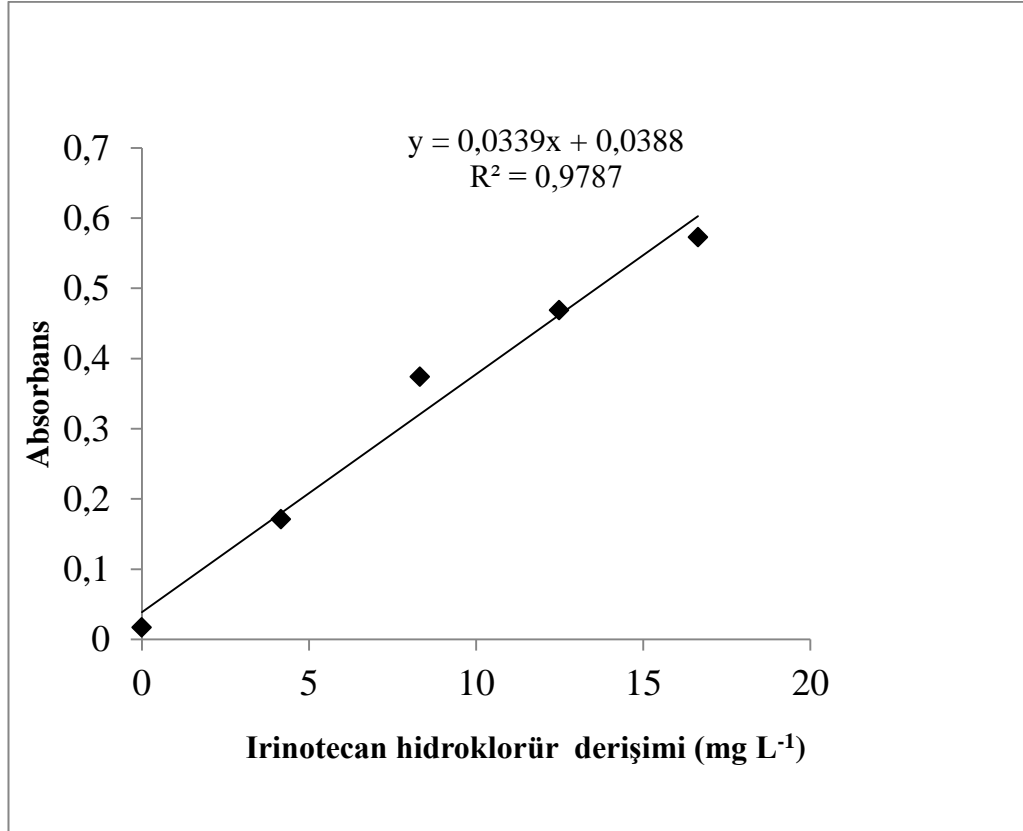
8.4 Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması amacıyla geliştirilen yöntem uygulandı. Çözeltilerdeki Irinotecan hidroklorürün derişimine karşı UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

256 nm'de yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar Tablo 8.11, Şekil 8.8'de verildi.

Tablo 8.11: Irinotecan hidroklorür için kalibrasyon değerleri.

2. Irinotecan çalışma çözeltisi hacimleri (mL)	Irinotecan derişimi (mg L⁻¹)	Absorbans (256 nm)
0	0	0,017
0,1	4,16	0,171
0,2	8,32	0,374
0,3	12,48	0,469
0,4	16,64	0,573



Şekil 8.8: Irinotecan ilaç etken maddesinin önderiştirilmesi amacıyla elde edilen kalibrasyon eğrisi.

8.5 Geliştirilen Yöntemin Analitik Özellikleri

Geliştirilen yöntemde gözlenebilme ve tayin sınırının belirlenmesi için yapılan deneylerde 20 tane farklı kör örneğine karşı geliştirilen önderiştirme yöntemi UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile Irinotecan Hidroklorür ilacına ait sinyaller ölçüldü. Ölçülen sinyaller grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Gözlenebilme sınırı kör sinyallerinin ($n=20$) standart sapmasının üç katının kalibrasyon eğrisinin eğimine bölümü ($3S_{bl}/m$), tayin sınırı ise kör sinyallerinin ($n=20$) standart sapmasının on katının kalibrasyon eğrisinin eğimine bölümü ($10S_{bl}/m$) ile hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan gözlenebilme sınırı $0,0487 \text{ mg L}^{-1}$ ve tayin sınırı ise $0,1623 \text{ mg L}^{-1}$ Irinotecan hidroklorür olarak bulundu. Yukarıda Bölüm 8.3'te de görüldüğü gibi 40 mL örnek hacminde çalışılıp son hacim etanol ile 1 mL ye tamamlandığında 40 katlık bir önderiştirme yapılabilir bu durumda gözlenebilme sınırında yaklaşık 40 katlık bir iyileşme elde edilebilir.

8.6 Örnek Analizleri

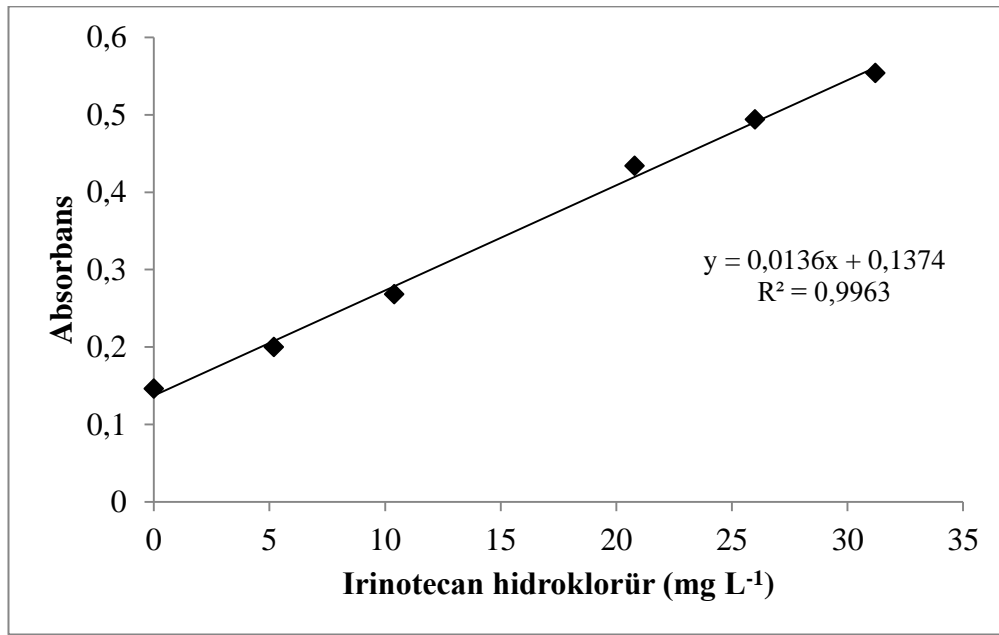
8.6.1 Çeşme Suyu Analizi

Geliştirilen yöntem çeşme suyu örneğine uygulandı ve çeşme suyu örneğinde Irinotecan hidroklorür tayini standart katma yöntemi ile yapıldı. Analiz için hazırlanan çeşme suyu örneğinden 5 mL alınarak Tablo 7.7'de verilen şekilde çözeltiler hazırlandı ve geliştirilen yöntemle çeşme suyundaki irinotecan hidroklorür etken maddesinin miktarı belirlendi. Ayrıca yöntemin doğruluğunun ve tekrarlanabilirliğinin kontrolü için aynı şekilde bu sefer içerisine belirli miktar Irinotecan eklenen çeşme suyu örnekleri, yöntemin geri kazanım veriminin belirlenmesi amacıyla, yukarıda verilen yöntem kullanılarak analiz edildi.

Irinotecan katılan çeşme suyundan elde edilen sonuçlar Tablo 8.12, Tablo 8.13 ve Şekil 8.9'da verilmiştir.

Tablo 8.12: Irinotecan katılan çeşme suyu örneğinden elde edilen sonuçlar.

2. Irinotecan çalışma çözeltisi (mL)	Irinotecan derişimi (mg L ⁻¹)	Absorbans (256 nm)
0	0,0	0,146
0,05	5,2	0,200
0,1	10,4	0,268
0,2	20,8	0,434
0,25	26,0	0,494
0,3	31,2	0,554



Şekil 8.9: Irinotecan katılan çeşme suyu örneğinde standart katma yöntemi ile Irinotecan ilaç etken maddesi için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Tablo 8.13: Çeşme suyu örneğinden elde edilen sonuçlar.

Eklene irinotecan derişimi (mg L ⁻¹)	Bulunan irinotecan derişimi (mg L ⁻¹)	% Geri Kazanım
-	< LOD*	-
10,4	10,10 ± 0,74	99,1

(< LOD* : Gözlenebilme sınırın altında)

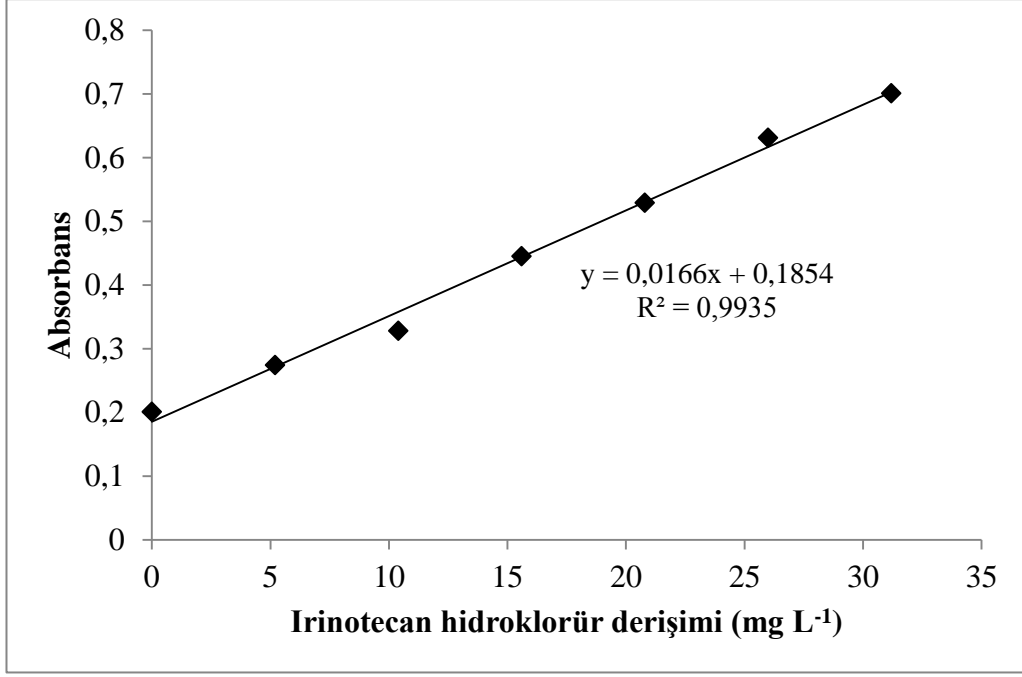
8.6.2 Dere Suyu Analizi

Geliştirilen yöntem dere suyu örneğine uygulandı ve dere suyu örneğinde Irinotecan hidroklorür tayini standart katma yöntemi ile yapıldı. Analiz için hazırlanan dere suyu örneğinden 5 mL alınarak Tablo 7.8’de verildiği şekilde standart çözeltiler hazırlandı ve geliştirilen yöntemle dere suyundaki irinotecan hidroklorür etken maddesinin miktarı belirlendi. Ayrıca yöntemin doğruluğunun ve tekrarlanabilirliğinin kontrolü için aynı şekilde bu sefer içerisine belirli miktar Irinotecan eklenen dere suyu örnekleri yöntemin geri kazanım veriminin belirlenmesi amacıyla yukarıda verilen yöntem kullanılarak analiz edildi.

Elde edilen sonuçlar Tablo 8.14, Tablo 8.15 ve Şekil 8.10’de verilmiştir.

Tablo 8.14: Irinotecan katılan dere suyu örneğinden elde edilen sonuçlar.

2. Irinotecan çalışma çözeltisi (mL)	Irinotecan derişimi (mg L⁻¹)	Absorbans (256 nm)
0	0,0	0,201
0,05	5,2	0,274
0,1	10,4	0,328
0,15	15,6	0,445
0,2	20,8	0,529
0,25	26,0	0,631
0,3	31,2	0,701



Şekil 8.10: Irinotecan katılan dere suyu örneğinde standart katma yöntemi ile Irinotecan ilaç etken maddesi için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Tablo 8.15: Dere suyu örneğinden elde edilen sonuçlar.

Eklene irinotecan derişimi (mg L⁻¹)	Bulunan irinotecan derişimi (mg L⁻¹)	% Geri Kazanım
-	<LOD	-
10,4	11,16 ± 1,69	109,5

8.6.3 İdrar Analizi

Geliştirilen yöntem idrar örneğine uygulandı ve idrar örneğinde Irinotecan hidroklorür tayini yapıldı. Bu amaçla Deniz Uysal'dan alınan idrar örneği kullanıldı. Analiz için hazırlanan idrar örneğinden 5 mL alınarak belirlenen optimum şartlarda çözeltiler hazırlandı ve geliştirilen yöntemle çözeltilerdeki Irinotecan hidroklorür etken maddesi miktarı tayin edildi. Ayrıca yöntemin

doğruluğunun ve tekrarlanabilirliğinin kontrolü için aynı şekilde bu sefer içerisine belirli miktar irinotecan eklenen idrar örnekleri yöntemin geri kazanım veriminin belirlenmesi amacıyla yukarıda verilen yöntem kullanılarak analiz edildi.

Elde edilen sonuçlar Tablo 8.16' da verilmiştir.

Tablo 8.16: İdrar örneğinden elde edilen sonuçlar.

Eklenen irinotecan derişimi (mg L⁻¹)	Bulunan irinotecan derişimi (mg L⁻¹)	% Geri kazanım
-	<LOD	-
8,32	8,00 ± 0,54	96,1

9. SONUÇ VE ÖNERİLER

9.1 Optimum Ekstraksiyon Şartlarının Belirlenmesi

9.1.1 pH Etkisi

Geliştirilen yöntemde ekstraksiyon verimine pH etkisinin incelenmesi Bölüm 8’ de belirtilen şartlar altında yapıldı. Şekil 8.1 ve Tablo 8.1’de görüldüğü üzere Irinotecan hidroklorür ilacına ait maksimum absorbans değeri pH 4’te görüldü. Bu sonuçlar ışığında geliştirilen yöntemde etkileşimin maksimum olduğu pH değeri pH 4 olarak belirlendi.

9.1.2 İyonik Sıvı (1-Hegzil-3-metilimidazolyum) Hacminin Etkisi

Irinotecan hidroklorür ilacı etken maddesinin ekstraksiyonu amacıyla geliştirilen yöntem üzerine ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan iyonik sıvı hacminin ekstraksiyon verimine etkisi Bölüm 8’de belirtilen şartlarda yapıldı. Bu amaçla hazırlanan örneklerde iyonik sıvı hacmi 40-100 µL arasındaki farklı hacim değerlerinde deneyler gerçekleştirildi. Şekil 8.3 ve Tablo 8.3’deki sonuçlar doğrultusunda örnek içerisindeki iyonik sıvının derişimi arttıkça ekstraksiyon veriminde de artış olduğu belirlendi. İyonik sıvının hacminin maksimum olduğu değer 60 µL olarak bulundu. Bu sonuçlar ışığında geliştirilen yöntemde etkileşimin maksimum olduğu iyonik sıvı hacmi değeri 60 µL olarak belirlendi.

9.1.3 Dispersif Çözücü Cinsinin Etkisi

Dispersif çözücünün cinsinin ekstraksiyon verimine etkisi Bölüm 8’de belirtilen şartlarda yapıldı. Bu şartlar altında aseton, metanol ve etanol çözücülerini ile örnekler hazırlanıp deneyler yapıldı. Geliştirilen yöntemle yapılan deneyler

sonucu Tablo 8.4'deki sonuçlar doğrultusunda dispersif çözücü cinsinin etkisinde maksimum değer etanol kullanılarak elde edildi. Bu şartlar altında dispersif çözücü olarak etanol seçildi.

9.1.4 Dispersif Çözücü Hacminin Etkisi

Dispersif çözücünün hacminin ekstraksiyon verimine etkisi Bölüm 8'de belirtilen şartlarda yapıldı. Bu şartlar altında hazırlanan örneklerde dispersif çözücü olan etanol hacmi 0,3-0,75 mL arasındaki farklı hacim değerlerinde deneyler gerçekleştirildi. Şekil 8.4 ve Tablo 8.5'deki sonuçlar doğrultusunda geliştirilen yöntemle yapılan deneyler sonucu dispersif çözücü hacminin etkisinde maksimum değer 0,4 mL elde edildi. Bu şartlar altında dispersif çözücü hacmi, 0,4 mL olarak seçildi.

9.1.5 NaCl Derişiminin Etkisi

Geliştirilen yöntemle ekstraksiyon üzerine NaCl derişiminin etkisinin incelenmesi Bölüm 8'de belirtilen şartlarda yapıldı. Çalışmalar NaCl derişimi 0 M - 1 M arasındaki derişim değerlerinde değiştirilerek yapıldı. Şekil 8.5 ve Tablo 8.6'da görüldüğü gibi ortamda NaCl bulunmadığı durum ile ortamda NaCl bulunduğu durumlar arasında ekstraksiyon verimleri birbirine yakın bulundu. Bu sonuçlar doğrultusunda örnek içerisinde bulunan NaCl derişiminin ekstraksiyon verimi üzerine etkisinin bulunmadığı kabul edilerek hazırlanacak örneklere NaCl eklenmemesine karar verildi.

9.1.6 Çalkalama Süresinin Etkisi

Geliştirilen yöntemle ekstraksiyon üzerine çalkalama süresinin etkisinin incelenmesi Bölüm 8'de belirtilen şartlarda yapıldı. Çalkalama süresinin ekstraksiyon verimine etkisinin incelenmesi için 2-15 dakikalar arasındaki farklı çalkalama sürelerinde çalışmak suretiyle örnekler hazırlanıp deneyler yapıldı. Şekil 8.6 ve Tablo 8.7'de görüldüğü gibi maksimum absorbans değerleri 2 dakika

çalkalama süresi ile elde edildi. Bu şartlar altında çalkalama süresi 2 dakika olarak seçildi.

9.1.7 Santrifüj Süresinin Etkisi

Geliştirilen yöntemle ekstraksiyon üzerine santrifüj süresinin etkisinin incelenmesi Bölüm 8’de belirtilen şartlarda yapıldı. Santrifüj süresinin ekstraksiyon verimine etkisinin incelenmesi için 2-15 dakikalar arasındaki farklı santrifüj sürelerinde çalışmak suretiyle örnekler hazırlanıp deneyler yapıldı. Şekil 8.7 ve Tablo 8.8’de görüldüğü gibi maksimum absorban değerleri 7 dakika santrifüj süresi ile elde edildi. Bu şartlar altında çalkalama süresi 7 dakika olarak seçildi.

9.2 Yabancı İyon Etkisi

Geliştirilen yöntemle ekstraksiyon üzerine yabancı iyon etkisinin incelenmesi Bölüm 8’de belirtilen şartlarda yapıldı. Tablo 8.9’da görüldüğü gibi Irinotecan ilaç etken maddesine ait sinyaller üzerine varsa girişimcilerin etkilerini belirlemek amacıyla örneklerde sıkça rastlanan iyon türlerinin etkileri incelendi. Irinotecan’ın önderiştirilmesi ve tayini amacı ile geliştirilen yöntem üzerine 100 mg L⁻¹ derişiminde yabancı katyonlar (Fe⁺³; Cr⁺³; Mn⁺²; Ba⁺²; Ca⁺²; Mg⁺²; Co⁺²; Pb⁺²; Ni⁺²; Cd⁺²; Sr⁺²; Cu⁺²) ve anyonların (Cl⁻; PO₄⁻³; CO₃⁻²; NO₃⁻) ve 10 mg L⁻¹ hümik asidin etkisinin incelenmesi amacı ile örnekler hazırlandı ve deneyler yapıldı. Geliştirilen yöntem uygulanarak hesaplanan ve Tablo 8.9’da verilen % geri kazanım değerlerinden de görüldüğü gibi bu anyon ve katyonların ve hümik asidin Irinotecanın ekstraksiyonu üzerine herhangi bir girişim etkisinin olmadığı görüldü.

9.3 Önderiştirme Deneyleri

Önderiştirme deneyi, Bölüm 8’de belirtilen şartlarda 5 farklı hacimdeki örnek üzerinde yapılarak çalışılan yöntemin önderiştirme için uygunluğu

incelendi. Geliştirilen yöntem uygulanarak Tablo 8.10’da görüldüğü gibi verilen değişik önderiştirme faktörleri ve bu önderiştirme faktörleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda % geri kazanım değerleri hesaplandı. Farklı örnek hacimlerinde oldukça iyi geri kazanım değerleri elde edildi bu da yöntemin yüksek önderiştirme faktörüne sahip olması nedeni ile düşük derişimdeki Irinotecan’ın tayini amacı ile kullanılabilceğini gösterdi.

9.4 Geliştirilen Yöntemin Örneklerde Uygulanması

9.4.1 Çeşme Suyu Analizi

Geliştirilen yöntemle Bölüm 8’de belirtilen şartlarda çeşme suyu örneği üzerinde yapılan Irinotecan hidroklorür etken maddesi miktarı tayini için elde edilen sonuçlar Tablo 8.12, Tablo 8.13 ve Şekil 8.9’da verildi. Ayrıca yöntemin doğruluğunun ve tekrarlanabilirliğinin kontrolü için aynı şekilde bu sefer içerisine belirli miktar Irinotecan hidroklorür ilacı etken maddesi eklenen çeşme suyu örneği yöntemin geri kazanım veriminin belirlenmesi amacıyla analiz edildi. Analiz sonuçlarından elde edilen değerler değerlendirildiğinde sonuçların tatmin edici geri kazanım yüzdesinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar yöntemin çeşme suyu örneğinde kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Elde edilen geri kazanım yüzdesi Tablo 8.13’te de görüldüğü gibi 99,1 olarak bulunmuştur.

9.4.2 Dere Suyu Analizi

Geliştirilen yöntemle Bölüm 8’de belirtilen şartlarda dere suyu örneği üzerinde yapılan Irinotecan hidroklorür etken maddesi miktarı tayini için elde edilen sonuçlar Tablo 8.14, Tablo 8.15 ve Şekil 8.10’da verildi. Ayrıca yöntemin doğruluğunun ve tekrarlanabilirliğinin kontrolü için aynı şekilde bu sefer içerisine belirli miktar Irinotecan hidroklorür ilacı etken maddesi eklenen dere suyu örneği yöntemin geri kazanım veriminin belirlenmesi amacıyla analiz edildi. Analiz sonuçlarından elde edilen değerler değerlendirildiğinde sonuçların tatmin

edici geri kazanım yüzdesinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar yöntemin dere suyu örneğinde kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Elde edilen geri kazanım yüzdesi Tablo 8.15'te de görüldüğü gibi 109,5 olarak bulunmuştur.

9.4.3 İdrar Analizi

Geliştirilen yöntemle Bölüm 8'de belirtilen şartlarda idrar örneği üzerinde yapılan Irinotecan hidroklorür etken maddesi miktarı tayini için elde edilen sonuçlar Tablo 8.16'te verildi. Ayrıca yöntemin doğruluğunun ve tekrarlanabilirliğinin kontrolü için aynı şekilde bu sefer içerisine belirli miktar Irinotecan hidroklorür ilacı etken maddesi eklenen idrar örneği yöntemin geri kazanım veriminin belirlenmesi amacıyla analiz edildi. Analiz sonuçlarından elde edilen değerler değerlendirildiğinde sonuçların tatmin edici geri kazanım yüzdesinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar yöntemin idrar örneğinde kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Elde edilen geri kazanım yüzdesi Tablo 8.16'da görüldüğü gibi 96,1 olarak bulunmuştur.

9.5 Sonuç

Bu çalışmada dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yöntemi ile Irinotecan hidroklorür ilacı etken maddesinin önderiştirilmesi amacıyla bir önderiştirme yöntemi geliştirildi. Bu amaç ile pH, dispersif çözücü cinsinin seçimi, dispersif çözücü hacmi, ekstraksiyon çözücüsü hacmi, NaCl derişimi, çalkalama süresi, santrifüjleme süresi gibi farklı parametrelerin etkileri optimize edildi.

Genellikle dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemlerinde, ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildikten sonra dipte oluşan yüksek yoğunluklu mikrodamlı bir enjektör yardımı ile alınıp ısıtılarak çözücü kısmı buharlaştırılır ve çökelti fazı bir asit yardımıyla çözünerek uygun bir analitik yöntem ile birlikte tayin edilir. Geliştirilen dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildikten sonra sulu faz damlalık yardımıyla ayrılarak ve deney tüpünün dibinde kalan analiti içeren yüksek yoğunluklu mikrodamlı üzerine uygun bir tamamlama çözeltisi eklendikten

sonra irinotecan UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile tayin edildi. Bu doğrultuda geliştirilen yöntem, diğer yöntemlerle kıyasla uygulamada kolaylık, basitlik, hız, organik çözücünün az tüketimi, yüksek geri kazanım, düşük hacimlerde örneklerle çalışma imkanı sağlaması ve çevre dostu bir yöntem olması gibi birçok avantaj sağlamaktadır.

Yöntemin tayin sınırının düşük olması ve girişimcilere karşı toleransının yüksek olması önerilen yöntemin Irinotecan hidroklorür ilacının tayini için uygun bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen yöntemin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği çeşme suyu, dere suyu ve idrar örneklerinde yapılan analizler sonucunda tatmin edici analitik sonuçlara ulaşılarak gösterilmiştir. Elde edilen deneysel sonuçlar geliştirilen yöntemin çeşitli örneklerdeki düşük konsantrasyonlardaki irinotecan hidroklorür ilacının tayinine uygulanabileceğini göstermektedir.

10. KAYNAKLAR

- [1] Yılmaz, E., “Karbon Nanotüp Üzerinde Bazı Metal İyonlarının Zenginleştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Kayseri, 1, (2012).
- [2] Yılmaz E ve Soylak M., “Development a novel supramolecular solvent microextraction procedure for copper in environmental samples and its determination by microsampling flame atomic absorption spectrometry”, *Talanta*, 126,191-195, (2014).
- [3] Sahmetlioğlu E, Yılmaz E, Aktaş E, et al., “Polypyrrole/multi-walled carbon nanotube composite for the solid phase extraction of lead(II) in water samples”, *Talanta*, 119,447-451, (2014).
- [4] Kantürer, D., “Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Tekniği İle Cu(II)’nin Önderiştirilmesi ve FAAS İle Tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Balıkesir, 19, (2012).
- [5] Elyas, N., “DLLME Yöntemi İle Antimon (III)’ün Zenginleştirilmesi, Faktöriyel Tasarım Kullanarak Deneysel Koşulların Optimizasyonu ve FAAS İle Tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Denizli, 2, (2011).
- [6] Kunimoto T, Nitta K, Tanaka T, Uehara N, Baba H, Takeuchi M, Yokokura T, Sawada S, Miyasaka T ve Mutai M., “Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors”, *Cancer Res.* , 47(22), 5944, (1987).
- [7] Irmak, O., “KANSER NEDİR?”, (Web adresi: <http://bilheal.bilkent.edu.tr/aykonu/ay2005/april05/kanser.html>), (2005).

- [8] Malisza, K.L. ve Hassinof, B.B., “Production of Hydroxyl Radical by Iron (III) Anthraquinone Complexes Through Self-Reduction and Through Reductive Activation by The Xanthine Oxidase / Hypoxanthine System”, *Arc. Of Biochem and Biop.*, 321 (1), (1995).
- [9] Walden, P., “IONIC LIQUIDS”, (Web adresi: https://tr.wikipedia.org/wiki/İyonik_sıvı#cite_note-:2-3), (1914).
- [10] Bardak, F., “Dynamic Of Probes In Ionic Liquids From Ultrafast To Ultraslow”, Doktora Tezi, *Texas Tech University*, Texas, 4, (2013).
- [11] Yılmaz, S.İ., “İyonik Sıvıların Sulu Çözeltilerden Aktif Karbon İle Adsorpsiyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Fiziksel Kimya Programı*, İstanbul, 1, (2011).
- [12] Çelik, İ., “Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Yöntemi İle Nadir Toprak Elementlerinin Önderiştirilmesi Ve ICP-MS İle Tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Balıkesir, 13-14, 18, (2014).
- [13] Çiltaş, U., “Diklofenak Etkin Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı*, Erzurum, 16, (2014).
- [14] Öksüz, M., “İnorganik Arsenik Bileşiklerinin HPLC/UV Yöntemi İle Tayinleri”, Yüksek Lisans Tezi, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Manisa, 13, (2014).
- [15] Akpınar, D., ‘Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu İle Amonyak’ın Önderiştirilmesi Ve Tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programı*, İstanbul, 9, (2013).
- [16] KOMİSYON, “Ayrırma ve İzole Etme Metodları”, “Ege Üniversitesi Yayınları”, 2. Basım, İzmir, 146.

- [17] Bayhan, Z., “Çeşitli örneklerde dispersif sıvı -sıvı mikro ekstraksiyon ile nikel tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, Kayseri, 14, (2012).
- [18] Zahoor, M., “Bazı Organik Maddelerin Adsorpsiyon- Filtrasyon Ve Adsorpsiyon Membran Hibrid Sistemleri ile Sulardan”, Doktora Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Mühendislik Fakültesi Kimya Anabilim Dalı Fiziksel Kimya Programı*, İstanbul, 17, (2011)
- [19] Alver, E., “Sigara İzmarit Zifirinde Pah’ların HPLC/UV Sistemde Tayini: Zenginleştirme Ve Ön temizlemede Oyuk (Hollow) Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon’un (HF-LPME) Kullanılması”, Doktora Tezi, *Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Kırıkkale, 30-31, (2011).
- [20] Sarafraz-Yazdi A. Amiri A., “*Liquid-phase microextraction*”, *TrAC*; 29, 1-14, (2010).
- [21] Zgoła-Grzeškowiak A ve Grzeškowiak T., “*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*”, *TrAC*; 30, 1382–1399, (2011)
- [22] Altun, F., “Zenginleştirme Yöntemleri İle Bazı Ağır Metallerin Tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programı*, Denizli, 12-13, (2013).
- [23] Kılınçer, M., “Gıda Ürünlerinde Sudan Boyalarının Analizinde Yeni Sıvı Ekstraksiyonu Tekniklerinin Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, İzmir, 7, (2014).
- [24] Rezaee, M., Yamini, Y. and Faraji, M., “Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method”, *Journal of Chromatography A*, 1217, 2342-2357, (2010).
- [25] Bidabadi, M. S., Dadfarnia, S., Shabani, A. M. H., “Solidified floating organic drop microextraction (SFODME) for simultaneous separation/

preconcentration and determination of cobalt and nickel by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS)”, *Journal of Hazardous Materials*, 166, 291–296, (2009).

[26] Altundağ, H., “Katı Faz Ekstraksiyon Tekniği ile Talyum Türlendirme Çalışması”, Doktora Tezi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü*, Sakarya, 48, (2007).

[27] Saygı, K. Ö., “Katı Faz Ekstraksiyonu ve Birlikte Çöktürme ile Bazı Metal İyonlarının Zenginleştirilmesi ve Türlendirilmesi”, Doktora Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Tokat, 7, 12-13, (2010).

[29] Çıtak, D., “Katı Faz Ekstraksiyonu, Birlikte Çöktürme ve Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu ile Bazı Metallerin Zenginleştirilmesi ve Türlemesi”, Doktora Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Tokat, 13-14, (2010).