



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**ÇEVRESEL SULARDA İLAÇ ANALİZİ İÇİN
ÇİFT KATMANLI HİDROKSİTLERE
DAYANAN BİR OTOMATİK DİSPERSİF KATI
FAZ MİKROEKSTRAKSİYON YÖNTEMİNİN
ŞİRINGA-İÇİNDE-LABORATUVAR İLE
GELİŞTİRİLMESİ**

Hilal Rabia ÇEVİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Sercan YILDIRIM

TRABZON-2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

28/04/2025
Hilal Rabia ÇEVİK

TEŞEKKÜR

Her zaman destekleyici yaklaşımıyla bana rehberlik eden, değerli bilgi ve deneyimiyle tez çalışmam boyunca bana yol gösteren ve akademik gelişimime katkıda bulunan danışman hocam Doç. Dr. Sercan YILDIRIM'a,

Tez çalışmam süresince zengin bilgi ve tecrübesi ve değerli önerileriyle çok önemli katkılarda bulunan Doç. Dr. Burkhard HORSTKOTTE'ye,

Tez çalışmalarımın her aşamasında büyük bir emekle bana değerli yardımlarını sunan arkadaşlarım Ecz. Tuğçe ÖZYİĞİT ve Arzu KOCAOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim süresince bana sağladıkları değerli bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma,

Tez çalışmamı 3501 - Kariyer Geliştirme Programı kapsamında 123Z797 numaralı proje ile destekleyen TÜBİTAK'a,

Hayatım boyunca yanımda olan, her durumda destekleriyle bana güç ve cesaret veren tüm arkadaşlarıma,

Hayatımın her anında sonsuz sevgi ve fedakarlıkla beni destekleyen ve yanımda olan aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hilal Rabia ÇEVİK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hipertansiyon ve Antihipertansif İlaçların Sınıflandırılması	4
2.2. Anjiyotensin Reseptör Blokörleri (ARB)	6
2.2.1. Losartan	8
2.2.1.1. Fizikokimyasal Özellikleri	8
2.2.1.2. Farmakokinetik Özellikleri	9
2.2.2. Valsartan	9
2.2.2.1. Fizikokimyasal Özellikleri	9
2.2.2.2. Farmakokinetik Özellikleri	10
2.2.3. İrbesartan	10
2.2.3.1. Fizikokimyasal Özellikleri	10
2.2.3.2. Farmakokinetik Özellikleri	11
2.2.4. Kandesartan Sileksetil	11
2.2.4.1. Fizikokimyasal Özellikleri	11
2.2.4.2. Farmakokinetik Özellikleri	12
2.3. ARB'lerin Analizi İçin Literatürdeki Bazı Analiz Yöntemleri	12
2.4. Örnek Hazırlama	17
2.4.1. Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemi (SPE)	18
2.4.2. Dispersif Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemi (DSPE)	19

2.4.3. Dispersif Mikro Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemi (DMSPE)	19
2.5. Çift Katmanlı Hidroksitler (LDH)	21
2.6. Akış Teknikleri	23
2.7. Şırınga-İçinde-Laboratuvar (LIS)	24
2.8. Kromatografi	28
2.9. Kromatografide Temel Parametreler	29
2.9.1. Alıkonma Zamanı (t_R) ve Alıkonma Hacmi (V_R)	29
2.9.2. Kapasite Faktörü (k)	30
2.9.3. Seçicilik Faktörü (α)	30
2.9.4. Resolüsyon (R)	30
2.9.5. Kolon Etkinliği	31
2.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	31
2.10.1. Hareketli Faz Rezervuarları ve Çözücü Filtrasyonu	33
2.10.2. Gaz Giderim Ünitesi	33
2.10.3. Pompalama Sistemleri	33
2.10.4. Otomatik Örnekleyiciler	33
2.10.5. Kolon	34
2.10.6. Dedektörler	34
3. GEREÇ ve YÖNTEM	35
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	36
3.3. Kullanılan Etkin Maddeler	37
3.4. Kullanılan Kolonlar	38
3.5. Çözeltilerin Hazırlanması	38
3.6. Örnek Hazırlanması	39
3.7. Kromatografik Şartlar	43
3.8. Ni-Fe Temelli LDH'ın Karakterizasyonu	44
3.9. Yöntem Validasyonu	44
3.9.1. Doğrusallık	44
3.9.2. Duyarlılık	45
3.9.3. Doğruluk ve Kesinlik	45
3.9.4. Geri Kazanım	45
3.9.5. Zenginleştirme Faktörü	45

3.10. Yöntem Geçerliliğinin Gerçek Örnek Analizlerinde Kanıtlanması İçin Yürütülen Validasyon Çalışmaları	45
3.11. Yeşillik Değerlendirmesi	46
4. BULGULAR	47
4.1. Dalga Boyu Seçimi	47
4.2. Gradient Şartların Belirlenmesi	47
4.3. Yöntem Geliştirilmesi	48
4.3.1. Örnek Hazırlama İşleminin Optimizasyonu	48
4.3.1.1. Öncül Tipinin Optimizasyonu	48
4.3.1.2. Ni-Fe Temelli LDH'nin Karakterizasyonu	50
4.3.1.3. İyonik Şiddetin LDH Oluşumu ve Sedimentasyon Hızı Üzerine Etkisi	51
4.3.1.4. NH ₃ Hacminin Optimizasyonu	52
4.3.1.5. Öncül Çözelti Hacminin Optimizasyonu	53
4.3.1.6. Karıştırma Hızı ve Süresinin Optimizasyonu	54
4.3.1.7. Elüsyon Çözücü Bileşiminin Seçimi	56
4.3.2. Enjeksiyon Hacmi	57
4.4. Yöntem Validasyonu	57
4.4.1. Doğrusallık	57
4.4.2. Duyarlılık	59
4.4.3. Doğruluk ve Kesinlik	59
4.4.4. Geri Kazanım	60
4.4.5. Zenginleştirme Faktörü	60
4.5. Yöntem Geçerliliğinin Gerçek Örnek Analizlerinde Kanıtlanması İçin Yürütülen Validasyon Çalışmaları	60
4.6. Yöntemin Gerçek Örnek Analizlerinde Uygulanması	63
4.7. Yeşillik Değerlendirmesi	63
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	64
6. KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	84

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Kullanılan kimyasal maddelerin listesi	35
Tablo 2.	Kullanılan araç ve gereçlerin listesi	36
Tablo 3.	Kullanılan etkin maddelerin listesi	38
Tablo 4.	LIS sisteminde otomatik DMSPE yöntemi	41
Tablo 5.	Rutin “CleanSyringe”	42
Tablo 6.	Rutin “CleanSyringeAndTransferLine”	43
Tablo 7.	Hareketli faz gradient programı	44
Tablo 8.	Analitlerin LOD ve LOQ değerleri	59
Tablo 9.	Geliştirilen yöntemin analitler için doğruluk ve kesinlik sonuçları	60
Tablo 10.	Nehir, göl ve musluk suyu örneklerinde ARB analizi için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk sonuçları	61
Tablo 11.	ARB’lerin analizine yönelik literatürde bildirilen bazı örnek hazırlama yaklaşımları	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Antihipertansif ilaçların sınıflandırılması ve örnekleri	4
Şekil 2. Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi	6
Şekil 3. LOS'un açık formülü	9
Şekil 4. VALS'ın açık formülü	10
Şekil 5. IRBE'nin açık formülü	11
Şekil 6. CANDE'nin açık formülü	12
Şekil 7. LDH'ların yapısı	21
Şekil 8. Yukarıdan aşağı konumlandırılmış bir LIS sistemi	26
Şekil 9. Alıkonma zamanı (t_R), ölü zaman (t_0) ve pik genişliğinin (w) kromatogram üzerinde gösterimi	30
Şekil 10. Üç farklı resolüsyon değerine sahip iki pikin kromatogram üzerinde gösterimi	31
Şekil 11. HPLC cihazının bölümleri	32
Şekil 12. Deneylerde kullanılan LIS-HPLC sisteminin şematik gösterimi	37
Şekil 13. Optimum gradient koşullarında elde edilen kromatogram	47
Şekil 14. Farklı öncüller kullanılarak sentezlenen LDH'ların kullanılması ile analitler için elde edilen (A) Zenginleştirme faktörleri ve (B) Geri kazanım değerleri	49
Şekil 15. Ni-Fe-NO ₃ LDH'ın (A) FT-IR spektrumu, (B) XRD toz kırınım deseni ve (C) FE-SEM görüntüsü	50
Şekil 16. NaNO ₃ aspirasyonunun çökme hızına etkisi. Şırınganın (A) derişik NaNO ₃ (%60) çözeltisi eklenmeden, (B) 50 µL, (C) 100 µL, (D) 200 µL, (E) 500 µL, (F) 1000 µL ve (G) 2000 µL derişik NaNO ₃ (%60) çözeltisi eklenmiş ortamdaki çökmelerinin görüntüsü	51
Şekil 17. NaNO ₃ çözeltisinin aspirasyon sırasının analitlerin pik alanları üzerine etkisi	52
Şekil 18. NH ₃ hacminin analitlerin pik alanı üzerine etkisi	53
Şekil 19. Öncül çözelti hacminin analitlerin pik alanları üzerine etkisi	53
Şekil 20. (A) 400 µL, (B) 600 µL, (C) 800 µL, (D) 1000 µL prekürsör çözeltisi ile 3 dk karıştırma yapıldıktan sonra elde edilen çökme görüntüsü	54

Şekil 21.	Şırınga içi karıştırma hızının analitlerin pik alanları üzerine etkisi	55
Şekil 22.	Şırınganın (A) 1200 rpm, (B) 2900 rpm, (C) 4500 rpm karıştırma hızıyla ekstraksiyonundan 30 saniye sonraki çökme görüntüsü	55
Şekil 23.	Karıştırma süresinin analitlerin pik alanları üzerine etkisi	56
Şekil 24.	Elüsyon çözücüsü bileşiminin analitlerin pik alanları üzerine etkisi	56
Şekil 25.	Standart ARB çözeltisinin otomatik DMSPE ardından 200 µL ekstrakt enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	57
Şekil 26.	Analitlere ait kalibrasyon eğrileri	58
Şekil 27.	Analitlere ait doğrusallık kontrol grafikleri	59
Şekil 28.	Analiz edilen örneklere ait boş ve bilinen miktarda analit eklenmiş (spiked) kromatogramlar	62
Şekil 29.	AGREEprep metriği kullanılarak HPLC yönteminin yeşillik değerlendirilmesi	63

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ACN	Asetonitril
AMI	Akut miyokard enfarktüsü
ARB	Anjiyotensin reseptör blokörleri
AT₁	Anjiyotensin tip 1
AT₂	Anjiyotensin tip 2
BSH	Bağıl Standart Hata
BSS	Bağıl Standart Sapma
CANDE	Kandesartan sileksetil
CDC	ABD Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezleri
cm	Santimetre
dk	Dakika
DLLME	Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu
DMSPE	Dispersif mikro katı faz ekstraksiyonu
DSPE	Dispersif katı faz ekstraksiyonu
EPRO	Eprosartan
ESC	Avrupa Kardiyoloji Derneği
FEP	Florlu etilen propilen
FE-SEM	Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu
FT	Akış teknikleri
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
g	Gram
GAC	Yeşil analitik kimya
GC	Gaz kromatografisi
GrC	Yeşil kimya
H	Plaka yüksekliği
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IRBE	İrbesartan
k	Kapasite faktörü
KKB	Kalsiyum Kanal Blokörleri
L	Kolon uzunluğu

L	Litre
LIS	Şırınga-içinde-laboratuvar
LOD	Tespit alt sınırı
LOS	Losartan
LOQ	Tayin alt sınırı
LPME	Sıvı faz mikroekstraksiyonu
MBBR	Hareketli yataklı biyofilm reaktörleri
mg	Miligram
mL	Mililitre
mmHg	milimetre cıva
MIONP	Manyetik demir oksit nanopartikülleri
MIP	Moleküler baskılanmış polimerler
MOF	Metal organik çerçeveler
MOFCu@GO	Grafen oksit ile işlevselleştirilmiş Cu (II) bazlı MOF
MPC	Manyetik gözenekli karbonlar
MS/MS	Tandem kütle spektrometrisi
MWCNTs	Kitosan ile işlevselleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüpler
N	Teorik plaka sayısı
ng	Nanogram
NI	Negatif elektrosprey iyonizasyon
nm	Nanometre
OLME	Olmesartan
PEEK	Polieter eter keton
PI	Pozitif elektrosprey iyonizasyonu
ppm	Milyonda bir
PTFE	Politetrafloroetilen
R	Resolüsyon
RAAS	Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi
RACNT	Kısıtlı erişimli karbon nanotüpler
rpm	Devir
SIA	Sıralı enjeksiyon analizi
sn	Saniye
SPE	Katı faz ekstraksiyonu

SPME	Katı faz mikroekstraksiyonu
t_0	Ölü zaman
TELMİ	Telmisartan
TFA	Trifloroasetik asit
t_R	Alıkonma zamanı
UHPLC	Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UPLC	Ultra performanslı sıvı kromatografisi
VALS	Valsartan
V_R	Alıkonma hacmi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XRD	X-ışını difraktometresi
μm	Mikrometre
w	Pik genişliği
Simgeler	
>	Büyüktür
$\geq$	Büyük eşittir
°	Derece
Formüller	
Al	Alüminyum
C₂₂H₂₃ClN₆O	Losartan
C₂₄H₂₉N₅O₃	Valsartan
C₂₅H₂₈N₆O	İrbesartan
Ca	Kalsiyum
CaCO₃	Kalsiyum karbonat
Cl	Klor
Co	Kobalt
CO₃⁻²	Karbonat
Cr	Krom
Fe	Demir
Fe₃O₄	Demir oksit
FeCl₃.6H₂O	Demir (III) klorür heksahidrat
H₂CO₃	Karbonik asit
HCO₃⁻	Bikarbonat

HCl	Hidroklorik asit
K	Potasyum
Mg	Magnezyum
Na	Sodyum
NaNO₃	Sodyum nitrat
NaOH	Sodyum hidroksit
NH₃	Amonyak
Ni	Nikel
Ni(NO₃)₂.6H₂O	Nikel nitrat hekzahidrat
NO₃⁻	Nitrat
SO₄⁻²	Sülfat
Zn	Çinko

ÖZET

Çevresel Sularda İlaç Analizi için Çift Katmanlı Hidroksitlere Dayanan bir Otomatik Dispersif Katı Faz Mikroekstraksiyon Yönteminin Şırınga-İçinde-Laboratuvar ile Geliştirilmesi

Bu çalışmada, hipertansiyon tedavisinde kullanılan losartan, valsartan ve irbesartanın çevresel sulardaki tayini için çift katmanlı hidroksitlerin *in situ* sentezine dayanan yeni bir otomatik dispersif katı faz mikroekstraksiyon yöntemi, şırınga-içinde-laboratuvar (LIS) ile geliştirilmiştir. Bu yaklaşımda önceden sentezlenmiş ya da manyetikleştirilmiş sorbentlere ihtiyaç duyulmadan öncü çözeltilerin aspirasyonunun ardından kontrollü pH ayarlaması ile şırınga boşluğu içinde Ni-Fe temelli çift katmanlı hidroksitler sentezlenmiştir. NaNO₃ ile iyonik şiddetin artırılması sonucu elde edilen artırılmış sedimentasyon hızı ile santrifüjleme ve filtreleme işlemlerine gerek kalmadan sorbentin örnek matrisinden ayrılması sağlanmıştır. LIS sistemi, HPLC-DAD ile çevrim içi olarak başarıyla birleştirilmiştir. Şırınga içi yıkama ve çökeleğin çözülmesinden sonra elde edilen ekstraktın düşük organik çözücü içeriği, yüksek hacimli enjeksiyona imkân tanıyarak yöntem duyarlılığını artırmıştır. Öncül tipi ve hacmi, iyonik şiddet, pH, karıştırma hızı ve süresi ve elüsyon çözücüsünün bileşimi gibi parametreler optimize edilmiştir. Geri kazanım değerleri %62.0-88.7, zenginleştirme faktörleri 13.3-25.8 aralığındadır. Geliştirilen yöntem, tüm analitler için 5-100 µg/L konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Üç farklı konsantrasyon seviyesinde eklenen standartlar ile güçlendirilmiş gerçek örnekler için doğruluk %94.1-104.8 arasında olup BSS değerleri %3.5'tan düşüktür. Yöntemin uygulanabilirliği çevresel su örnekleri analiz edilerek kanıtlanmıştır. Geliştirilen yöntem otomasyon, enerji tüketimi ve operatör güvenliği açısından öne çıkmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Anjiyotensin reseptör blokörleri, çift katmanlı hidroksitler, dispersif mikro katı faz ekstraksiyon, laboratuvar otomasyonu, şırınga-içinde-laboratuvar

ABSTRACT

Development of an Automated Dispersive Solid Phase Microextraction Method Based on Layered Double Hydroxides for Drug Analysis in Environmental Waters by Lab-In-Syringe

In this study, a novel automated dispersive micro solid phase extraction method based on the *in situ* synthesis of layered double hydroxides was developed using a Lab-in-syringe for the determination of losartan, valsartan, and irbesartan, which are used in the treatment of hypertension, in environmental waters. In this approach, Ni-Fe-based layered double hydroxides were synthesized in the syringe void following the aspiration of precursor solutions and controlled pH adjustment, without the need for pre-synthesized or magnetized sorbents. The enhanced sedimentation rate obtained by increasing ionic strength with NaNO₃ allowed for the isolation of the sorbent from the sample matrix without the need for centrifugation or filtration. The Lab-in-syringe system has been successfully coupled online with HPLC-DAD. The low organic solvent content of the extract obtained after in-syringe washing and dissolution of the sediment enhanced the sensitivity by allowing for high-volume injection. Parameters such as the type and volume of the precursor, the effect of ionic strength, pH, mixing speed and duration, and the composition of the elution solvent were meticulously optimized. The recovery values ranged from 62.0% to 88.7%, and the enrichment factors ranged from 13.3 to 25.8. The developed method was linear for all analytes within the concentration range of 5-100 µg/L. The accuracy for spiked real samples at three different concentration levels ranged from 94.1% to 104.8%, and the BSS values were less than 3.5%. The applicability of the method has been demonstrated by analyzing environmental water samples. The developed method stands out in terms of automation, energy consumption, and operator safety.

Keywords: Angiotensin receptor blockers, dispersive micro solid phase extraction, laboratory automation, lab-in-syringe, layered double hydroxides

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Anjiyotensin reseptör blokerleri (ARB), renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin (RAAS) ana bileşenlerinden biri olan anjiyotensin-II'nin anjiyotensin tip I (AT₁) reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek vazodilatasyon sağlar ve kan basıncını düşürür. AT₁ reseptörlerine seçici bağlanmaları sayesinde, AT₂ reseptörlerini bloke etmeden bradikinin ve nitrik oksit aracılığıyla ek vazodilatasyon etkisi gösterirler (1, 2). Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörlerine kıyasla daha spesifik bir etki mekanizmasına sahip olmaları, yan etki oranlarını düşürerek hasta uyumunu artırır. Bu özellikleri nedeniyle ARB'ler, çeşitli klinik kılavuzlarda birinci basamak antihipertansif tedavi olarak önerilmektedir. Klinik çalışmalar, bu ilaçların tek başına veya diğer antihipertansiflerle kombinasyon halinde etkili bir şekilde kan basıncını düşürdüğünü göstermektedir (3, 4).

ARB'ler, yaygın olarak kullanılan antihipertansif ilaçlar olup; ARB'lerin birçok üyesi, 5 Avrupa ülkesi, Avustralya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde en çok reçete edilen 100 ilaç arasında yer almaktadır. Losartan (LOS), kandesartan (CANDE), irbesartan (IRBE), telmisartan (TELMİ) ve valsartan (VALS) sırasıyla en çok reçete edilen 14., 26., 54., 59. ve 80. ilaçlardır (5, 6). Yüksek tüketim oranları ve metabolizma sonrası idrar veya dışkı yoluyla atıldıkları için atık sulara ve doğal su kaynaklarına karışarak ekosistem ve halk sağlığı açısından potansiyel riskler oluşturabilmektedirler. Atık su arıtma tesislerinin bu bileşikleri tamamen giderememesi nedeniyle de yüzey, yeraltı ve içme sularında ng/L'den mg/L'ye kadar değişen düşük konsantrasyonlarda bulunabilirler. Bu bağlamda, bu bileşiklerin çevresel sularda tespiti, halk sağlığı ve ekosistem sürdürülebilirliği için kritik olup, düşük konsantrasyonların belirlenmesi etkili numune hazırlama ve ön konsantrasyon tekniklerini gerektirir (7).

Örnek hazırlama, biyolojik ve çevresel örneklerde ilaç konsantrasyonlarının doğru bir şekilde ölçülmesi için analitik süreçte harcanan toplam zamanın yaklaşık %80'ini alabilen çok önemli bir basamaktır (8). Bu nedenle hedef analitleri izole etmek ve zenginleştirmek ve matris girişimlerini en aza indirmek için örnek hazırlama yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Bu bağlamda dispersif mikro katı faz ekstraksiyonu (DMSPE), sorbentin örnek çözeltisi içine dağıtıldığı ve hidrojen bağı, π - π bağı, dipol-dipol etkileşimleri gibi farklı etkileşimler aracılığıyla analitlerin tutulduğu bir örnek hazırlama yöntemidir. Yüksek ekstraksiyon verimliliği, yüksek zenginleştirme

faktörü ve düşük örnek tüketimi sayesinde gerçek örneklerdeki çeşitli analitleri ekstre etmek, temizlemek ve konsantre etmek için uygulanabilen basit, hızlı ve ucuz bir tekniktir (9).

Örnek hazırlama yöntemlerinin otomasyonu, analitik kimyada verimliliği artıran, tehlikeli maddelere maruz kalma riskini azaltan ve çevresel etkileri en aza indiren önemli bir gelişme olarak öne çıkmaktadır. Yeşil analitik kimya kapsamında, özellikle mikroekstraksiyon tekniklerinin otomasyonu, reaktif ve çözücü tüketimini azaltarak atık oluşumunu en aza indirirken, işlem süresini kısaltıp analiz doğruluğunu artırmaktadır. Ayrıca, insan müdahalesinin azalması sayesinde kontaminasyon riski önlenmekte ve araştırmacılar için daha güvenli bir çalışma ortamı sağlanmaktadır. Tüm bu avantajlar, mikroekstraksiyon tekniklerinin otomasyonunu modern analitik laboratuvarlar için cazip ve sürdürülebilir bir seçenek haline getirmektedir (10, 11).

Çift katmanlı hidroksitler (LDH), hidrotalsit benzeri bileşikler veya anyonik killer olarak da bilinen, pozitif yüklü metal hidroksit katmanları ile bu katmanlar arasında yer alan yük dengeleyici anyonlar ve su moleküllerinden oluşan nanoyapılı inorganik malzemelerdir. Katmanlar arası elektrostatik etkileşimler LDH yapısının kararlılığını sağlar. LDH oluşumunda yarıçapları Mg^{+2} ve Al^{+3} iyonlarından çok farklı olmamak koşulu ile çeşitli metal kombinasyonlarını kullanılabılır. Geniş yüzey alanı sunmaları, düşük maliyetli öncüller ile kolayca sentezlenebilmeleri, metal katmanlarının kimyasal bileşimlerinin ayarlanabilirliği, biyouyumlu olmaları gibi çeşitli avantajları ile özellikle SPE yöntemlerinde kullanılırlar. LDH'ların en ilginç özelliklerinden biri ortam pH'ına bağlı olarak çökme-çözünme potansiyeli göstermeleridir. Bu özellikleri ile *in situ* olarak kolayca sentezlenirler. Süreçte analitleri içeren bazik bir çözeltiye LDH öncülleri eklenir ve sorbent oluşumu ve ekstraksiyon eş zamanlı olarak gerçekleşir. Daha sonra LDH'lar santrifüj ya da filtrasyon yoluyla toplanır ve asidik ortamda çözünürler. Böylelikle elüsyon adımı ortadan kalkar ve ekstraksiyon süresi kısalır (12, 13).

Şırınga-içinde-laboratuvar (LIS), bilgisayar kontrollü otomatik bir şırınga pompasının boşluğunu, kafa valfi yardımıyla çeşitli reaktiflerin aspire edilebildiği boyutu uyarlanabilir ve sızdırmaz bir reaktör olarak kullanan ve prensibi akış tekniklerine dayanan çok yönlü bir otomasyon sistemidir. Şırınga sisteminin kapalı yapısı, kontaminasyon ve kimyasallara maruz kalma riskini azaltırken, manyetik bir karıştırma çubuğu ile içeriğin homojen karışmasını ve etkili temizlenmesini sağlar. Ayrıca değiştirilebilir boyutu ve sıçrama olmadan 3000 rpm'e kadar dönüş hızı sağlayabilmesiyle açık haznelere kıyasla daha

güvenli ve kontrollü bir işlem sunar. Özellikle sıvı faz ya da katı faz ekstraksiyonu gibi çeşitli örnek hazırlama yöntemlerinde kullanılan LIS, uygun arayüzler aracılığıyla HPLC gibi enstrümental yöntemlere çevrim içi olarak bağlanabilir (14).

LIS, önceden sentezlenmiş sorbentleri izole etmek amacıyla manyetik ayırma veya çevrimiçi filtrasyonun kullanıldığı DMSPE tekniklerinin otomatikleştirilmesinde başarıyla uygulanmıştır (15–18). Bu tez çalışmasının amacı, sorbentin önceden sentezlenmesini veya manyetik hale getirilmesini gerektirmeyen tam otomatik bir LIS-DMSPE-HPLC-DAD yöntemi geliştirmektir. LDH'lar LIS sistemi içinde pH ayarlaması ile *in situ* olarak kolayca sentezlenmiş ve DMSPE'den sonra iyonik gücün artırılmasıyla hızlandırılmış sedimantasyon yoluyla izole edilmişlerdir. Ekstraksiyondan sonra şırıngaya asit aspirasyonu ile ekstra bir elüsyon adımına gerek kalmamış ve bu sayede analit kaybı önlenmiştir. Yapılan literatür taramasına göre, LDH'lar LIS-DMSPE'de ilk kez adsorban olarak kullanılacak olup, bu yöntem sorbentin ön sentezini veya manyetize edilmesini gerektirmeyen ve sorbent izolasyonunda hızlandırılmış sedimantasyon uygulayan ilk LIS-DMSPE uygulaması olacaktır. Ayrıca, geliştirilen DMSPE yönteminin HPLC'ye çevrim içi olarak bağlanması ve yüksek hacimde enjeksiyon yapılabilmesi sayesinde analitler analiz cihazında yüksek verimlilikle transfer edilebilmiş ve böylece daha yüksek yöntem duyarlılığı elde edilmiştir. Geliştirilen tam otomatik LIS-DMSPE-HPLC-DAD yönteminin uygulanabilirliği LOS, IRBE, VALS ve CANDE tespiti için çevresel suların analiz edilmesiyle kanıtlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipertansiyon ve Antihipertansif İlaçların Sınıflandırılması

Hipertansiyon, tekrarlanan ölçümlerde sistolik kan basıncının >140 mmHg, diastolik kan basıncının >90 mmHg olması durumudur (19). Primer (esansiyel) hipertansiyon ve sekonder hipertansiyon olmak üzere ikiye ayrılır. Sekonder hipertansiyon hipertansif hasta popülasyonunun çok küçük bir kısmını oluşturur ve renal hastalıklar, cushing sendromu, feokromositoma, akromegali, konjenital adrenal hiperplazisi gibi başka hastalıklara bağlı olarak ortaya çıkar. Primer hipertansiyon ise hipertansif nüfusun kalan büyük kısmını kapsamakla birlikte kökeni genetik arka plan, çok sayıda çevresel faktör ve yaşlanma süreci arasındaki karmaşık etkileşimlerdir (19, 20). Hipertansiyon dünyada en yaygın görülen kardiyovasküler hastalık olmakla birlikte Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre dünya genelinde 30-79 yaş arasındaki 1.28 milyar insanda görülmektedir (19). Dünya çapında insanların yaklaşık %20-30'unu etkileyen yaygın bir hastalık olması ve kardiyovasküler hastalık, serebrovasküler hastalık ve kronik böbrek hastalığı oluşumlarında da büyük rol oynaması sebebiyle önemli bir risk faktörüdür (21). Hipertansiyon teşhisi ve tedavisi kalp, beyin, damar ve böbrek hastalıklarının riskini ve eşlik eden ölüm oranını azaltması dolayısıyla önemlidir. İlaç tedavisi, klinik pratikte birinci basamak antihipertansif tedavi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu nedenle, antihipertansif ilaçlar sağlık hizmetleri ortamlarında en sık reçete edilen ilaçlar arasında yer almaktadır (22).

Avrupa Kardiyoloji Derneği'nin (ESC) 2018 yılında yayımladığı hipertansiyon kılavuzuna göre antihipertansif ilaçlar Şekil 1'de görüldüğü gibi beş ana gruba ayrılır (3).



Şekil 1. Antihipertansif ilaçların sınıflandırılması ve örnekleri

Yaygın olarak beta-blokörler olarak bilinen beta-adrenerjik reseptör blokörleri, kullanım alanı geniş bir farmakolojik sınıftır. Antihipertansif etkilerini kalp kasındaki beta1-adrenerjik reseptörlere norepinefrin bağlanmasını antagonize etmesiyle kalp atış hızını ve kan basıncını düşürerek gösterirler (23). 2014 yılında ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) tarafından yayınlanan kılavuzlarda felç riskini artırması sebep gösterilerek beta-blokörler, birinci basamak antihipertansif ilaç tedavisinden çıkarılsa da hala yaygın olarak kullanılmaktadır (24).

Diüretiklerin alt sınıfları olan tiazid diüretikler ve kıvrım diüretikler natriürezi ve diürezi artırır. Kıvrım diüretikler etkilerini henle kulbunun çıkan kolunda Cl^- ve Na^+ geri emilimini inhibe ederek gösterirken tiazid diüretikler ise distal tübülün apikal membranında Na^+ geri emilimini inhibe ederek gösterirler. Her iki grup da hücre dışı sıvı hacminde azalma meydana getirerek kan basıncını düşürür. Na^+ atılımının artmasıyla plazma hacminde meydana gelen azalma, venöz dönüşü azaltır ve kalp debisini düşürür. Böylelikle hipertansiyon tedavisinin yanında kalp yetmezliği ve nefrotik sendrom gibi durumlarda da terapötik açıdan önemlidirler (25, 26).

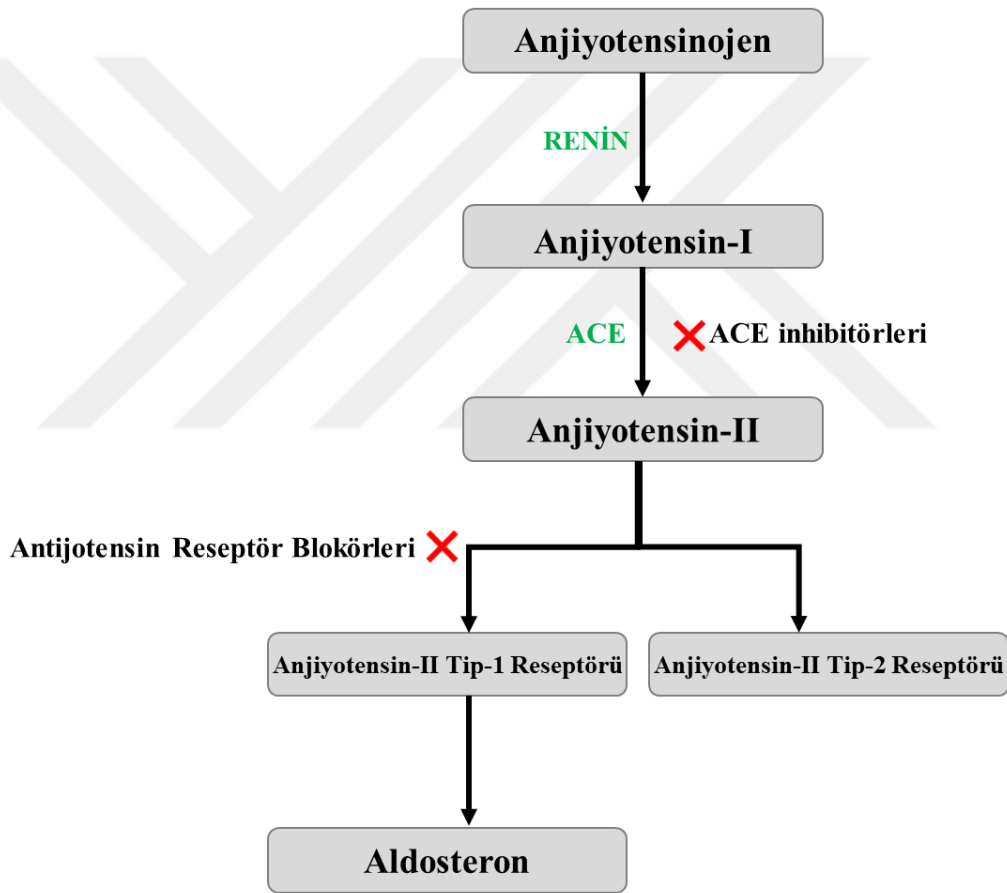
Kalsiyum kanal blokörleri (KKB), arter düz kasında voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını bloke ederek ekstraselüler kalsiyumun hücre içine girişini engeller. Böylelikle periferik vasküler direnç azalır ve kan basıncı düşer. Dihidropiridin türevleri genellikle L tipi kalsiyum kanallarını bloke ederek vazodilatasyon yaparlar. Bunun yanında amlodipin, efonidipin gibi yeni KKB'ler N ve/veya T tipi kalsiyum kanallarını da bloke ederler. Bu şekil ek blokajlar ile KKB'lerin hipertansiyon tedavisinde aynı zamanda organ koruyucu etkili olabileceği varsayılmaktadır. KKB'ler vazoselektif özellik göstermekle birlikte verapamil ve diltiazem kalp düz kası üzerindeki kalsiyum kanalları üzerinde de etkilidir (25, 27).

Anjiyotensin II, kan damarlarındaki vasküler düz kasları kasarak, periferik vasküler direnci artırarak ve böbreklerden su atılımını engellemek için adrenal korteksten aldosteron salgılayarak kan basıncını artıran vazokonstriktif bir peptittir ve ACE etkisiyle Anjiyotensin I'den oluşturulur. ACE inhibitörleri anjiyotensin I'den anjiyotensin II oluşumunu azaltarak kan basıncını düzenler ve anjiyotensin II'nin kardiyovasküler sistem üzerindeki zararlı etkilerini önler (28).

“Sartanlar” olarak da adlandırılan ARB'ler ise anjiyotensin II'nin etkilerini AT_1 reseptörlerini bloke ederek antagonize ederler (7).

2.2. Anjiyotensin Reseptör Blokörleri (ARB)

RAAS, vücutta kan basıncının ve elektrolit dengesinin düzenlenmesinde rol oynayan ve başlıca bileşenleri renin, anjiyotensinojen, anjiyotensin dönüştürücü enzim, anjiyotensin tip 1 ve tip 2 reseptörleri olan hormonal bir sistemdir (12). Böbreğin jukstaglomerüler hücreleri tarafından üretilen renin, anjiyotensinojeni anjiyotensin-I'e dönüştürerek RAAS hormonal kaskadını başlatır. Anjiyotensin-I biyolojik olarak inaktiftir ve ACE aktivasyonu ile anjiyotensin-II'ye dönüşür. Aktif form olan anjiyotensin-II, adrenal korteks üzerine etki ederek aldosteron salınımına neden olur (Şekil 2) (30).



Şekil 2. Renin anjiyotensin aldosteron sistemi

RAAS'ın ana metaboliti olan anjiyotensin-II, birçok farklı doku ve organ üzerinde etki ederek vazokonstriksiyonu artırır, sodyumun renal tübüler reabsorbsiyonunu artırma yoluyla kan akışını azaltır ve vasküler direnci artırır. Anjiyotensin-II'nin gereğinden fazla yükselmesi hipertansiyona neden olabilir ve kardiyovasküler hastalıkların morbidite ve mortalitesini artırabilir (1). Bu durumların önüne geçebilmek için RAAS inhibisyonu veya

AT₁ reseptörlerinin blokajı düşünülebilir. RAAS blokajının hipertansiyon, akut miyokard enfarktüsü (AMI) ve kronik sistolik kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarda faydalı olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda ACE inhibitörleri ve ARB, klinik uygulamada yaygın olarak kullanılan iki ana ilaç grubudur (30).

Anjiyotensin II, organ ve dokular üzerindeki etkilerinin geniş kapsamlı olması nedeniyle RAAS blokajı için ilgi çekici bir farmakolojik hedeftir. ACE inhibitörleri, antijotensin II oluşumunun engellenmesi yoluyla aldosteron salgılanmasını azaltırlar ve hipertansiyon, akut miyokard enfarktüsü ve kalp yetmezliğinin tedavisinde kullanılırlar. ACE inhibitörlerinin kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde görülen dikkate değer başarısı RAAS blokajı için başka ilaçların araştırılmasına ve ARB'lerin geliştirilmesine yol açmıştır (29).

Kardiyovasküler sistemde anjiyotensin II'nin etkisini göstermesinde rol oynayan birincil reseptörler, AT₁ reseptörleridir (1). ARB'ler, AT₁ reseptörüne seçici olarak bağlanarak anjiyotensin II'nin reseptöre bağlanmasını engellerler (31). Anjiyotensin II tip 2 (AT₂) reseptörlerinin anjiyotensin II tarafından uyarılması bradikinin ve nitrik oksit maddelerini artırması yoluyla vazodilatasyonla ilişkilidir (2). ARB'ler, AT₁ reseptörlerine spesifik olması sebebiyle AT₂ reseptörlerinin uyarılmasını bloke etmezler. Böylelikle bradikinin ve nitrik oksit ARB'lerin etkilerine aracılık eder. ARB'lerin önemli avantajlarından biri de, ACE'den bağımsız olarak oluşan anjiyotensin II'nin ACE inhibitörlerine kıyasla daha spesifik ve kalıcı şekilde bloke etmesidir (29).

ARB'lerde yan etki görülme sıklığı, ACE inhibitörleriyle karşılaştırıldığında blokajın spesifikliği nedeniyle daha düşüktür. Bu durum hastanın tedaviye uyumunun artması ve daha etkili kan basıncı kontrolü sağlanması açısından önemlidir (29). ARB'lerin yan etki profili açısından ACE inhibitörlerine en önemli üstünlüklerinden biri bradikinin bozunmasını engellemezler ve böylelikle kuru öksürüğe sebep olmazlar (31).

ARB'ler aldosteronu inhibe ederek potasyum atılımını azaltırlar, bu durum ARB kullanan hastalarda hiperkalemiye sebep olabilir. Bu yüzden ARB ile tedavi edilen hastalarda eş zamanlı olarak ACE inhibitörleri, spironolakton, K⁺ takviyesi ve potasyum tutucu diüretik kullanımında dikkatli olunmalıdır (29).

ARB'ler özellikle renal arter stenozu olan hastalarda glomerüler filtrasyon hızını akut olarak azaltabilir ve böbrek fonksiyonlarının kötüleşmesine sebep olabilirler. Bu nedenle

ARB'ler her ne kadar renal protektif olsalar da böbrek yetmezliği durumlarında kontrol altında kullanılmalıdır (29).

ARB'ler, çeşitli kılavuzlarda birinci basamak tedavi olarak onaylanmış ilaçlar arasında yer almaktadır (3, 4). Birçok klinik çalışma, bu ilaçların kan basıncını etkili bir şekilde düşürdüğünü ve tek başına ya da diğer antihipertansif ilaç sınıflarıyla birlikte kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Dahlöf ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen LIFE çalışmasında LOS'un kan basıncı düşürücü etkisi atenolol ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda LOS'un atenolole göre daha iyi kan basıncını düşürdüğü ve daha yüksek kardiyovasküler koruyucu etkisinin olduğu gözlemlenmiştir (32). 2004 yılında gerçekleştirilen VALUE çalışmasında VALS ve amlodipin glikoz profiline etkisi açısından karşılaştırılmış ve dört yılın sonunda VALS kullanan hastaların amlodipin kullananlara kıyasla yeni başlayan diyabet insidansının daha düşük olduğu bulunmuştur (33).

Hipertansiyon tedavisinde, farklı etki mekanizmalarına sahip antihipertansif ilaçların kombine olarak kullanılması yaygındır. Kombine tedavi, tek ilacın yüksek doz kullanımına bağlı oluşabilecek yan etkileri ortadan kaldırırken aynı zamanda daha etkili kan basıncı düşüşü de sağlar. ARB-diüretik ve ARB-KKB kombinasyonları, özellikle tercih edilen kombine antihipertansif ilaç seçenekleridir (19).

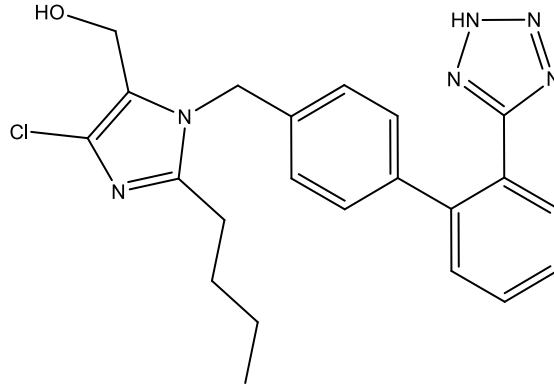
2.2.1. Losartan (LOS)

Pazarlanan ilk ARB'dir. Ürikozürik etkiye sahip bir ön ilaçtır. Metaboliti, ana bileşiğe kıyasla daha etkili bir kan basıncı düşürücü etkiye sahip olup, daha uzun bir yarı ömre sahiptir (29).

2.2.1.1. Fizikokimyasal Özellikleri

$C_{22}H_{23}ClN_6O$ kapalı formülüne sahip LOS'un molekül ağırlığı 422.9 g/mol'dür. LOS monopotasyum tuzu, beyaz veya beyaza yakın kristalize tozdur. Suda tamamen çözünür, alkolde çözünür, ancak asetonitril, metil etil keton gibi yaygın organik çözücülerde çözünürlüğü düşüktür (34).

LOS'un açık formülü Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. LOS'un açık formülü

2.2.1.2. Farmakokinetik Özellikleri

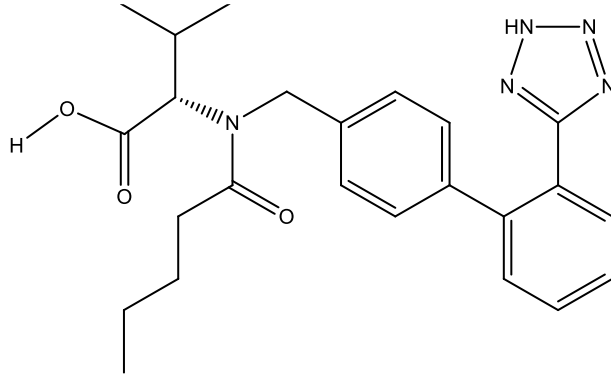
Oral yoldan alındıktan sonra, LOS'un emilimi iyidir ve ilk geçiş metabolizmasıyla aktif bir karboksilik asit metaboliti ve inaktif diğer metabolitler oluşur. LOS tabletlerinin sistemik biyoyararlanımı yaklaşık %33'tür. LOS ve aktif metaboliti, sırasıyla ortalama olarak 1 saat ve 3-4 saatte doruk konsantrasyonlarına ulaşır. LOS ve aktif metaboliti, özellikle albümin olmak üzere %99'dan fazla oranda plazma proteinlerine bağlanır. Sıçanlar üzerinde yapılan araştırmalar, LOS'un kan-beyin bariyerini geçse de bunun çok düşük bir oranda gerçekleştiğini göstermektedir. Oral ya da intravenöz yolla verilen LOS dozunun yaklaşık %14'ü aktif metabolite dönüşür. LOS ve aktif metabolitin toplam plazma klerensi sırasıyla yaklaşık 600 mL/dakika ve 50 mL/dakika olup, renal klerensi ise sırasıyla 74 mL/dakika ve 26 mL/dakikadır. LOS oral yolla alındığında, idrarda dozun yaklaşık %4'ü değişmeden, %6'sı ise aktif metabolit olarak tespit edilir. LOS'un yarı ömrü yaklaşık 2 saat, aktif metabolitin yarı ömrü ise 6-9 saattir (34).

2.2.2. Valsartan (VALS)

2.2.2.1. Fizikokimyasal Özellikleri

$C_{24}H_{29}N_5O_3$ kapalı formülüne sahip VALS'ın molekül ağırlığı 435.5188 g/mol'dür. Beyaz ya da beyaza yakın renkte bir tozudur. Susuz etanol, metanol ve asetonitrilde kolay çözünür, ancak suda çözünürlüğü düşüktür (35).

VALS'ın açık formülü Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. VALS'ın açık formülü

2.2.2.2. Farmakokinetik Özellikleri

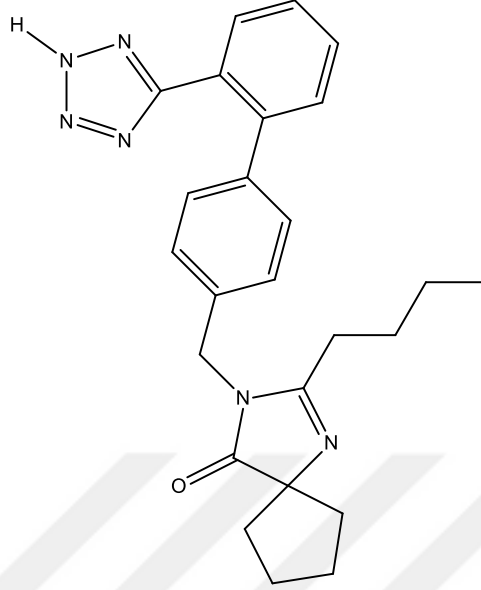
VALS, oral yoldan tek başına alındığında, pik plazma konsantrasyonuna 2-4 saat içinde ulaşır. Ortalama mutlak biyoyararlanımı ise %23'tür. Doz alındıktan 8 saat sonraki plazma konsantrasyonları, ilacı aç karnına ya da tok karnına alan bireylerde benzer seviyelerdedir, bu nedenle yemeklerle ya da aç karnına alınabilir. İntravenöz uygulamadan sonra, VALS dokulara kapsamlı bir şekilde dağılmaz. Plazma proteinlerine, özellikle serum albüminine, yüksek oranda (%94-97) bağlanır. Dozun yalnızca %20'si metabolit olarak atıldığından, büyük oranda biyotransformasyona uğramaz. VALS, büyük oranda değişmemiş olarak dışkı (dozun yaklaşık %83'ü) ve idrar (dozun yaklaşık %13'ü) ile atılır. İntravenöz uygulama sonrasında, VALS'ın plazma klerensi yaklaşık 2 L/saat, renal klerensi ise 0.62 L/saat olarak ölçülmüştür. VALS'ın yarı ömrü ise 6 saattir (35).

2.2.3. İrbesartan (IRBE)

2.2.3.1. Fizikokimyasal Özellikleri

$C_{25}H_{28}N_6O$ kapalı formülüne sahip IRBE'nin molekül ağırlığı 428.5294 g/mol'dür. Beyaz ya da beyaza yakın renkte kristalize tozudur. Suda neredeyse hiç çözünmez, metanolde zor çözünür, metilen klorürde ise çözünürlük azdır (36).

IRBE'nin açık formülü Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. IRBE'nin açık formülü

2.2.3.2. Farmakokinetik Özellikleri

Oral yoldan alındıktan sonra iyi bir emilim gösterir, ortalama mutlak biyoyararlanımı yaklaşık %60 ile %80 arasındadır. Yaklaşık %90'dan fazla oranda plazma proteinlerine bağlanır. Oral uygulamayı takiben 1.5-2 saat içinde doruk plazma konsantrasyonlarına ulaşır. IRBE, karaciğerde glukuronid konjugasyonu ve oksidasyon ile metabolize olur. Dolaşımdaki birincil metaboliti ise IRBE glukuronit olup, yaklaşık %6 oranındadır. IRBE ve metabolitleri vücuttan hem safra hem de böbrekler yoluyla atılır. Eliminasyon yarı ömrü ortalama 11 saattir (37).

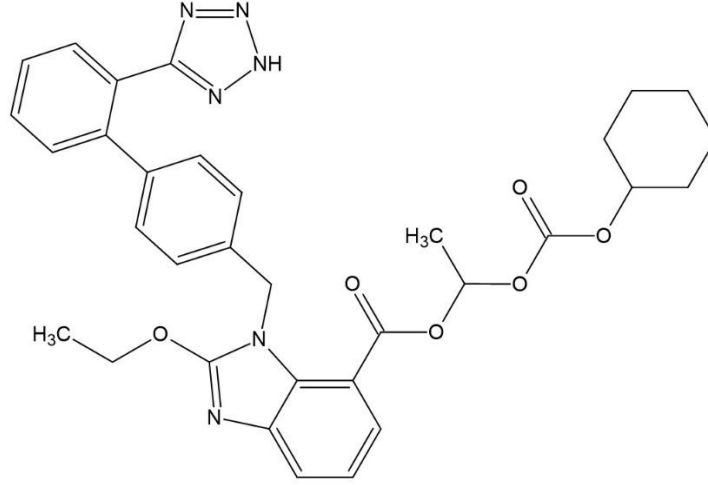
2.2.4. Kandesartan Sileksetil (CANDE)

CANDE, gastrointestinal sistemden emilimi sırasında ester hidrolizi ile hızla ve tamamen biyoaktif kandesartana dönüşen bir ön ilaçtır (38).

2.2.4.1. Fizikokimyasal Özellikleri

$C_{33}H_{34}N_6O_6$ kapalı formülüne sahip CANDE'nin molekül ağırlığı 610.67 g/mol'dür. Beyaz ya da beyaza yakın renkte bir tozudur. Suda çözünmez, metanolde az çözünür (38).

CANDE'nin açık formülü Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. CANDE'nin açık formülü

2.2.4.2. Farmakokinetik Özellikleri

Kandesartan, oral alımını takiben yaklaşık 3–4 saat içinde pik plazma konsantrasyonuna ulaşır ve mutlak biyoyararlanımı yaklaşık %15'tir. Emilimi, gıda alımından etkilenmez. Dağılım hacmi 0,13 L/kg olan kandesartan, plazma proteinlerine %99'un üzerinde bir oranla bağlanır. Eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 9 saat olup, plazma klerensi ortalama 0,37 mL/dakika, renal klerensi ise 0,19 mL/dakikadır. Kandesartan, vücuttan büyük oranda idrar ve safra yoluyla değişmeden atılır (38, 39).

2.3. ARB'lerin Analizi İçin Literatürdeki Bazı Kromatografik Ayırma Yöntemleri

Giebułtowicz ve arkadaşları aralarında ARB'lerin de bulunduğu kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan 30 farmasötik bileşiğin ve metabolitlerinin çevresel sularda tayini için HPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir (40). Örnekler, katı faz ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Kromatografik ayırma için bir Kinetex RP-18 kolon (100 mm × 4.6 mm, 2.6 µm) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 40°C'ye ve akış hızı ise 0.5 mL/dk'ya ayarlanmıştır. Hareketli faz olarak %0.2 formik asit içeren HPLC saflığında su (A) ve %0.2 formik asit içeren asetonitril (B) gradienti uygulanmıştır. VALS, LOS ve TELMI için tayin alt sınırı (LOQ) değerleri 0.07-12 ng/L arasındadır. Geri kazanım analitlerin çoğu için %50-130 arasındadır. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları üç konsantrasyon seviyesinde yürütülmüştür ve yöntem tatmin edici hassasiyet (<%20) sunmuştur.

Castro ve arkadaşları çeşitli su örneklerinde (atık su, nehir suyu, musluk suyu) ARB grubu ilaçların (eprosartan (EPRO), LOS, IRBE, CANDE, TELMI ve VALS) eş zamanlı tayini için bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir (7). Çevresel su örneklerinin analize hazırlanmasında katı faz ekstraksiyonu yöntemi kullanılmış ve hazırlanan ekstrakt metanol:amonyak (98:2) karışımıyla elüe edilmiştir. Daha sonra 0.45 µm'lik bir şırınga filtresinden geçirilerek HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Ayırım, Zorbax Eclipse Plus C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 µm) kolonunda 40°C'de gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak %0.1 sulu formik asit çözeltisi (A) ve metanol (B) gradient elüsyon modunda kullanılmıştır. Akış hızı 0.4 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Analitler, ESI kaynağı pozitif modda çalıştırılarak iyonize ve tayin edilmiştir. Yöntem tüm analitler için 2.5-500 µg/L aralığında doğrusaldır. ARB'lerin, nehir suyu ve musluk suyu matrislerindeki geri kazanımları %88-%134 arasındadır. Yine bu iki matris için elde edilen LOQ değerleri 2-20 ng/L arasında değişmiştir.

2013 yılında yayımlanan bir çalışmada Portekiz'de bulunan 4 farklı hastanenin atık sularında aralarında LOS, VALS ve IRBE'nin de bulunduğu 78 farmasötik bileşiğin tayini için bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir (41). Örnekler katı faz ekstraksiyon yöntemine göre hazırlanmış ve hazırlanan ekstrakt metanol ile elüe edilmiştir. İç standart olarak izotopik olarak etiketlenmiş standartları içeren 1 ng/µL standart karışımı kullanılmıştır. Enstrümental analiz, iki ikili pompa sistemi ile donatılmış ve turbo İyon Sprey kaynağı (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) bulunan 5500 QTRAP hibrid üçlü kuadropol-lineer iyon tuzaklı kütle spektrometresine bağlı bir Waters Acquity UltraPerformance™ sıvı kromatografi sistemi kullanılarak yapılmıştır. Kromatografik ayırım sırasında pozitif elektrosprey iyonizasyonu (PI) ile analiz edilen analitler için Acquity HSS T3 kolonu (50 × 2.1 × 1.7 µm) ve negatif elektrosprey iyonizasyonu (NI) ile analiz edilen analitler için Acquity BEH C18 kolonu (50 × 2.1 mm × 1.7 µm) kullanılmıştır. PI modundaki analiz için metanol:10 mmol/L formik asit/amonyum format (pH 3.2) ve NI modundaki analiz için de asetonitril:5 mmol/L amonyum asetat/amonyak (pH 8) gradient hareketli faz sistemi kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin LOS, VALS ve IRBE için LOQ değerleri sırasıyla 41, 13 ve 22 ng/L'dir.

Marghany ve arkadaşları çeşitli ARB'lerin (EPRO, VALS, LOS, IRBE ve CANDE) eş zamanlı analizi için hassas bir HPLC yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir (42). Ayırma işlemi, kuaterner pompa sistemi, otomatik enjektör ve termostatik kontrollü kolon

fırını ile donatılmış, UV/Vis 2489 dedektörüne sahip Waters Alliance e2659 HPLC (ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Hareketli faz olarak 0.01 mol/L sodyum fosfat monobazik tampon (pH 6.5) ve metanol (A:B) gradienti kullanılmıştır. Çeşitli kolonlar denenmiş ve en iyi ayırım, ters fazlı oktadesilsilil C18 kolonda ($250 \times 4.6 \text{ mm} \times 5 \text{ }\mu\text{m}$) gerçekleştirilmiştir. Analitlerin tespiti UV dedektör 254 nm dalga boyunda elde edilmiştir. EPRO, VALS, LOS, IRBE ve CANDE için LOQ değerleri sırasıyla 0.096, 0.160, 0.104, 0.119 ve 0.160 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Yöntem tüm analitler için 0.04-60 $\mu\text{g/mL}$ aralığında doğrusaldır. Geliştirilen yöntemin doğruluğu %98-102 aralığındadır. Gün içi kesinlik çalışmalarında üç farklı konsantrasyon seviyesinde analizler yapılmış ve BSS %0.92-1.53 arasında bulunmuştur.

2023 yılında yayımlanan bir çalışmada VALS ve LOS'un gerçek su ve biyolojik örneklerden ekstraksiyonu ve zenginleştirilmesi için içi boş bir fiber-katı faz mikroekstraksiyon cihazı geliştirilmiştir. Sorbent olarak analitlerle etkileşime girmek için uygun fonksiyonel gruplar içerdiğinden dolayı ekstraksiyon verimliliğini artıran kitosan ile işlevselleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNTs) kullanılmıştır (43). Sorbent, fiber gözeneklerine sol-jel yöntemi ile kaplanmıştır. Su ve biyolojik örneklerden ekstrakte edilen analitlerin tayini için bir HPLC-UV yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Ayırım, L1 analitik kolonunda (4.6 mm, 250 mm ve 10 μm) gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril, su ve asetik asit (50:50:0.1) 1.0 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Dedektör, LOS için 250 nm, VALS için 230 nm dalga boyunda ayarlanmıştır. Yöntem LOS için 3.1-1800 ng/mL, VALS için 3.4-1850 ng/mL aralığında doğrusaldır. Tespit alt sınırları (LOD), VALS ve LOS için sırasıyla 1.0 ng/mL ve 0.9 ng/mL'dir. VALS ve LOS standart çözeltileri eklenmiş kuyu ve nehir suyu analiz edilmiştir. Her analiz aynı koşullar altında üç kere tekrarlanmış ve %94.5-97.8 aralığında geri kazanım ve %3.48'den küçük BSS değerleri elde edilmiştir. Aynı prosedürler uygulanarak idrar örnekleri de analiz edilmiştir. Geri kazanımları %91.8-96.1 aralığında olup BSS değerleri %4.10'dan düşüktür.

Li ve arkadaşları tarafından 2023 yılında yayımlanan bir çalışmada ARB'lerin (LOS, VALS ve IRBE) atık su arıtımı için hareketli taşıyıcılar üzerinde geliştirilen biyofilmleri kullanan hareketli yataklı biyofilm reaktörlerinde (MBBR'ler) bozunmasını incelemek için bir HPLC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir (44). Miktar tayinleri 80 atık su arıtma tesisinden alınan sularda yapılmıştır. Üç ana bileşenin ve iki metabolitin (VALS asit ve LOS karboksilik asit) kantitatif tespiti, Synergi polar-RP analitik kolonunda ($150 \times 2 \text{ mm}$, 4 μm) 30°C'de gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak %0.2 formik asit içeren metanol ve %0.2

formik asit içeren su gradient şekilde kullanılmıştır. Kütle spektrumları, ESI kaynağı pozitif moda çalıştırılarak alınmıştır. Yöntemin LOQ değerleri 0.008-0.050 µg/L arasındadır.

Montemurro ve arkadaşları sıklıkla reçete edilen ve artırılmış atık suda yaygın olarak bulunan, aralarında VALS ve metaboliti olan VALS asitin de bulunduğu 13 farmasötik bileşiğin marul yapraklarından eş zamanlı tayini için bir HPLC-MS/MS yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir (45). Analitlerin matrinden elde edilmesi için katı faz ekstraksiyonu yöntemi kullanılmıştır. Kromatografik ayırım, Purospher STAR RP-18 uç başlıklı kolonda (125 mm × 2 mm, 5 µm) gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak %0.1 formik asit içeren asetonitril ve %0.1 formik asit içeren su gradient elüsyon modunda kullanılmıştır. Akış hızı 0.3 mL/dk'ya ayarlanmıştır ve analiz süresi 38 dakikadır. Geliştirilen yöntem 0.5-500 ng/g aralığında doğrusaldır. VALS için LOQ değeri 2.0 ng/g'dır. Geri kazanım %46'dır. Yöntem hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği bağlı geri kazanımların bağlı standart sapması olarak hesaplanmıştır ve VALS için BSS %1'dir.

2020 yılında yayımlanan bir çalışmada olmesartan (OLME), VALS, LOS ve IRBE'nin insan plazmasında eş zamanlı tayini için floresan tespitli bir HPLC yöntemi geliştirmiş ve valide edilmiştir (46). İç standart olarak CANDE sileksetil kullanılmıştır. Plazma örneklerini hazırlanmasında protein çöktürme, paketlenmiş sorbent ile mikroekstraksiyon ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemleri karşılaştırılmış ve ARB'lerin analizi için protein çöktürme yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Analiz Luna cyano (250 × 4.6 mm, 5 µm) kolonu kullanılarak 35°C'de gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak %0.1 sulu fosforik asit çözeltisi ve asetonitril (A:B), 1.2 mL/dk akış hızında gradient şekilde kullanılmıştır. Toplam analiz süresi 13 dakika olmakla birlikte emisyon dalga boyu 0-8 dakika arasında 370 nm, 8-13 dakika arasında ise 410 nm'dir. Yanıt olarak pik alanı yerine pik yüksekliği seçilmiştir. Yöntem, OLME ve VALS için 25.0-1500.0 ng/mL, IRBE için 25.0-2500.0 ng/mL ve LOS için 35.0-2500.0 ng/mL aralığında doğrusaldır. LLOQ değerleri IRBE, OLME ve VALS için 25 ng/mL iken LOS için 35 ng/mL'dir. Analiz edilen tüm analitler için %60'tan fazla geri kazanım elde edilmiştir. Analitlerin insan plazmasındaki stabilitesi 4 farklı koşulda değerlendirilmiştir: dondurma çözme stabilitesi (-70 - 25°C arasında, üç döngü), uzun vadeli stabilite (-70°C'de 30 gün), kısa vadeli stabilite (25°C'de 4 saat), ve hazırlık sonrası stabilite (20°C'de 30 saat). Bu koşulların her birinde örneklerin BSH'sı %14.69'dan düşüktür.

İçlerinde ARB grubundan LOS'un da bulunduğu farklı antihipertansif ilaç gruplarından 5 ayrı ilacı analiz etmek amacıyla bir UHPLC-MS/MS tekniği geliştirilmiştir (47). İşlem görmemiş örnekler, ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisine bağlı bir kütle spektrometresi kullanılarak, kısıtlı erişimli karbon nanotüpler (RACNT) ile doldurulmuş bir ekstraksiyon kolonu aracılığıyla kolon değişim sisteminde doğrudan analiz edilmiştir. HPLC sistemi, 3 tane LC-20AD pompa, 11R-0016H model elektronik 6 portlu değiştirme valfi ve Shim-pack XR-ODS C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 m) analitik kolon ile donatılmıştır. Ekstraksiyon kolonu olarak yaklaşık 30 mg RACNT ile doldurulmuş bir koruma kolonu kullanılmıştır. Değiştirme valfinin 2 pozisyonu vardır. Pozisyon 1'de döngü, işlem görmemiş örnek ile doldurulur. Pozisyon 2'de proteinlerden ayrılan analitler RACNT kolonundan C₁₈ kolonuna gönderilir. Pompa sistemi, 0.01 mol/L amonyum format tamponu (pH = 5.0) içeren yükleme fazını sağlayan pompa A; asetonitril:izopropil alkol:ultra saf su (75:15:10, v:v:v) içeren temizleme fazını sağlayan pompa B; ve metanol: 0.01 mol/L amonyum format tamponu (pH = 5.0) (90:10, v:v) içeren mobil fazı sağlayan pompa C olmak üzere üç pompadan oluşmuştur. RACNT kolonu, analitleri örnek matrisinden 2 dakikada ayırmıştır ve toplam analiz süresi 12 dakikadır. Analiz sonucunda LOS için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 4.28 µg/L ve 14.26 µg/L'dir. Gün içi ve günler arası üç farklı konsantrasyonda gerçekleştirilen deneylerin BSS değerleri sırasıyla %7.5 ve %6.3'ten düşüktür. Ekstraksiyon geri kazanımı %94.9-112.4 arasındadır.

2021 yılında, anyonik analitlerin ekstraksiyonu ve tayini için yüzey baskılı bir elektroda dayılı anyon değişimli katı faz ekstraksiyonu (SPE) yöntemi geliştirilmiştir (48). Nylon 6/polianilin nanofiberleri, bir çalışma elektrodunun üzerine kaplanmıştır. Modifiye edilmiş elektrot analitleri içeren çözeltiye daldırılmış ve pozitif voltaj uygulanarak analitlerin elektrot yüzeyinde toplanması sağlanmıştır. Analitlerin birikiminden sonra elektrot bir desorpsiyon çözücüsüne daldırılmıştır ve negatif voltaj uygulayarak zenginleştirilmiş analitlerin çözelti fazına geçmesi sağlanmıştır. SPE yöntemi bir HPLC-UV tekniğiyle birleştirilip insan kan plazmasında LOS, VALS ve IRBE'nin tayini yapılmıştır. Kromatografik ayırım, Spherisorb ters fazlı C18 ODS kolonunda (25 cm × 4.6 mm, 5 µm) yapılmıştır. Hareketli faz olarak 0.5 mL/dk akış hızında pH:4.0 0.02 mol/L sodyum asetat tamponu (A) ve metanol:asetonitril (50:50, v:v) (B) karışımı gradient şekilde kullanılmıştır. Dedektör, 250 nm'ye ayarlanmıştır. IRBE ve VALS 2-400 µg/L, LOS 5-1000 µg/L aralığında doğrusaldır. LOS, IRBE ve VALS için LOQ değerleri sırasıyla 1.7, 3 ve 1.3 µg/L'dir. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları üç konsantrasyon seviyesinde yürütülmüştür ve BSS

gün içi %8.2'den, günler arası %8.9'dan küçük bulunmuştur. Analiz edilen kan plazma örneklerinden analitlerin geri kazanımları %89.0-107.8 aralığındadır.

2020 yılında yayımlanan bir çalışmada amlodipin, VALS ve hidroklorotiyazid içeren farmasötik formülasyonlardan bu etkin maddelerin eş zamanlı tayini için bir HPLC-UV yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir (49). İç standart olarak pioglitazon kullanılmıştır. Kromatografik ayırım, Hibar RP-18e kolonunda (250 × 4.6 mm, 5µm) gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak amonyum asetat tamponu (A) ve asetonitril:metanol (20:80) (B) gradient akışta 1.3 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C'ye ve UV dedektörü 235 nm'ye ayarlanmıştır. Analiz süresi 10 dakikadır. VALS için yöntem 32.0-720.1 µg/mL aralığında doğrusaldır. Yöntemin LOD değeri 8.012 µg/ml'dir. Yöntem hassasiyetini değerlendirmek için analitleri içeren homojen karışımdan 6 örnek alınıp analiz edilmiştir. Bu analizlerin VALS için BSS'si %0.17 olup yöntemin hassaslığını kanıtlamıştır. Geri kazanım değerlendirmesi için üç farklı konsantrasyon için üçer örnek analiz edilmiş ve geri kazanım %99.90-100.10 arasında bulunmuştur.

Ebeid ve arkadaşları VALS ve CANDE sileksetili de içeren farklı antihipertansif ilaç gruplarına ait 6 farklı ilacın hidroklorotiyazidin ile eş zamanlı tayini için bir RP-LC yöntemi geliştirmişlerdir (50). Yöntemde iç standart olarak IRBE kullanılmıştır. Ayırım, Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm) kolon kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak 0.02 mol/L sodyum fosfat dibazik tamponu (pH 5.5):asetonitril (A:B) gradient elüsyon modunda 1 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Analitlerin UV tespiti 220 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Yöntem CANDE için 2-40 g/mL, VALS için 10-160 g/mL aralığında doğrusaldır. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik, üç konsantrasyon ve her konsantrasyonun üç tekrarı kullanılarak değerlendirilmiştir. Gün içi ve günler arası BSS sırasıyla VALS için %1.12-1.29 ve %0.59-2.72 iken CANDE sileksetil için %0.14-1.23 ve %0.43-1.17'dir. Önerilen yöntem, analitlerin 12 dakikadan daha kısa bir sürede ayrılmasına olanak tanımıştır. Bu yöntem, ilaçların kombine farmasötik formülasyonlarındaki miktarlarını belirlemek için başarıyla uygulanmıştır.

2.4. Örnek Hazırlama

Analitik cihazlar her geçen gün gelişme gösterse de karmaşık matrisli örneklerle etkili bir şekilde analiz yapmak konusunda tek başına yetersizdir (51). Bunun nedenleri arasında şunlar sayılabilir (9):

- Vücut dokusu, kan ya da idrar gibi türü ve fiziksel durumu sebebiyle gerçek örneklerin çoğu analitik cihazlara doğrudan gönderilemezler.
- Analit, bir cihaz için doğrudan ölçülebilir bir özelliğe sahip olmayabilir.
- Gerçek örneklerde analit konsantrasyonu genellikle oldukça düşüktür.
- Gerçek örneklerin matrisi analit dışında başka bileşikler de içerir ve bu bileşikler analiz sırasında analit ile girişim yapabilir.

Bu sebeple örnek hazırlama, kimyasal analiz prosedürünün çok önemli bir basamağıdır ve toplam kantitatif analiz süresinin ortalama %80'ini oluşturur (52). Örnek hazırlama aşamasında, örnekler genellikle analiz için kullanılan cihazla uyumlu bir forma dönüştürülür, matris bileşenlerinden arındırılır ve analitik yöntemin hassasiyet gereksinimlerini karşılamak amacıyla analit zenginleştirilir (11). Uygun örnek hazırlama yönteminin seçimi, hedef bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tespitinde en kritik faktördür (53). Bu seçim; ortam türü, örnek boyutu, analiz cihazı, analiz türü, analitin yapısı ve örnekteki analitin başlangıç konsantrasyonu gibi faktörlere bağlıdır (9). Sonuç olarak iyi hazırlanmış örnekler, analitik cihazların korunmasına katkı sağlamakla birlikte, ayırma ve tespit süreçlerini iyileştirerek analitik yöntemlerin seçiciliğini ve hassasiyetini artırmaya yardımcı olur (54).

2.4.1. Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemi (SPE)

SPE sulu, çevresel, biyolojik ve farmasötik örneklerdeki analitlerin ekstraksiyonu ve ön-deriştirilmesi için yaygın olarak kullanılan örnek hazırlama yöntemlerinden biridir (55). Bu teknikte fonksiyonel silika veya polimer boncuklar uygun hacimli bir kartuşta iki gözenekli frit arasına paketlenir ve 4 temel adımda meydana gelir (56):

- 1) Analitleri içeren örnek geçirilmeden önce sorbent, uygun bir çözelti ile koşullandırılır.
- 2) Örnek sorbentten geçirilir ve analitlerin tutunması sağlanır.
- 3) Tutunmayan matris bileşenleri yıkanır.
- 4) Tutulan analitler, cihazda analiz edilmek üzere uygun çözücü ile elüe edilir.

SPE yönteminde örnek matrisindeki olası girişimlerin eş zamanlı olarak uzaklaştırılmasıyla, analitlerin verimli bir şekilde ön konsantrasyonu sağlanır (57). SPE, yüksek geri kazanım ve zenginleştirme faktörleri, düşük maliyet, hızlı faz ayrımları ve çeşitli tespit teknikleriyle entegrasyon yeteneği gibi avantajlarıyla birlikte tekrarlanabilir, çok yönlü

ve çevre dostu bir yöntemdir (55, 56). SPE'nin bir diğer avantajı, HPLC ile ayırma işleminden önce kolon değiştirme yöntemlerine alternatif olarak akış tabanlı teknikler kullanılarak tüm ekstraksiyon sürecinin kolayca otomatikleştirilebilmesidir (57). Otomasyon kolaylığı sayesinde SPE, yaygın olarak kullanılan diğer örnek hazırlama yöntemlerine göre daha seçici, hızlı ve pratiktir. Yöntemin tüm bu avantajlarının yanında yüksek miktarlarda sorbent ve çözücü kullanımı dezavantajı vardır ve bu durum Yeşil Analitik Kimya (GAC) ilkeleriyle tutarsızdır (58).

Sorbent seçimi; seçicilik, adsorpsiyon afinitesi ve kapasite gibi analitik parametreleri etkileyen önemli bir etkidir. Ekstraksiyon verimliliği, sorbentin partikül boyutu ve yüzey alanına bağlı olarak değişir (55). SPE işleminde, çeşitli polarite ve işlevlere sahip birçok farklı sorbent kullanılmaktadır (13). Yaygın olarak aktif karbon, silika, aktif alümina, C-18, moleküler baskılı polimerler ve reçineler tercih edilmektedir. Geniş yüzey alanına sahip olmaları sayesinde yüksek adsorpsiyon kapasitesi ve hızı göstermeleri sebebiyle nanomalzemeler de sorbent olarak büyük ilgi görmektedir (55).

2.4.2. Dispersif Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemi (DSPE)

DSPE, SPE'ye alternatif olarak, sorbentin örnek matrisine ya da ekstraktına doğrudan dağıtıldığı bir yöntemdir (10). DSPE, ilk olarak 2003 yılında Anastassiades ve arkadaşları tarafından meyve ve sebzelerdeki pestisit kalıntılarının tespiti için verimli bir matris temizleme yöntemi olarak tanıtılmıştır (59). Bu yöntem genellikle temel özelliklerinin kısaltması olan QuEChERS olarak bilinir (10): Quick (hızlı), Easy (basit), Cheap (ucuz), Effective (etkili), Rugged (sağlam), Safe (güvenli). Katı sorbent, örnek çözeltisine doğrudan ilave edilir, karışım iyice karıştırılır ve ardından santrifüj edilir (60). Bu şekilde sorbentin örnek içerisine disperse edilmesi, sorbent ve analitler arasında temas yüzeyini artırarak ekstraksiyon dengesine hızlı ulaşılmasını sağlar ve verimliliği artırır (10, 61). Yöntemin esası örnek matrisini istenmeyen bileşenlerden temizleme yoluyla analit seçiciliğini artırmaktır (60). DSPE yöntemi hızlı ve seçici olmasıyla birlikte düşük çözücü ve sorbent kullanımıyla çevre dostu bir yöntemdir (61).

2.4.3. Dispersif Mikro Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemi (DMSPE)

DMSPE yöntemi, genellikle mikro veya nano boyutlardaki sorbentlerin örnek çözeltisine dağılması ve ardından çeşitli fiziksel işlemlerle bu sorbentlerin izole edilmesi esasına dayanır. DMSPE, DSPE yönteminin minyatürleştirilmiş bir uyarlamasıdır. Ancak amaçları farklıdır; DSPE, genellikle matris temizleme amacıyla kullanılırken, DMSPE ise

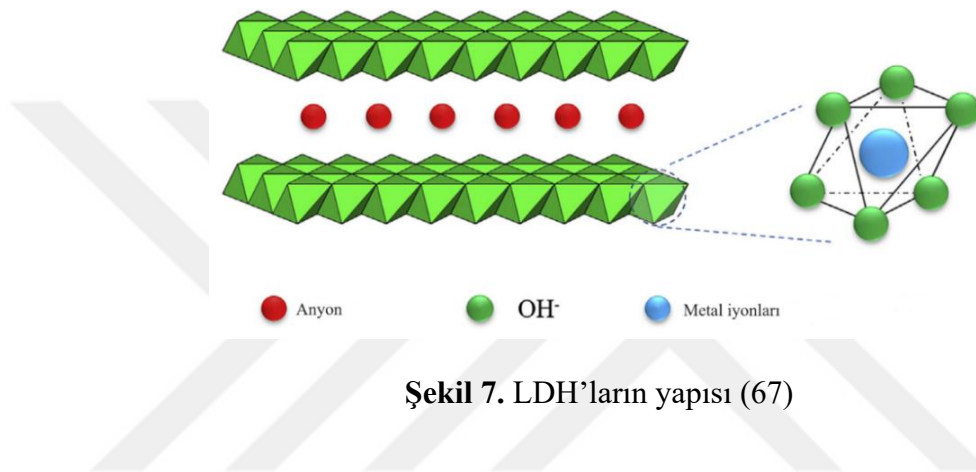
analit zenginleştirme amacıyla tercih edilir. Yani, DSPE’de sorbent örnek ortamına dağıldığında istenmeyen matris bileşenlerini tutarken, DMSPE’de hedef analitler tutulur (62). Bu yöntemde sorbent, örnek çözeltisi içerisine çalkalayıcı, vorteks ya da ultrasonik banyo kullanılarak dağıtılır ve hidrojen bağı, π - π bağı ve dipol-dipol etkileşimleri gibi farklı etkileşimler aracılığıyla analitleri tutar. Daha sonra sorbent, santrifüj, filtrasyon ya da manyetik ayırım yoluyla örnek çözeltisinden ayrılır ve analit içeren katı, enstrümental tespit için uygun bir çözücü ile elüe edilir (62, 63). İlk olarak 2009 yılında Tsai ve arkadaşları tarafından su ve süt örneklerinde tetrasiklin bileşiklerinin ekstraksiyonu ve zenginleştirilmesi için raporlanmıştır (64).

Yüksek ekstraksiyon verimliliği, yüksek zenginleştirme faktörü ve düşük örnek çözeltisi tüketimi ile gerçek örneklerdeki çeşitli analitleri ekstrakte etmek, temizlemek ve konsantre etmek için uygulanabilen basit, hızlı ve ucuz bir tekniktir (9). Sorbentin disperse edilmesi, sorbent ile analit arasındaki temas yüzeyini önemli ölçüde artırır. Bu da hızlı kütle transferine ve ekstraksiyon dengesinin kurulmasına yol açarak yöntem hassasiyetini ve ekstraksiyon verimliliğini artırır ve ekstraksiyon süresini kısaltır. Tüm bunlara ek olarak bir başka avantaj da DMSPE yönteminde kullanılabilecek sorbent sayısı çok fazladır ve yeni sorbentlerin geliştirilmesine açıktır (62, 63).

DMSPE yönteminde kullanılacak ideal sorbent, yüksek sorpsiyon kapasitesine, iyi seçiciliğe, düşük maliyete, yeniden kullanılabilirliğe, kolay hazırlanabilirliğe, toksik olmayan özelliklere ve üstün kimyasal ve fiziksel kararlılığa sahip olmalıdır. Ayrıca, sorbent örnek çözeltisinde iyi dağılım göstermelidir. Verimli analit zenginleştirme sorbentin analite olan ilgisine bağlıdır (65). Aynı zamanda analitleri kolayca desorbe edebilmek için analit-sorbent etkileşimi uygun koşullarda tersine çevrilebilir olmalıdır. Yüzey alanı/hacim oranı yüksek olan nanoyapılı sorbentler, analitle etkileşecek fazla temas alanı sunması sebebiyle yüksek adsorpsiyon kapasitesi sağlarlar (10). Tek duvarlı ve çok duvarlı karbon nanotüpler, grafen, grafen oksit gibi karbon bazlı sorbentler, fonksiyonelleştirilmiş silika, metal-organik çerçeveler (MOF), moleküler baskılanmış polimerler (MIP), çeşitli kompozitler, çift katmanlı hidroksitler (LDH) ve modifiye edilmiş manyetik sorbentler DMSPE’de kullanılan sorbentlerden bazılarıdır (62).

2.5. Çift Katmanlı Hidroksitler (LDH)

LDH'lar, pozitif yüklü metal hidroksit katmanları ve bu katmanların arasında bulunan yük dengeleyici anyonlar ve su moleküllerinden oluşan nanoyapılı inorganik malzemelerdir (Şekil 7) (66, 67). Hidrotalsit benzeri bileşikler ya da anyonik killer olarak da bilinirler. Anyon değiştiriciler, adsorbanlar, katalizörler, katalizör destekleri, ilaç taşıyıcıları, sensör malzemeleri ve elektrot malzemeleri olarak geniş bir uygulama yelpazesinde kullanılma potansiyeline sahiptir (68).



LDH'lar genellikle $[M^{2+}_{1-x}M^{3+}_x(OH)_2]_x[A^{n-}]_{x/n} \cdot yH_2O$ formülü ile ifade edilir. M^{2+} iki değerlikli, M^{3+} üç değerlikli metal katyonlarıdır. A^{n-} metal katmanları arasına yerleştirilmiş yük dengeleyici anyondur, pozitif yük bu tabakadaki anyonlar tarafından dengelenir. Bu yüzden anyon miktarı metal iyonlarından kaynaklanan pozitif yük yoğunluğuna bağlıdır. x değeri $M^{2+}/(M^{2+}+M^{3+})$ ile ifade edilen bir orandır ve değeri kullanılan metal iyonlarına göre 0.2-0.33 arasında değişir (69, 70). LDH yapısının kararlılığı, katyonik tabakalar ile anyonik tabaka arasındaki elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağından kaynaklanan kohezif kuvvetler tarafından sağlanır (13).

M^{2+} ve M^{3+} iyonlarının seçimi ve kombinasyonu oldukça çeşitlidir. Bu nedenle, bazı kombinasyonlar potansiyel olarak ilginç özellikler sergileyebilir. Örneğin metal katyonu olarak ferromanyetik elementleri içeren LDH'lar, manyetik özellikleri sayesinde ekstraksiyon sonrası sorbent-analit etkileşimini kolayca tersine çevirebilmesi açısından DSPE'de sorbent olarak kullanılırlar (67).

LDH'lar eşsiz moleküler yapıları nedeniyle özellikle katı faz ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılmak üzere çeşitli kimyasal ve fiziksel avantajlara sahiptir. Bu avantajlar şunlardır (13, 67, 71):

- Geniş yüzey alanı sunarlar.
- Düşük maliyetli öncüller ve basit ekipmanlarla kolayca sentezlenirler.
- Metal katmanlarının kimyasal bileşimi ayarlanabilir.
- Uygun anyonlar seçilerek katmanlar arası mesafe ve LDH'ların boyutu kontrol edilebilir.
- Fiziksel adsorpsiyon, iyon değişimi ve interkalasyon gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptirler.
- Yüksek su içeriği sayesinde, tutulan analitler için biyoyumlu bir ortam oluştururlar.
- Kimyasal ve termal stabiliteye sahip kararlı bir yapıdadırlar.
- pH'ya bağlı çözünürlük gösterirler, analitlerin ekstraksiyonu bazik ortamda gerçekleştirildikten sonra ortam asidik ($\text{pH} < 4$) hale getirilerek LDH'ların çözünmesi sağlanır.

LDH'lar bazik ortamda çökme, asidik ortamda çözünme özellikleri sayesinde *in situ* yolla kolayca sentezlenirler. Süreçte alkali bir çözeltiye LDH öncülleri olarak kullanılan metal katyonları ve anyonik analitler eklenir, LDH oluşumu ve analitlerin ekstraksiyonu eş zamanlı olarak gerçekleşir. Analit içeren LDH'lar santrifüj ya da filtrasyon yoluyla toplanır ve asidik ortamda çözünerek enstrümental olarak analiz edilir. LDH'ların *in situ* sentezi; sorbent sentezi ve analit elüsyonu olmadığından basit, hızlı, düşük maliyetli, yüksek hassasiyet sunma ve çevre dostu olma gibi avantajlara sahiptir (12, 72, 73).

LDH'ların DSPE yönteminde kullanılması, sorbent senteziyle ekstraksiyonun eş zamanlı gerçekleştirilmesi ve analit elüsyonuna gerek olmadan sorbentin çözünmesiyle analit zenginleştirme ilk olarak Tang ve Lee tarafından 2013 yılında yayımlanan bir çalışmada raporlanmıştır (74). Bu çalışmada LDH'lar sulu örneklerde bazı aromatik asitlerin analizi için sorbent olarak kullanılmıştır. Mg-Al temelli LDH öncülleri analitleri içeren örnek ortamında vorteks ve sonikasyon yardımıyla dağıtılmıştır. Daha sonra ortam bazikleştirilerek LDH'ların analitleri tutarak çökmesi sağlanmıştır. Çöken LDH'lar süpernatanttan ayrılıp %8 trifloroasetik asit (TFA) çözeltisinde çözülüp, analitlerin elüsyonuna gerek kalmadan doğrudan HPLC ile analiz edilmiştir. Yöntem tüm analitler için 0.03-0.28 $\mu\text{g/L}$ arasında düşük tespit limiti göstermiştir.

LDH'ların yine özellikle pH bağımlı çökme-çözünme yeteneği göstermesi, analiz yöntemlerinin otomasyonunda kullanılmasına dair önemli gelişmelere yol açmıştır. Sorbent olarak Fe_3O_4 ile manyetikleştirilmiş LDH çekirdek-kabuk mikroküreler kullanılarak otomatik bir DMSPE tekniği tanıtılmıştır (75). Sentezlenen LDH'lar, örnek içeren bir kaba eklenmiş ve ekstraksiyonun gerçekleşmesi için karıştırılmıştır. Ekstraksiyondan sonra örnek kabı, mıknatıs içeren otomatik örnekleyici tepsisine yerleştirilmiş ve mıknatısın analit hapsedilmiş LDH'ları toplaması için bir süre beklenmiştir. Üstte kalan süpernatant bir şırınga yardımıyla örnek ortamından uzaklaştırılmıştır. Daha sonra yine şırınga yardımıyla örnek kabına %50 TFA çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Zenginleştirilmiş analitleri içeren çözelti direkt olarak HPLC ile analiz edilmiştir.

2.6. Akış Teknikleri

Akış teknikleri (FT'ler), çözelti ölçümü, karıştırma, seyreltme ve analitin tespit edilebilir hale getirilmesi gibi işlemleri içeren laboratuvar uygulamalarında kullanılan çok amaçlı otomasyon araçlarıdır. FT yöntemlerinin esası, bir tüp manifoldu içinde pompalar ve valfler aracılığıyla bir taşıyıcı akışta örnek ve reaktif çözeltilerinin taşınması ve işlenmesidir. Otomatik örnekleyiciler kullanılarak geliştirilen otomasyonun aksine, FT yöntemlerinde enstrümental analiz için örneğin tespit hücrelerine entegre edilmesi çoğunlukla bir akış yoluyla gerçekleşir. FT'ler analit zenginleştirme ve matris temizleme amacıyla örnek hazırlama basamağında kullanılabilir ve tam otomatik bir analiz yöntemi geliştirmek için HPLC gibi enstrümental cihazlara bağlanabilir (14, 76).

FT otomasyonu; prosedürel tekrarlanabilirlik, reaktif tüketiminin ve örnek işleme süresinin azaltılması, örnek veriminde artış, sistem minyatürleştirilmesi avantajları sağlayan basit, çok yönlü ve düşük maliyetli bir tekniktir. Kapalı bir sistem kullanılması sayesinde de örnek kontaminasyonu engellenmiş ve araştırmacının zararlı reaktiflere maruz kalma riski azaltılmış olur. Tüm bu avantajlarının yanında FT, tek başına seçicilik göstermez. Seçicilik, seçici reaktiflerin kullanımına, kullanılan dedektörlere ve seçici tespit ve ayırma yöntemlerinin kullanımına bağlıdır (14, 76).

Zaman içinde, analit zenginleştirme ve matris temizleme amacıyla kullanılan örnek filtrasyonu, SPE, LLE ve birlikte çöktürme gibi teknikler için FT otomasyonu kullanılmış ve bu amaçlar için çeşitli akış cihazları tasarlanmıştır (76). Bunlardan ikisi, sıralı enjeksiyon analizi (SIA) ve akış-yığının analizi (flow-batch) konseptidir.

SIA taşıyıcı akış, çift yönlü pompa, pompa ile valf arasına yerleştirilmiş tutma bobini, çok konumlu seçim valfi, reaksiyon bobini ve dedektörden oluşan basit bir bilgisayar kontrollü sistemdir. Bu işlemde önce örnek ve reaktifler seçim valfi aracılığıyla tutma bobinine çekilir. Daha sonra valf, dedektöre bağlı bir porta geçirilir ve akış tersine çevrilir. Böylelikle tutma bobinindeki içerik, reaksiyon bobini aracılığıyla karıştırılır ve dedektöre gitmesi sağlanır (14, 77). Sistemdeki sürekli akış sistemin kolaylıkla kendi kendini temizlemesine olanak sağlar. Akış-yığın analizi (flow-batch) ise analizlerin, SIA'daki gibi boru manifoldu yerine karıştırma odalarında gerçekleştirildiği bir tekniktir. Burada analizler sırasında oluşan daha büyük ölü hacim, analiz sonrasında daha zorlu bir sistem temizliği gerektirir (78).

Bu iki tekniğin -SIA ve akış-yığın analizi (flow-batch)- bir araya gelmesiyle, 'Şırınga-İçinde-Laboratuvar' olarak adlandırılan, yeni çalışma modları sunan ve analit ekstraksiyonu ve matris temizliği amacıyla kullanılan katı faz mikroekstraksiyonu (SPME) ve sıvı faz mikroekstraksiyonu (LPME) yöntemlerine de uygun olan çok yönlü bir otomasyon sistemi geliştirilmiştir (14, 76).

2.7. Şırınga-İçinde-Laboratuvar (LIS)

LIS, bilgisayar kontrollü otomatik bir şırınga pompasının boşluğunu, kafa valfi yardımıyla çeşitli reaktiflerin aspire edilebildiği boyutu uyarlanabilir ve sızdırmaz bir reaktör olarak kullanan ve prensibi akış tekniklerine dayanan çok yönlü bir otomasyon sistemidir (79). İlk olarak 2012 yılında Maya ve arkadaşları tarafından tanıtılan bu sistemde, otomatik bir şırınga pompası ve şırınga başlığına monte edilmiş iki optik fiber kullanılarak hem analitlerin ekstraksiyonu hem de spektrofotometrik analizinin şırınga içinde gerçekleştirildiği tam otomatik bir yöntem geliştirilmiştir (80). Yöntem, su ve meyve sularından bir ksanten boyası olan rodamin B'nin ekstraksiyonu ve kantitatif tayini için denenmiş ve BSS %3.2 ve zenginleştirme faktörü 23 bulunmuştur. Sonuç olarak LIS sistemine dayalı olarak geliştirilen bu yöntemin basit, tekrarlanabilir, hızlı ve minyatürleştirilmiş olduğu gösterilmiştir.

Su örneklerinde bakır katyonunun tespiti için şırınga içinde bir dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (DLLME) yöntemi geliştirilmiş ve örneğin gerekli reaktiflerle homojen bir biçimde karışabilmesi için akış manifolduna bir karıştırma haznesi dahil edilmiştir (81). Bu bağlamda şırınga boşluğu içine bir manyetik karıştırma çubuğu yerleştirilmesi LIS'in geliştirilmesinde çok önemli bir adımdır (14). Bu yaklaşım ilk kez Horstkotte ve arkadaşları

tarafından 2013 yılında yayımlanan bir çalışmada tanıtılmıştır (82). Şırınga içine yerleştirilen karıştırma çubuğunun hareketi, iki neodimyum mıknatıs tutan bir karıştırma halkası tarafından oluşturulan manyetik alan sayesinde sağlanmıştır. Bu şekilde örnek ve reaktiflerin, sızdırmaz şırınga içinde hızlı ve homojen bir şekilde karıştırılmasının yanında otomasyona daha müsait bir sistem elde edilmiştir. Bu çalışmada şırınga içi karıştırma kullanılarak bir DLLME yöntemi geliştirilmiş ve deniz suyu örneklerinde alüminyum tespiti için kullanılmıştır. Ortalama %106.0 geri kazanım ve %4.4 tekrarlanabilirlik elde edilmesiyle birlikte ekstraksiyon işlemi şırınga temizliği de dahil 210 saniye sürmüştür.

Karıştırma, reaksiyon ve ekstraksiyon süreçlerinde ortam olarak kullanılan LIS sisteminin çeşitli avantajları vardır (14):

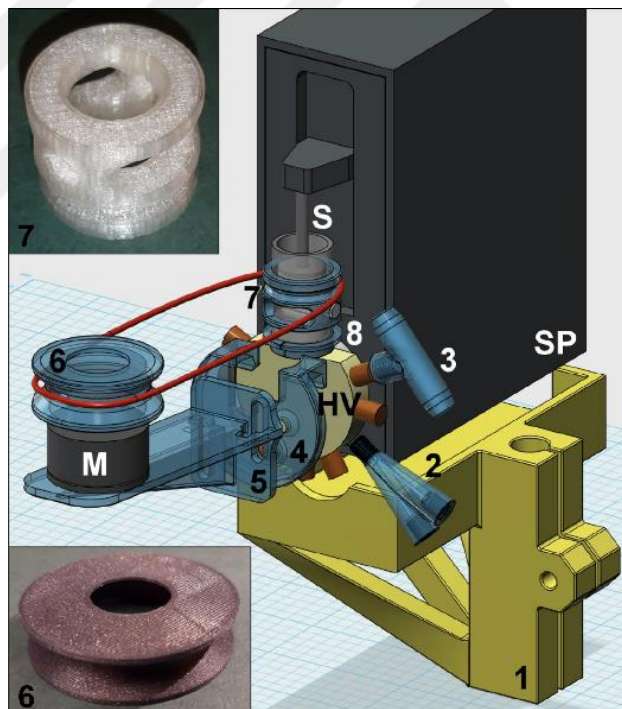
- Şırınga, içine istenen reaktiflerin aspire edilebildiği boyutu değiştirilebilir bir boşluktur. Bu özelliği ile pipetler, büretler, şişeler kullanılan laboratuvar süreçlerinin otomasyonunda kullanılan ideal bir araçtır.
- Şırınga sisteminin kapalı bir alan olması sayesinde hem örnek kontaminasyonundan kaçınılabılır hem de araştırmacının kimyasallara maruz kalma ve kaza riski azalmış olur.
- Şırınganın içine manyetik bir karıştırma çubuğu yerleştirilerek, şırınga içeriğinin hızlı ve homojen bir şekilde karışması sağlanır. Karıştırmanın ne zaman ve ne kadar süre aktif olacağı optimize edilebilir. Ayrıca karıştırma sayesinde daha verimli bir şırınga temizliği yapılabilir.
- Şırınganın kapalı ve boyutu değiştirilebilir bir sistem olması ve aynı zamanda manyetik karıştırma çubuğu içermesi, açık hazneyle kıyaslandığında sıçrama yoluyla örnek kaybı olmaksızın 3000 rpm'e kadar dönüş hızı sağlar.
- Şeffaf cam şırıngalar kullanılarak hem örnek hazırlama işlemi hem de analitlerin spektrofotometrik tespiti şırınga içinde yapılabilir.
- LIS sistemleri, uygun arayüzler aracılığıyla HPLC gibi enstrümental yöntemlere çevrim içi olarak bağlanabilir.

Tüm bu avantajlarının yanı sıra, tüp manifolduna dayalı akış tekniklerine göre bazı dezavantajlar hâlâ mevcuttur (14):

- Sürekli akış sağlayan tüp manifolduna göre şırınga içinde çok daha büyük bir ölü hacim oluşur. Bu da analiz sonrasında çok daha zorlu bir temizleme prosedürü gerektirir.

- Açık karıştırma haznesi kullanan akış tekniklerine göre LIS'in kapalı bir sistem olması bir elektrodun sisteme kolayca yerleştirilememesi, manuel örneklemenin mümkün olmaması ve gaz çıkışı olan reaksiyonlarda aşırı basınç oluşumunu engelleyememesi gibi dezavantajları vardır.

Şırınga yönü, geliştirilen yöntemin gereksinimlerine göre aşağıdan yukarı ya da yukarıdan aşağı olarak konumlandırılabilir. Sudan daha az yoğun çözücü kullanımında aşağıdan yukarı yönü, sudan daha yoğun çözücü kullanımında ise yukarıdan aşağı yönünün kullanımı uygundur. Yukarıdan aşağı konumlanma, şırınga içeriğinin tamamen boşaltılmasına olanak tanınması ve şırınga pistonunun örnek ile temas etmemesi sebebiyle daha iyi bir tercihtir. Şırınganın yönüne karar vermek açısından ekstraksiyon koşullarını ve çözücülerini belirlemek için LIS sisteminin kurulumundan önce ön deneyler yapmak avantajlıdır (14). Şekil 8’de yukarıdan aşağı konumlandırılmış bir LIS sistemi gösterilmiştir.



Şekil 8. Yukarıdan aşağı konumlandırılmış bir LIS sistemi. (S) şırınga, (HV) 9 portlu kafa valfi, (SP) şırınga pompası, (M) motor, (1) destek, (2) akış portu, (3) atık çıkış aparatı, (4) 5 numaralı destek bileşeninin kafa valfine bağlanmasını sağlayan aparat, (5) motorun konumlandırılması için destek bileşeni, (6) kasnak çarkı, (7) karıştırma halkası, (8) destek halkası. (Mavi ile gösterilen bileşenler 3D yazıcı ile elde edilmiştir.) (14)

LIS sisteminde örnek ve reaktifler ile temas eden tüm bileşenler inert olmalıdır. Şınganın yakınına yerleştirilen motor ile şınga içi karıştırma sağlanır. Burada şınga etrafına motor ile hareket ettirilen iki neodimyum mıknatıs tutan bir karıştırma halkası sarılır ve oluşan manyetik alan ile şınga içinde bulunan karıştırma çubuğu, motorun dönüş hızını takip ederek döner. Kullanılan motor, bilgisayar fanından kolayca elde edilebilir. Motor, bir mikrodenetleyici tarafından kontrol edilir, böylelikle motorun çalışmasının güvenilirliği artırılmış olur (14).

Tüm LIS uygulamaları içinde, en çok LPME yöntemlerinin -özellikle DLLME'nin- otomasyonu rapor edilmiş olmakla birlikte DMSPE yöntemlerinin otomasyonu için üç çalışma mevcuttur.

2015 yılında yayımlanan bir çalışmada Maya ve arkadaşları çeşitli sular ve balıklarda malaşit yeşili bileşenini tayin etmek için sorbent olarak manyetik MOF'ların kullanıldığı bir LIS sistemine dayanan DMSPE yöntemi geliştirilmiştir (18). Bu çalışmada manyetik MOF içeren şıngaya karıştırma sırasında yüksek akış hızında örnek eklenmiştir ve böylelikle sorbentin örnek ortamına dağılması sağlanmıştır. Analit içeren manyetik MOF şınga içindeki mıknatıs üzerinde biriktirilmiştir. Örnek matrisi atıldıktan sonra şınga içeriği su ile yıkanmıştır. Daha sonra analitleri serbest bırakmak için şıngaya metanol eklenmiştir ve elde edilen ekstrakt önce enjeksiyon valfinin döngüsüne yüklenip sonra da dedektöre aktarılmıştır. Analiz edilen su ve balık örneklerinden analitlerin geri kazanımları %95-107 aralığında elde edilmiş olup LOQ değeri 0.012 mg/L'dir.

Bir başka çalışmada atık su örneklerinden östrojen analizi için sorbent olarak zeolitic imidazolat çerçevelerden elde edilen manyetik gözenekli karbonların (MPC) kullanıldığı LIS konseptine dayalı bir DMSPE yöntemi tanıtılmıştır (15). Burada manyetik sorbent içeren şınga ortamına örnek eklenmiş ve karıştırma etkinleştirilerek sorbentin dağılımı sağlanmıştır. Analit içeren MPC'ler şınga içindeki mıknatıs üzerinde biriktirilmiştir. Örnek matrisi atık portuna yönlendirildikten sonra sorbent üzerine absorbe olmuş safsızlıkları uzaklaştırmak için analit içeren manyetik sorbent yıkanmıştır. Daha sonra analitleri elüe etmek için şınga içine kloroform aspire edilmiştir. Elde edilen analit içeren kloroformlu ekstrat toplanmış ve çevrim dışı olarak GC-MS sistemine enjekte edilmiştir. Şınga içi DMSPE, 20 dakikadan az sürede gerçekleşmiş olup östrojen, analiz edilen su örneklerinden %86-115 arasında değişen geri kazanımlarda elde edilmiştir.

Son olarak 2022 yılında Gemuh ve arkadaşlarının rapor ettiği bir çalışmada boncuk enjeksiyonu konseptini kullanan LIS sistemine dayalı otomatik bir DMSPE yöntemi geliştirilmiştir (16). Bu amaçla, sorbent olarak basit bir işlemle manyetikleştirilmiş yenilenebilir ticari SupelTM-Select HLB boncukları kullanılmıştır. Burada örnek içeren şırıngaya karıştırma altında manyetik HLB boncukları eklenmiştir. Manyetik sorbent, şırınga içindeki miknatıs etrafında toplandıktan sonra örnek matrisi atılmıştır. Daha sonra analitler, uygun bir çözücü ile HLB boncuklarından elüe edilmiş ve enjeksiyon valfi aracılığıyla çevrim içi olarak HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Bu sırada şırıngada kalan sorbent atığa yönlendirilirken şırıngaya bir sonraki ekstraksiyon için yeni sorbent aspire edilir. Geliştirilen otomatik yöntem, yüzey sularından çeşitli kirletici maddelerin tespiti için kullanılmış ve analitler, 5-200 µg/L doğrusal aralığında, %78.4 – 105.6 arasında değişen geri kazanımla tespit edilmiştir.

2.8. Kromatografi

Kromatografi, çoğunlukla ayrılımları başka yöntemlerle mümkün olmayan, yapı olarak birbirine benzer özelliklere sahip bileşenlerin ayrılmasına, tespit edilmesine ve kantitatif tayinine olanak tanıyan bir ayırım yöntemidir. Çeşitli bilim dallarında yaygın olarak uygulama alanı bulan kromatografi, ilk olarak 1906 yılında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuştur. Tswett çalışmasında, bitkilerde bulunan klorofil ve ksantofil gibi pigmentleri ayırmak için bu bileşiklerin çözeltilerini sabit faz olarak CaCO_3 doldurulmuş cam bir kolondan geçirmiştir.

Kromatografik ayırma işlemlerinde örnek gaz, sıvı ya da süperkritik sıvı gibi bir mobil faz içinde çözülür. Mobil faz daha sonra, bir kolonda veya katı bir yüzeyde bulunan sabit fazdan geçirilir. Hareketli faz ve sabit faz, örnek bileşenlerinin iki faz arasında değişen oranlarda dağılmasını sağlayacak şekilde seçilir. Sabit faz üzerinde daha güçlü tutulan maddeler, mobil faz ile birlikte daha yavaş hareket ederken sabit faz üzerinde daha zayıf tutulan bileşenler ise daha hızlı hareket ederler. Örnek bileşenlerinin sabit faz üzerinde hareket hızlarındaki bu farklılıklardan dolayı, bileşenlere ait kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilebilen ayrı bantlar veya bölgeler oluşur (83, 84).

Kromatografik yöntemler, temel olarak üç farklı şekilde sınıflandırılır:

- Kullanılan fazların tipine göre
 - Sıvı kromatografisi

- Gaz kromatografisi
- Süperkritik akışkan kromatografisi
- Uygulama biçimine göre
 - Kolon kromatografisi
 - Düzlemsel kromatografi
- Ayrılma mekanizmalarına göre
 - Adsorpsiyon kromatografisi
 - Partisyon kromatografisi
 - İyon değiştirme kromatografisi
 - Moleküler eleme kromatografisi

Kromatografik yöntemler, önce mobil faz türü sonra da sabit faz türü belirtilerek adlandırılır. Bunun dışında eğer tek faz ismi belirtilmişse bunun mobil faz olduğu kabul edilir (83, 85).

Kolon kromatografisinde sabit faz bir kolona doldurulur ve mobil faz, sabit faz üzerinde yerçekimi ve basınç etkisi ile hareket eder. Düzlemsel kromatografide ise sabit faz düz bir plaka üzerine kaplanır ve mobil faz, sabit faz üzerinde kapiler hareketler ile hareket eder (83–85).

Adsorpsiyon kromatografisi bileşenlerin sabit faza tutunmalarına, partisyon kromatografisi iki faz arasındaki dağılımına, iyon değiştirme kromatografisi iyonik bileşenlerin elektrostatik kuvvetler ile sabit fazla etkileşimine ve moleküler eleme kromatografisi ise ayırımı istenen bileşenlerin boyutlarındaki farklılıklarına dayanır.

2.9. Kromatografide Temel Parametreler

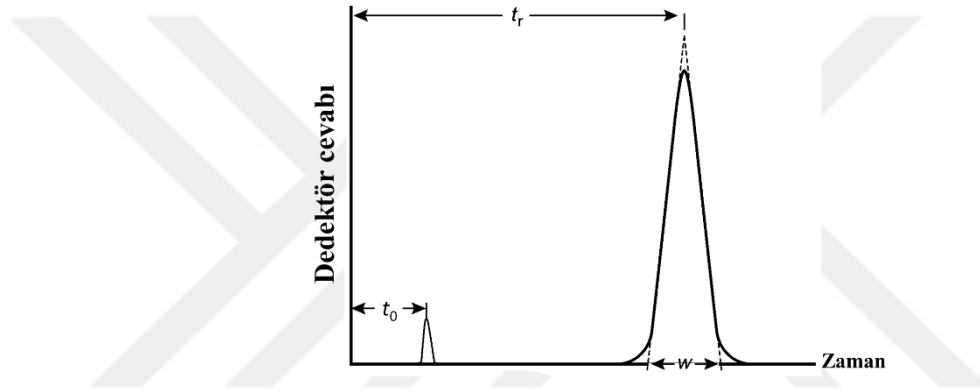
2.9.1. Alıkonma Zamanı (t_R) ve Alıkonma Hacmi (V_R)

Alıkonma zamanı, bir analitin enjeksiyonundan kromatogramda pikin tepe noktasının görülmesine kadar geçen süredir. Analitin, enjeksiyondan sonra dedektöre ulaşması için gereken süre olarak da ifade edilebilir. Alıkonma hacmi, analitin enjeksiyonundan pik tepe noktasının görülmesi arasında sistemden geçen hareketli faz hacmidir. Alıkonma zamanı, alıkonma hacminin hareketli fazın akış hızına bölünmesiyle bulunur.

2.9.2. Kapasite Faktörü (k)

Kapasite faktörü, bir analitin sabit faz tarafından ne derece tutulduğunun bir ölçüsüdür. Sabit fazdaki analit miktarının hareketli fazdaki analit miktarına bölünmesiyle bulunur. Analitlerin kolondan elüe olma hızlarını karşılaştırmak için kullanılan bir parametredir. İdeal bir ayırım için k değerlerinin 1 - 10 arasında olması istenir. Kapasite faktörü, eşitlik 1 yardımıyla hesaplanabilir. Şekil 9’da kapasite faktörünün hesaplanmasında kullanılan temel parametreler gösterilmektedir.

$$k = (t_R - t_0)/t_0 \quad (\text{Eşitlik 1})$$



Şekil 9. Alıkonma zamanı (t_R), ölü zaman (t_0) ve pik genişliğinin (w) kromatogram üzerinde gösterimi

2.9.3. Seçicilik Faktörü (α)

Seçicilik faktörü, kolonu sırasıyla terk eden iki analitin kapasite faktörlerinin oranlanmasıyla belirlenir (Eşitlik 2). Ayırım gücünün bir ifadesidir. Alıkonma zamanı büyük analitin kapasite faktörü, küçük olan analitin kapasite faktörüne oranlandığı için seçicilik her zaman 1’den büyüktür.

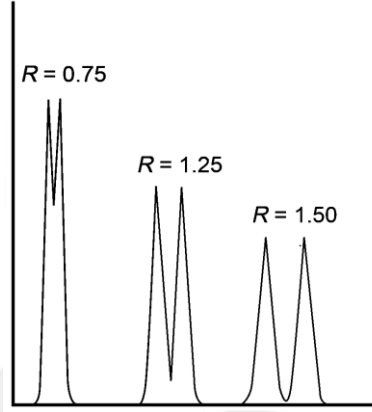
$$\alpha = k_2/k_1 = (t_{R2} - t_0)/(t_{R1} - t_0) \quad (\text{Eşitlik 2})$$

2.9.4. Resolüsyon (R)

Kromatografinin amacı numuneye ait her bir bileşenin kromatogramdaki piklerinin birbirinden ayrılmasıdır. Resolüsyon, iki kromatografik pikin birbirinden ne kadar iyi ayrıldığını nicel olarak ifade eden bir ölçüttür ve Eşitlik 3’teki gibi hesaplanmaktadır. Şekil

9’da resolüsyonun hesaplanmasında kullanılan temel parametreler gösterilmektedir. İdeal olarak resolüsyon değerlerinin ≥ 1.5 olması istenir (Şekil 10).

$$R = (t_{R2} - t_{R1}) / 0.5(w_2 + w_1) \quad (\text{Eşitlik 3})$$



Şekil 10. Üç farklı resolüsyon değerine sahip iki pikin kromatogram üzerinde gösterimi

2.9.5. Kolon Etkinliği

Bir kolonun keskin ve dar pikler verme yeteneği, kolon etkinliği olarak adlandırılır. Plaka yüksekliği (H) ve teorik plaka sayısı (N) ile nicel olarak ifade edilebilir. Teorik plaka sayısı, analitin sabit ve hareketli fazlar arasında bölündüğü ayrı bölümlerden oluşuyormuş gibi düşünülen bir teoridir. N, Eşitlik 4’te görüldüğü gibi t_R ve pik genişliği (w) kullanılarak hesaplanabilir. İyi bir kolon etkinliği için plaka sayısının büyük, plaka yüksekliğinin küçük olması istenir (Eşitlik 5).

$$N = 16 \times (t_R / w)^2 \quad (\text{Eşitlik 4})$$

$$N = L / H \quad (\text{Eşitlik 5})$$

2.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC çeşitli organik, inorganik ve biyolojik örneklerin ayırımında ve analizinde yaygın olarak kullanılan bir kromatografi türüdür. Bu teknikte sıvı ya da uygun bir çözücünde çözünmüş katı örnek, sıvı hareketli faz tarafından kolon boyunca taşınır.

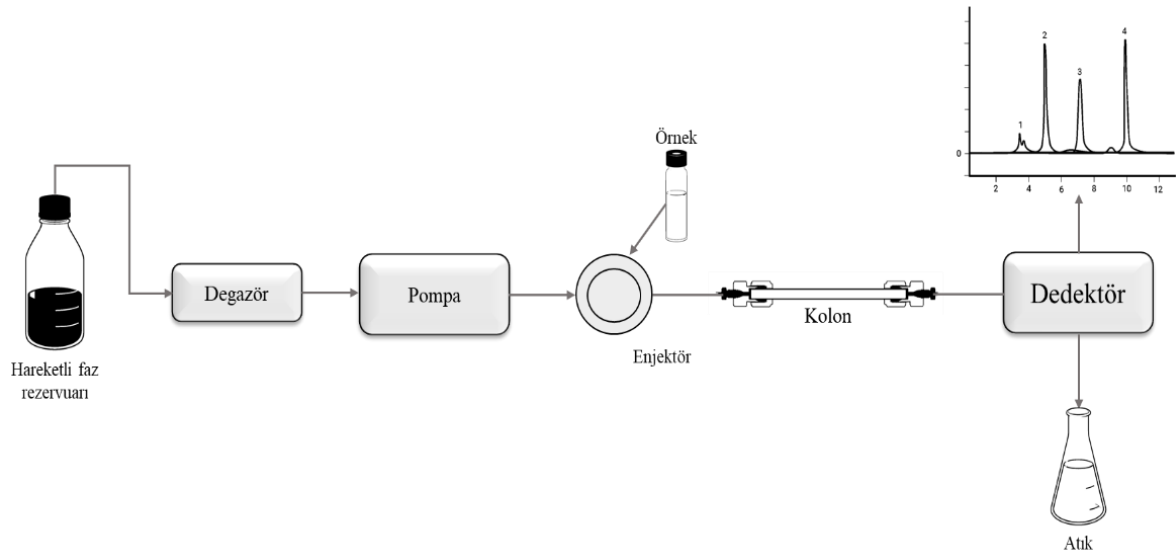
Sıvı kromatografisi, ilk olarak 1900’lerin başlarında "klasik kolon kromatografisi" adıyla bilinen bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Burada sabit fazla doldurulmuş cam bir kolona yukarıdan aşağıya doğru örnek ve çözücü eklenmiştir ve çözücü yer çekimi etkisiyle

kolonda aşığı doğru hareket ettikçe örnek bileşenleri kolondan hareket etme hızlarına göre ayrılmıştır. Sıvı kromatografisinde zaman içinde önemli gelişmeler yaşanmış ve bu alandaki ilerlemeler hızla devam etmiştir. 1960'ların sonlarında tanıtılan HPLC, sıvı kromatografisinin gelişiminin modern dönüm noktası olmuştur. İlk olarak kolona otomatik enjeksiyon için örnekler, örnek tepsisine yerleştirilir. Hareketli faz, sürekli olarak kolona pompalanır ve bileşikler kolondan ayrılırken bir dedektör tarafından tespit edilir. Tüm analiz işleminin bilgisayar tarafından kontrol edilmesiyle birlikte yüksek basınçlı pompaların kullanımı, ayırım için daha etkili ve yeniden kullanılabilir kolonlar ve daha hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar için analizin daha etkin kontrolünü sağlar (83, 85).

HPLC, tüm analitik ayırma yöntemleri arasında en çok kullanılan yöntemdir. Bunun nedenleri arasında şunlar sayılabilir:

- Yüksek hassasiyet sağlar.
- Doğru kantitatif analizler için kolayca uyarlanabilir.
- Yöntem otomasyonu kolaylığı sağlar.
- Uçucu olmayan ve termal duyarlılığa sahip bileşenleri ayırabilir.
- Geniş uygulama alanı vardır.

HPLC Şekil 11'de gösterilen bölümlerden oluşmaktadır.



Şekil 11. HPLC cihazının bölümleri

2.10.1. Hareketli Faz Rezervuarları ve Çözücü Filtrasyonu

Hareketli faz rezervuarları, HPLC sisteminin ana bileşenlerinden biridir. Hareketli faz bileşenlerinin önceden karıştırılarak kullanıldığı izokratik uygulamalarda tek bir rezervuar kullanılırken hareketli faz bileşenlerinin analiz sırasında karıştırıldığı ya da gradient uygulamalarda birden fazla rezervuara ihtiyaç vardır. Cam şişeler bu amaçla yaygın olarak kullanılır. Rezervuarlar, pompa girişinden daha yükseğe yerleştirilmelidirler, bu yükseklik farkı ile çözücünün pompanın girişine pozitif basınçla akması sağlanır ve böylelikle pompanın hava alması ve sıvı akışı kesilmesi önlenmiş olur.

Hareketli fazlarda bulunan istenmeyen partiküller dedektör performansını engelleyebilir, bu yüzden rezervuar ile pompayı birbirine bağlayan tüpün giriş ucunda bir filtre kullanılır. Bu filtreler paslanmaz çelik, PEEK veya seramik gibi hareketli faza karşı inert olan malzemelerden üretilir.

2.10.2. Gaz Giderim Ünitesi

Hareketli faz içindeki çözünmüş gazlar, akış hızlarında düzensizliklere ve bant yayılmasına neden olmakla birlikte bu kabarcıklar çoğu dedektörün doğru çalışmasını da engeller. Bu nedenle hareketli faz içindeki gazların giderilmesi gerekir. Bu amaçla helyum püskürtme ve vakumlu gaz giderme gibi çevrimdışı işlemler uygulanabilir, fakat bu şekilde de gaz giderme işlemi durdurulduğunda hareketli faz tekrardan hava ile dengelenmeye başlayacaktır. Bu yüzden HPLC sistemine entegre olmuş degazör kullanmak daha iyi bir seçimdir.

2.10.3. Pompalama Sistemleri

Rezervuardaki hareketli fazı kolona aktaran sistemlerdir. İdeal bir HPLC kolon sistemi 6000 psi'ye (400 bar) kadar basınç üretebilmeli, 0.1-10 mL/dk arasında değişen darbesiz akış hızı sağlamalı, %0.5 veya daha iyi akış tekrarlanabilirliği sunmalı ve çözücüler tarafından aşındırılmaya dirençli olmalıdır. Günümüzde kullanımda olan neredeyse tüm HPLC pompalama sistemleri, pistonlu pompa çeşitleridir.

2.10.4. Otomatik Örnekleyiciler

Bir örneğin kolona enjekte edilmesi, basınçla akış halindeki hareketli faza istenen miktarda örneğin eklenmesidir. Loop enjektörler ile 1 µL'den 100 µL'ye kadar örnek hacimlerinde enjeksiyon yapılabilir. Manuel olan bu teknikte yükleme pozisyonundaki döngüye istenilen örnek hacminin birkaç katı yüklenir, daha sonra döngü enjeksiyon

pozisyonuna çevirilir ve hareketli fazın örnekleme döngüsünden geçmesiyle örnek kolona gönderilir. Fakat günümüzde çoğu HPLC cihazının otomatik örnekleyiciler ile birlikte satılması sebebiyle daha az kullanılmaktadırlar. Burada örnekler, 96 ya da 384 kuyu içeren örnek tepsilerine hacmi 1 – 1.5 mL olan cam şişelerde koyulur ve örnekleyici iğnesinin örnek şişesine hareketiyle istenilen hacimde örnek alınmış olur. Otomatik örnekleyiciler ile günde yüzlerce örneği otomatik ve gözetimsiz olarak daha yüksek hassasiyette, doğrulukta ve tekrarlanabilirlikte kolona enjekte etmek mümkündür.

2.10.5. Kolon

Örnek bileşenlerinin ayrımının sağlandığı kolonlar, HPLC sisteminin ‘kalbi’ olarak kabul edilir ve HPLC’nin başlangıcından bu zamana kadar büyük oranda değişim göstermiştir. Kolonlar, daha yüksek ayırma hızı ve etkinliği için zamanla geliştirilmişlerdir. HPLC için kullanılan kolonlar genellikle paslanmaz çelikten üretilmiştir. Kolonların çoğu 3-5 mm iç çapında, 5-25 cm uzunluğundadır. Kolon dolgu maddesinin en yaygın partikül boyutu 3-5 µm'dir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan kolonlar 10-15 cm uzunluğunda, 4.6 mm iç çapında ve 5 µm partiküllerle doldurulmuştur. Bu kolonların etkinliği, 40000-70000 plaka/metredir. Silika temelli partiküller, günümüzde HPLC kolon dolgu maddesi olarak sıklıkla tercih edilir. Silika uzun çalışma süreleri ve basınçlara karşı stabil olması, daha yüksek N değerleri sunması, seçiciliği değiştirebilmek için farklı ligandlarla bağlanabilmesi ve tüm organik çözücülerle ve suyla uyumlu olması avantajlarıyla ön plana çıkar.

2.10.6. Dedektörler

Kromatografik dedektörler, analiz edilen örneğin fiziksel veya kimyasal bir özelliğini, analit konsantrasyonu ile doğru orantılı bir elektrik sinyaline dönüştüren cihazlardır. Uzun bir süre boyunca HPLC kolonundan elde edilen fraksiyonlar toplanmış ve HPLC’den bağımsız bir cihazda kantitatif analiz yapılmıştır. Bu durum zaman alıcı olmakla birlikte kromatografik çözünürlüğün düşmesine de sebep olmaktadır. Günümüzde ise çevrim içi algılama için HPLC cihazlarına doğrudan bağlı dedektörler kullanılır. Dedektör, pik genişlemesini en aza indirmek için kolondan hemen sonraya yerleştirilir. Yaygın kullanılan dedektörler arasında UV, floresan ve kütle spektrometresi dedektörleri sayılabilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal maddelerin listesi Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan kimyasal maddelerin listesi

Kimyasal Maddenin Adı	Firma
Demir (III) klorür hekzahidrat ($\geq\%99$)	Sigma-Aldrich
Nikel (II) nitrat hekzahidrat ($\geq\%99$)	ZAG Kimya
Magnezyum nitrat hekzahidrat ($\geq\%98$)	Tekkim
Alüminyum klorür hekzahidrat ($\geq\%99$)	Sigma-Aldrich
Kobalt (II) nitrat hekzahidrat ($\geq\%99$)	ZAG Kimya
Krom (III) nitrat nonahidrat ($\geq\%99$)	Sigma-Aldrich
Çinko nitrat hekzahidrat ($\geq\%99$)	ZAG Kimya
Bakır (II) nitrat trihidrat ($\geq\%95$)	ZAG Kimya
Sodyum nitrat ($\geq\%99$)	Sigma-Aldrich
Amonyak ($\geq\%25$)	Merck
Hidroklorik asit ($\geq\%36,5$)	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich
Sülfürik asit ($\geq\%95-98$)	Tekkim
Metanol (HPLC saflığında)	Supelco
Etanol ($\geq\%99,5$)	İsolab
Asetonitril (HPLC saflığında)	Supelco
Formik asit ($\geq\%99$, LC/MS için)	Carlo Erba
Sodyum klorür ($\geq\%99$)	Sigma-Aldrich
Potasyum klorür ($\geq\%99$)	Tekkim
Magnezyum sülfat heptahidrat ($\geq\%99,5$)	Sigma-Aldrich
Kalsiyum sülfat dihidrat	Bereket Kimya
Sodyum bikarbonat	Sigma-Aldrich

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

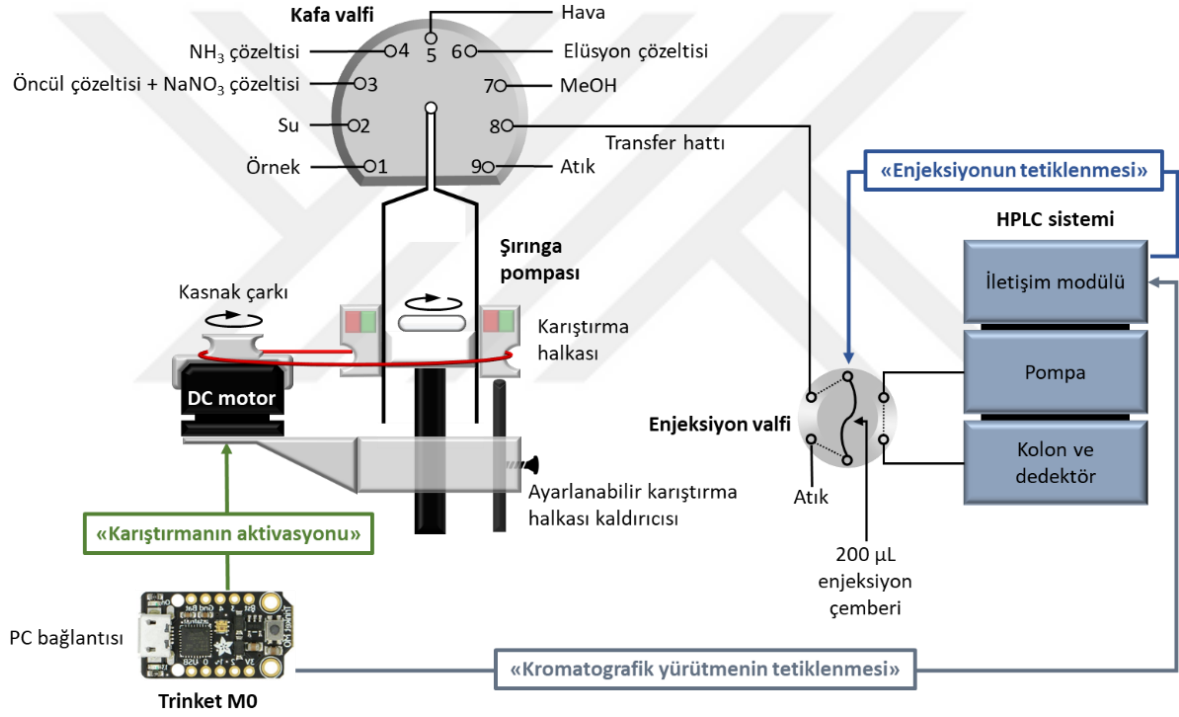
Kullanılan araç ve gereçlerin listesi Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan araç ve gereçlerin listesi

Kullanılan Araç ve Gerecin Adı	Markası ve Modeli
HPLC sistemi	Shimadzu, LC-20AT pompa, DGU-20A5 gaz giderici, SIL-20A otomatik örnekleyici, CTO-10ASVP kolon fırını, SPD20A DAD
FT-IR	Shimadzu, IRAffinity-1S
XRD	PANalytical X’Pert3
FE-SEM	Thermo Fisher Scientific, Apreo 2S
Hassas terazi	Ohaus, PA214C
Saf su cihazı	Sartorius Stedim, Arium pro UV
pH metre	Hanna Instruments, HI 2211
Santrifüj	Nüve, NF 615
Ultrasonik su banyosu	Thermomac, TSC2D-010S
Vorteks	Isolab, MX-S
Vakumlu süzme pompası	BFC, BF-S2500
Otomatik şırınga pompası	Tecan, Cavo XC9+ (9 portlu dağıtım başlığı valfine ve 10 mL cam şırıngaya sahip)
Enjeksiyon valfi	Waters, EV700 (2 pozisyonlu, 10 portlu)
Mikropipetler	Socorex
Balon joje	Isolab, 10-1000 mL
Membran filtre	Sartorius Stedim, Selüloz asetat, 0.45 µm

Otomatik şırınga pompası ‘aşağıdan yukarı’ konumda kullanılmıştır. Ekstraksiyon, elüsyon ve şırınga temizliği için gerekli çözeltilerin aspirasyonları başlık valfinin 1, 2, 3, 4, 6 ve 7 numaralı portlara 0.5 mm iç çapa sahip floropolimer (FEP) tüplerden yapılmıştır. Hava aspirasyonu 5 numaralı porttan gerçekleştirilmiştir. Başlık valfini enjeksiyon valfine bağlamak için 8 numaralı porta 0.5 mm iç çapa sahip FEP tüp bağlanarak çevrimiçi bağlantı için transfer hattı sağlanmıştır. Şırınganın içeriği, 9 numaralı porttan 1.5 mm iç çapa sahip FEP tüp aracılığıyla atığa boşaltılmıştır. Şırınga içerisine 13.8 mm uzunluk ve 4 mm çapında bir manyetik karıştırma çubuğu koyularak aspire edilen çözeltilerin karıştırılması

sağlanmıştır. Karıştırma çubuğunun hareketini sağlamak için yazılım kontrollü doğru akım motor ile hareket ettirilen iki neodimyum mıknatıs tutan bir karıştırma halkası tarafından manyetik alan oluşturulmuştur. Otomatik enjeksiyon, 10-portlu enjeksiyon valfi üzerinden gerçekleştirilmiştir. Doğru akım motor, bilgisayar fanından elde edilmiştir. Karıştırma halkası, motorun yerleştirildiği yüksekliği ayarlanabilir karıştırma halkası kaldırıcısı ve motor için bir kasnak çarkı BambuLab P1S 3D yazıcı ile üretilmiştir. Motor aktivasyonu, enjeksiyon valfi kontrolü ve HPLC-UV analizinin başlamasını tetiklemek için bir Trinket M0 mikrodenetleyici kullanılmıştır. Tüm sistemin kontrolü, Cocosoft 6.1 yazılımı ile sağlanmıştır (86). LIS-HPLC sisteminin şematik gösterimi Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Deneylerde kullanılan LIS-HPLC sisteminin şematik gösterimi

3.3. Kullanılan Etkin Maddeler

Kullanılan etkin maddelerin listesi Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan etkin maddelerin listesi

Etkin Madde	Firma
LOS potasyum	Ali Raif İlaç Sanayi A.Ş.
VALS	Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.
IRBE	Ali Raif İlaç Sanayi A.Ş.
CANDE	Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.

3.4. Kullanılan Kolonlar

DMSPE yönteminin optimizasyonu sırasında Poroshell 120 PFP (100 mm x 4.6 mm, 2.7 µm) kolonu kullanılmıştır. Validasyon ve örnek analizi sırasında ise yüksek hacimli enjeksiyona olanak tanınması sebebiyle GLSciences ODS-V3 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolonu kullanılmıştır. Ayrıca olası partikül girişini engellemek ve kolon ömrünü uzatmak için hidrofilik politetrafloroetilen (PTFE) şırınga tipi filtrelerden sökülen membranlar bir koruyucu kartuş içine yerleştirilerek kullanılmıştır.

3.5. Çözeltilerin Hazırlanması

1000 ppm stok LOS çözeltisinin hazırlanması: 27.25 mg LOS potasyum tartılmış, 25 mL'lik balon jojeye alınarak bir miktar metanolde çözülmüştür. Çözünme tamamlandıktan sonra metanol ile 25 mL'ye tamamlanmıştır.

1000 ppm stok VALS çözeltisinin hazırlanması: 25 mg VALS tartılmış, 25 mL'lik balon jojeye alınarak bir miktar metanolde çözülmüştür. Çözünme tamamlandıktan sonra metanol ile 25 mL'ye tamamlanmıştır.

1000 ppm stok IRBE çözeltisinin hazırlanması: 25 mg IRBE tartılmış, 25 mL'lik balon jojeye alınarak bir miktar metanolde çözülmüştür. Çözünme tamamlandıktan sonra metanol ile 25 mL'ye tamamlanmıştır.

25 ppm stok ARB çözeltisinin hazırlanması: 1000 ppm stok çözeltilerinden ayrı ayrı 250 µL LOS, 250 µL VALS ve 250 µL IRBE alınmış ve 10 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. Daha sonra saf su ile hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır.

Çalışma çözeltileri ve kalite kontrol çözeltileri stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlanmıştır.

Tüm stok çözeltiler amber renkli şişelerde ışıktan korunacak şekilde +4 °C’de saklanmıştır. Optimizasyon, kalibrasyon ve validasyon için gereken standart ARB çözeltileri günlük olarak stok çözeltilerden saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

1 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinin hazırlanması: 2.7 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ katısı tartılıp 10 mL’lik balon jojeye aktarılmıştır, bir miktar saf su ile çözülüp yine saf su ile 10 mL’ye tamamlanmıştır.

1 M $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinin hazırlanması: 2.9 g $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ katısı tartılıp 10 mL’lik balon jojeye aktarılmıştır, bir miktar saf su ile çözülüp yine saf su ile 10 mL’ye tamamlanmıştır.

100 mmol/L/50 mmol/L Ni-Fe + NaNO_3 çözeltisinin hazırlanması: 1.25 mL $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, 2.5 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ve 5 g NaNO_3 tuzu 25 mL’lik balon jojeye aktarılmıştır. NaNO_3 çözündükten sonra hacim saf su ile 25 mL’ye tamamlanmıştır.

NH_3 çözeltisinin hazırlanması: %25’lik NH_3 çözeltisinden 2.34 g tartılmış ve 25 mL’lik balon jojeye aktarılmıştır. Daha sonra hacim saf su ile 25 mL’ye tamamlanmıştır.

Elüsyon çözücüsünün (%20 metanol içeren formik asit çözeltisi) hazırlanması: 2 mL metanol 10 mL’lik balon jojeye aktarılmış ve hacim formik asit ile 10 mL’ye tamamlanmıştır.

%0.1 formik asit çözeltisinin hazırlanması: 1 mL LC/MS saflıkta formik asit 1000 mL’lik balon jojeye aktarılmış ve hacim saf su ile 1000 mL’ye tamamlanmıştır.

3.6. Örnek Hazırlanması

Çevresel su örnekleri, LIS sisteminde DMSPE yöntemi kullanılarak analize hazırlanmıştır. DMSPE, ilk önce trinketin motoru aktive etmesi ve şırınga içi karıştırmanın 1200 rpm’de etkinleştirilmesiyle başlamıştır. Karışan şırınga içine sırasıyla 4 numaralı porttan 4 mL/dk hızla 180 μL NH_3 çözeltisi, 1 numaralı porttan 15 mL/dk hızla 6000 μL örnek ve 3 numaralı porttan 600 μL NaNO_3 içeren öncül çözeltisi aspire edilmiştir. Daha sonra tüm çözeltileri şırınga içine almak ve homojen karışım sağlamak için 5 numaralı porttan 550 μL hava aspire edilmiştir. Şırınga, *in situ* oluşan LDH’ların örnek içinde dağıtılması ve analitlerle etkileşime girmesi için 30 saniye karıştırılmıştır. Ekstraksiyon işlemi bitince karıştırma durdurulmuş ve LDH’ların çökmesi için 2 dakika beklenmiştir. Çökme tamamlanınca üstte kalan süpernatant 9 numaralı porttan 15 mL/dk hızla atığa gönderilmiştir. Sonrasında LDH’ları yıkamak için karıştırma tekrar aktive edilmiş ve 2 numaralı porttan 15 mL/dk hızla 6000 μL saf su aspire edilmiştir. 30 saniye karıştırdıktan

sonra karıştırma tekrar durdurulmuş ve 2 dakika boyunca LDH'ların çökmesi beklenmiştir. Çökme tamamlanınca süpernatant tekrar 9 numaralı porttan 15 mL/dk hızla atığa yönlendirilmiştir. Bu yıkama işlemi bir kere daha tekrarlanmıştır. Son olarak, kalan 850 µL süpernatant, 5 mL/dk hızla yine 9 numaralı porttan atılmıştır. Karıştırma tekrar aktive edilmiş ve analitleri tutmuş olan LDH'ların çözünmesi için 200 µL formik asit:metanol (80:20) çözeltisi 6 numaralı porttan 15 mL/dk hızla aspire edilmiştir. Daha sonra çözeltiyi tamamen şırınga içine almak için 200 µL hava aspire edilmiştir. Çözünme tamamlandıktan sonra karıştırma durdurulmuştur. Analize hazır olan ekstrat 5 mL/dk hızla 8 numaralı porttan enjeksiyon döngüsüne (loop) gönderilmiştir. Son olarak HPLC sistemi trinket aracılığıyla tetiklenmiş ve enjeksiyon valfindeki ekstraktın sisteme enjekte olmasıyla kromatografik analiz başlamıştır.

Analiz başladıktan sonra LIS sistemi, ekstraksiyonlar arası kontaminasyon riskini önlemek için otomatik bir temizleme aşamasından geçirilmiştir. HPLC süresi de dikkate alınarak otomatik analizlerde ekstraksiyon ve temizlik adımlarının çakışmaması için ekstraksiyon sonrasında 60 saniye beklenmiştir. Temizleme adımı 2 numaralı porttan 2000 µL saf su aspirasyonu ile başlamıştır. Aspirasyondan 5 saniye sonra karıştırma durdurulmuş ve şırınga içeriği 9 numaralı porttan atılmıştır. Sonrasında şırınga ve transfer hattı 7 numaralı porttan 1200 µL metanol aspire edilerek bir kere yıkanmıştır. Aspirasyondan 5 saniye sonra karıştırma deaktive edilmiş ve şırınga içeriği, transfer hattını da temizlemek için bu sefer 8 numaralı porttan atılmıştır. Yine şırınga ve transfer hatta bu sefer 2 numaralı porttan 1200 µL saf su aspire edilerek üç kez yıkanmış, karıştırma durdurulmuş ve içerik 8 numaralı porttan atılmıştır. Son olarak, transfer hattını boşaltmak için hava aspire edilmesiyle temizleme aşaması tamamlanmıştır.

Tüm bu ekstraksiyon ve temizleme prosedürü Cocosoft 6.1 yazılımı kontrolünde gerçekleştirilmiştir (Tablo 4, Tablo 5, Tablo 6).

Yöntem optimizasyonu sırasında DMSPE işleminin gerçekleşmesinin ardından elde edilen ekstrakt 9 numaralı porttan bir santrifüj tüpüne alınıp 5000 rpm hızda santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant atılıp kalan LDH'lar çözüldükten sonra elde edilen çözelti doğrudan HPLC cihazında analiz edilmiştir. Yöntem validasyonu sırasında ise yukarıda anlatıldığı gibi tam otomatik yöntem kullanılmıştır.

Tablo 4. LIS sisteminde otomatik DMSPE yöntemi

Talimat	Yorum
Trinket_For_LIS_1.Pin0(99) Wait(1) Trinket_For_LIS_1.Pin0(40)	Şırınga içinde karıştırmanın 1200 rpm'de aktivasyonu (%40 performans)
Cavro_XL.valve(4) Cavro_XL.set_speed_uL_min(4000) Cavro_XL.aspirate_uL(VolNH ₃) Wait(2)	180 µL NH ₃ çözeltisinin 4 numaralı porttan şırınga içine aspirasyonu
Cavro_XL.valve(1) Cavro_XL.set_speed_uL_min(15000) Cavro_XL.aspirate_uL(VolSample) Wait(3)	6000 µL örneğin 1 numaralı porttan şırınga içine aspirasyonu
Cavro_XL.valve(3) Cavro_XL.set_speed_uL_min(15000) Cavro_XL.aspirate_uL(VolPrecursor) Wait(2)	600 µL prekürsör + NaNO ₃ çözeltisinin 3 numaralı porttan şırınga içine aspirasyonu
Cavro_XL.valve(5) Cavro_XL.aspirate_uL(550) Wait(2)	Tüm çözücüleri şırınga içine almak için 5 numaralı porttan 550 µL hava aspirasyonu
Wait(TimeMixingForDMSPE)	DMSPE gerçekleşmesi için 30 sn beklenmesi
Trinket_For_LIS_1.Pin0(0) Wait(TimeForPrecipitation)	LDH'ların sedimentasyonu için karıştırmanın durdurulması ve 2 dk beklenmesi
Cavro_XL.valve(9) Cavro_XL.set_speed_uL_min(15000) Cavro_XL.dispense_uL(5200)	Üstte kalan berrak kısmın 9 numaralı porttan atığa yönlendirilmesi
Loop(2) Trinket_For_LIS_1.Pin0(99) Trinket_For_LIS_1.Pin0(40) Cavro_XL.valve(2) Cavro_XL.set_speed_uL_min(15000) Cavro_XL.aspirate_uL(VolSample) Wait(3) Cavro_XL.valve(5) Cavro_XL.aspirate_uL(550) Wait(3) Trinket_For_LIS_1.Pin0(0) Wait(TimeForPrecipitation) Cavro_XL.valve(9) Cavro_XL.set_speed_uL_min(15000) Cavro_XL.dispense_uL(6550) Loop_end() Wait(1)	LDH'ların 6000 µL distile su ile iki defa yıkanması
Cavro_XL.valve(9) Cavro_XL.set speed uL min(5000)	2. yıkamanın ardından üstte kalan berrak sıvının atığa yönlendirilmesi

Cavro_XL.dispense_uL(850)	
Trinket_For_LIS_1.Pin0(99) Trinket_For_LIS_1.Pin0(50) Cavro_XL.valve(6) Cavro_XL.set_speed_uL_min(15000) Cavro_XL.aspirate_uL(200) Wait(1) Cavro_XL.valve(5) Cavro_XL.set_speed_uL_min(15000) Cavro_XL.aspirate_uL(200) Wait(20) Trinket_For_LIS_1.Pin0(0) Wait(20)	LDH'ların şırınga içinde 6 numaralı porttan aspire edilen 200 µL formik asit/metanol (80:20) ile çözülmesi
Cavro_XL.valve(8) Cavro_XL.set_speed_uL_min(5000) Cavro_XL.dispense_uL()	Ekstraktın enjeksiyon döngüsüne 8 numaralı porta bağlanan bir tüp ile transferi
Trinket_For_LIS_1.Pin3(1) Wait(3) Trinket_For_LIS_1.Pin3(0)	HPLC sisteminin Trinket M0 vasıtası ile tetiklenmesi
Wait(60)	Şırınga temizleme adımına geçilmeden önce beklenmesi
ValvePos = 2 Rep = 1 VolClean = 2000 Routine_call("CleanSyringe")	Şınganın 2000 µL su ile 1 defa yıkanması
ValvePos = 7 Rep = 1 VolClean = 1200 Routine_call("CleanSyringeAndTransferLine")	Şırınga ve transfer hattının 1 defa 1200 µL metanol ile yıkanması
ValvePos = 2 Rep = 3 VolClean = 2000 Routine_call("CleanSyringeAndTransferLine")	Şırınga ve transfer hattının 3 defa 2000 µL su ile yıkanması
Cavro_XL.valve(5) Cavro_XL.set_speed_uL_min(25000) Cavro_XL.aspirate_uL(800) Cavro_XL.valve(8) Cavro_XL.set_speed_uL_min(15000) Cavro_XL.dispense_uL() Wait(5)	Transfer hattının hava ile doldurulması

Tablo 5. Rutin "CleanSyringe"

Cavro_XL.valve(ValvePos) Trinket_For_LIS_1.Pin0(99)	Temizleme çözücüsünün seçilmesi ve karıştırmanın aktive edilmesi
Trinket_For_LIS_1.Pin0(40) Cavro_XL.set_speed_uL_min(20000) Cavro_XL.aspirate_uL(VolClean)	"VolClean" hacminde temizleme çözücüsünün şırıngaya aspirasyonun 5

Wait(5) Trinket_For_LIS_1.Pin0(0) Wait(1)	sn sonrasında karıştırmanın durdurulması
Cavro_XL.valve(8) Cavro_XL.set_speed_uL_min(30000) Cavro_XL.dispense_uL() Wait(8)	Şırınga içeriğinin 8 numaralı porta yönlendirilmesi

Tablo 6. Rutin “CleanSyringeAndTransferLine”

Cavro_XL.valve(ValvePos) Trinket_For_LIS_1.Pin0(99)	Temizleme çözücüsünün seçilmesi ve karıştırmanın aktive edilmesi
Trinket_For_LIS_1.Pin0(40) Cavro_XL.set_speed_uL_min(20000) Cavro_XL.aspirate_uL(VolClean) Wait(5) Trinket_For_LIS_1.Pin0(0) Wait(1)	“VolClean” hacminde temizleme çözücüsünün şırıngaya aspirasyonun 5 sn sonrasında karıştırmanın durdurulması
Cavro_XL.valve(8) Cavro_XL.set_speed_uL_min(30000) Cavro_XL.dispense_uL() Wait(8)	Şırınga içeriğinin 8 numaralı porta yönlendirilmesi

3.7. Kromatografik Şartlar

DMSPE yönteminin optimizasyonu sırasında Poroshell 120 PFP (100 mm x 4.6 mm, 2.7 μ m) kolonu, validasyon ve örnek analizi sırasında ise GLSciences ODS-V3 (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m) kolonu kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk olan hareketli faz iki bileşenden oluşmuştur: zayıf bileşen (A) olarak %0.1 formik asit çözeltisi, kuvvetli bileşen (B) olarak asetonitril. Hareketli fazlar Tablo 7’de gösterilen gradient programa göre kullanılmıştır. Kolon fırını sıcaklığı 25°C’dir. Dedektör dalga boyu 260 nm’ye ayarlanmıştır. Toplam kromatografik analiz süresi 16 dakikadır. Optimizasyon sırasında 10 μ L hacminde ekstrakt bir otomatik örnekleyiciden enjekte edilmiştir. LIS sistemi ile HPLC arasında çevrim içi bağlantı sağlandıktan sonra validasyon ve örnek analizi sırasında 200 μ L hacminde ekstrakt bir enjeksiyon valfi üzerinden sisteme enjekte edilmiştir.

Kromatografik ayırım öncesinde, kolondan 1 mL/dk akış hızında 10 dakika boyunca saf su:asetonitril (80:20) karışımı geçirilmiş, sonrasında zemin düzelene kadar %0.1 formik asit:asetonitril (80:20) karışımı ile kolon şartlanmıştır.

Tam otomatik analizde enjeksiyon HPLC event portu üzerinden LCSolution yazılımı kontrolünde yapılmıştır. Enjeksiyon programlanması 0 dk, Event 2; 0.75 dk, Event 0 şeklindedir.

Tablo 7. Hareketli faz gradient programı

Zaman (dk)	%0.1 Formik asit çözeltisi (%A)	Asetonitril (%B)
0	80	20
1	80	20
8	0	100
9	0	100
10	80	20
16	80	20

3.8. Ni-Fe Temelli LDH’ın Karakterizasyonu

Sentezlenen Ni-Fe temelli LDH’ın karakterizasyonu FTIR, XRD ve FE-SEM teknikleri kullanılarak yapılmıştır.

3.9. Yöntem Validasyonu

Optimize edilmiş yöntemin performansı, doğrusallık, duyarlılık, seçicilik, doğruluk ve kesinlik, geri kazanım ve zenginleştirme faktörü parametrelerine göre değerlendirilmiştir.

3.9.1. Doğrusallık

Yöntem doğrusallığı için dış standart yöntemi kullanılarak, tüm analitlerin beş farklı konsantrasyon seviyesinde (5, 10, 50, 100, 200 µg/L) deiyonize su içinde standart çözeltileri hazırlanmıştır. Analiz sonucunda her bir analite ait pik alanı değerleri, analitlerin derişimine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Yöntem doğrusallığı, kalibrasyon eğrilerinden elde edilen r değerleri incelenerek değerlendirilmiştir. Ek olarak, kalibrasyon eğrisini oluşturmak için kullanılan standart çözeltilerin pik alanları, kalibrasyon eğrisine yerleştirilmiş ve bu verilerle hesaplanan konsantrasyonlar, gerçek konsantrasyonlarla karşılaştırılarak yöntem doğrusallığı kontrol edilmiştir.

3.9.2. Duyarlılık

Yöntem duyarlılığı, LOD ve LOQ değerleri ile değerlendirilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sinyal/gürültü oranlarına dayalı olarak belirlenmiştir. Sinyal/gürültü oranı LOD için 3:1, LOQ için ise 10:1 olarak kabul edilir (87).

3.9.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini belirlemek için gün içi ve günler arası deneyler yürütülmüştür. Bu amaçla, 75 µg/L seviyesindeki su içindeki kalite kontrol çözeltileri analiz edilerek değerlendirme yapılmıştır. Gün içi değerlendirme aynı gün içinde beş analiz, günler arası değerlendirme ise üç ayrı günde toplam 15 analiz ile yapılmıştır. Doğruluk, %doğruluk ile, kesinlik %BSS ile gösterilmiştir.

3.9.4. Geri Kazanım

Analitlerin geri kazanımı, 200 µg/L seviyesinde yapılan analizler ile incelenmiştir. Deiyonize suda hazırlanmış standart çözeltinin sisteme direkt enjeksiyonu ve aynı çözelti içerisinde LDH oluşumundan sonra üstte kalan sıvının direkt enjeksiyonu sonucunda pik alanındaki azalma kullanılarak hesaplanmıştır.

3.9.5. Zenginleştirme Faktörü

Analitlerin zenginleştirilmesi, 200 µg/L seviyesinde yapılan analizler ile incelenmiştir. Zenginleştirme faktörleri, geliştirilen DMSPE yönteminin uygulanması ve DMSPE yönteminin kullanılan kimyasallar yerine su çekilmesi ile uygulanması sonucu elde edilen pik alanlarının karşılaştırılması ile hesaplanmıştır.

3.10. Yöntem Geçerliliğinin Gerçek Örnek Analizlerinde Kanıtlanması İçin Yürütülen Validasyon Çalışmaları

Yöntemin gerçek örneklerde gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinliği, üç konsantrasyon seviyesinde (25, 75 ve 150 µg/L) analit eklenmiş Değirmendere Nehri (Trabzon/Ortahisar), Kalyan Gölü (Trabzon/Maçka) ve musluk suyu (Trabzon/Ortahisar) örnekleri analiz edilerek değerlendirilmiştir. Doğruluk, %doğruluk ile, kesinlik %BSS ile gösterilmiştir.

Analitlerin alıkonma sürelerinde matris bileşenlerinden kaynaklanan herhangi bir girişimin olmadığını kanıtlamak için Değirmendere Nehri, Kalyan Gölü ve musluk suyunda seçicilik deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla, analit eklenmemiş, küçük kalite kontrol seviyesinde (25 µg/L) analit eklenmiş ve orta kalite kontrol seviyesinde (75 µg/L) analit

eklenmiş nehir, göl ve musluk suyu örnekleri analiz edilmiş ve kromatogramları incelenmiştir. Seçicilik ayrıca DAD ile pik saflıkları ölçülerek değerlendirilmiştir.

3.11. Yeşillik Değerlendirmesi

Geliştirilen tam otomatik örnek hazırlama yönteminin yeşilliği, kimyasal analizlerde örnek hazırlama sürecinin çevresel etkisini değerlendirmek için geliştirilmiş bir “yeşil kimya” metriği olan AGREeprep yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir (88).



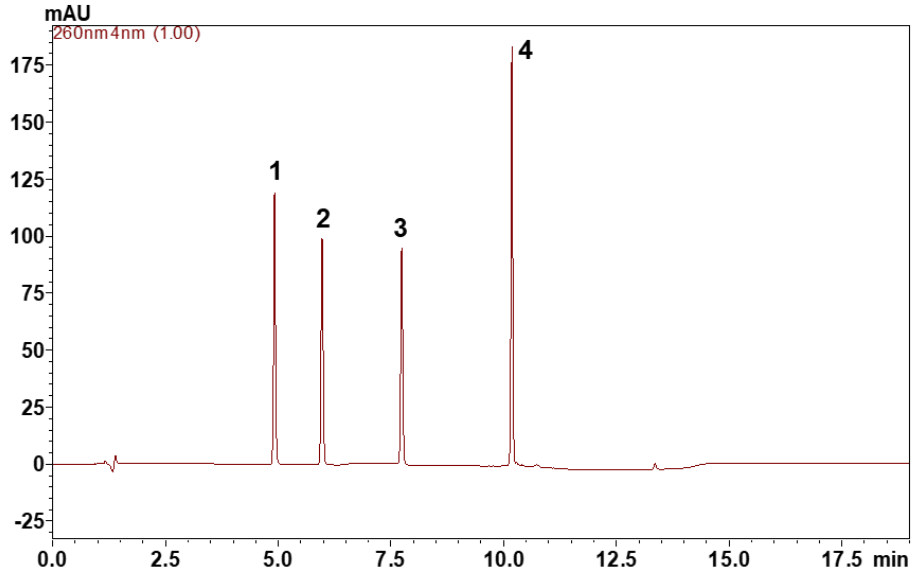
4. BULGULAR

4.1. Dalga Boyu Seçimi

Analitlerin 220, 240, 254, ve 260 nm dalga boylarında UV spektrumları incelenmiştir. Sonuç olarak DAD; LOS, IRBE, VALS ve CANDE'nin maksimum absorbans gösterdiği 260 nm dalga boyunda çalıştırılmıştır.

4.2. Gradient Şartların Belirlenmesi

Kuvvetli hareketli faz bileşeni olarak asetonitril (B) ve zayıf hareketli faz bileşeni olarak %0.1'lik formik asit (A) kullanılarak farklı gradient eğim profillerinde yürütmeler gerçekleştirilmiştir. Optimum ayırımın 0 dk, %20 ACN; 15 dk, %100 ACN gradienti ile sağlandığı gözlemlenmiştir. Şekil 12'de görüldüğü gibi kolonu en geç terk eden bileşiğin alıkonma süresi 10.5 dk'dan azdır. Bu yüzden analiz süresinin kısaltılması amacıyla, gradient eğimi (%5.33 asetonitril/dk) korunarak süre azaltılmaya çalışılmıştır. Sonuç olarak kolon temizleme ve kolon şartlandırma basamaklarının da dahil edildiği analiz süresi 16 dk olarak belirlenmiştir. Optimum şartlar şu şekildedir: 0 dk, %20 B; 1 dk, %20 B; 8 dk, %100 B; 9 dk, %100 B; 10 dk, %20 B; 16 dk, %20 B. Optimum şartlar altında analitlere ait kromatogram Şekil 13'te verilmiştir.



Şekil 13. Optimum gradient koşullarında elde edilen kromatogram. 1-IRBE, 2-LOS, 3-VALS ve 4-CANDE.

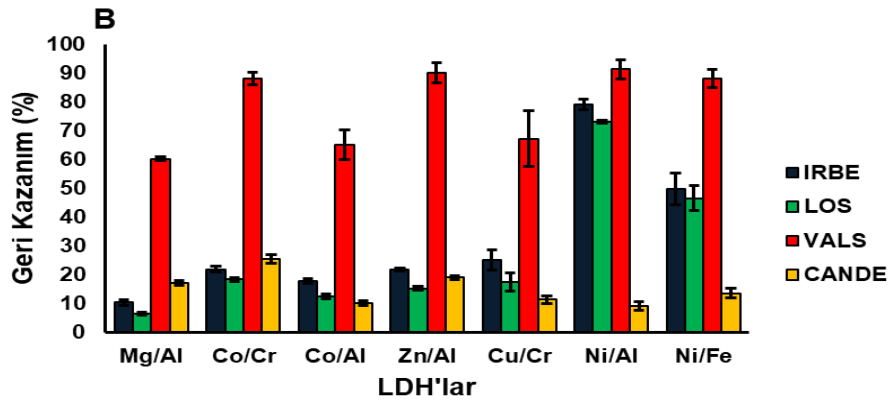
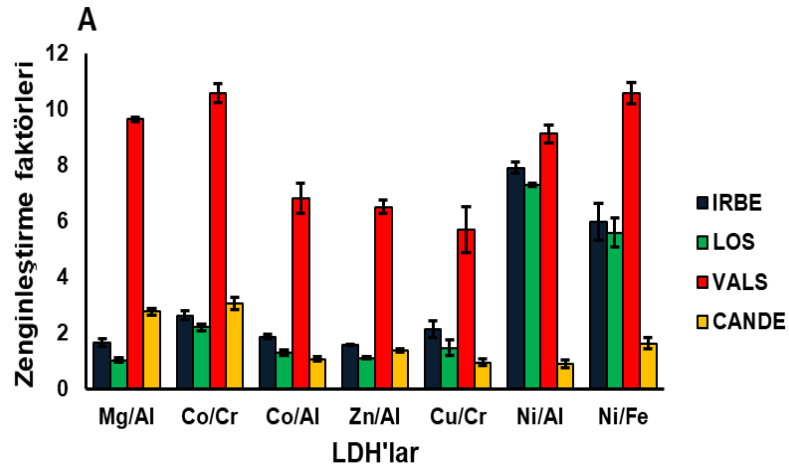
4.3. Yöntem Geliştirilmesi

4.3.1. Örnek Hazırlama İşleminin Optimizasyonu

Optimizasyon deneyleri için örnek hacmi (standart çözelti hacmi) 6 mL olarak belirlenmiştir. Baz ilavesi ile örnek pH'sının ayarlanmasının (pH 9-10) ardından 2:1 mol oranında (100 mmol/L/50 mmol/L) M^{+2}/M^{+3} (Mg/Al, Co/Cr, Co/Al, Zn/Al, Cu/Cr, Ni/Al, Ni/Fe) içeren tuz çözeltilerinden 600 μ L şırınga içerisine çekilmiş ve *in situ* LDH oluşumu sırasında ve sonrasında analitlerin LDH yapısına interkale olabilmesi için 1200 rpm hızda 3 dk karıştırma yapılmıştır. Ardından santrifüj ve çözme işlemleri manuel olarak gerçekleştirilmiştir.

4.3.1.1. Öncül Tipinin Optimizasyonu

Tarama deneyleri için Mg/Al, Co/Cr, Co/Al, Zn/Al, Cu/Cr, Ni/Al ve Ni/Fe metallere oluşmak üzere 7 farklı LDH şırınga içerisinde otomatik olarak sentezlenmiş ve ekstraksiyon etkinlikleri değerlendirilmiştir. Değerlendirme amacıyla zenginleştirme faktörü ve ekstraksiyon geri kazanımı parametreleri göz önünde bulundurulmuştur. Analitler için elde edilen sonuçlar Şekil 14'te verilmiştir.

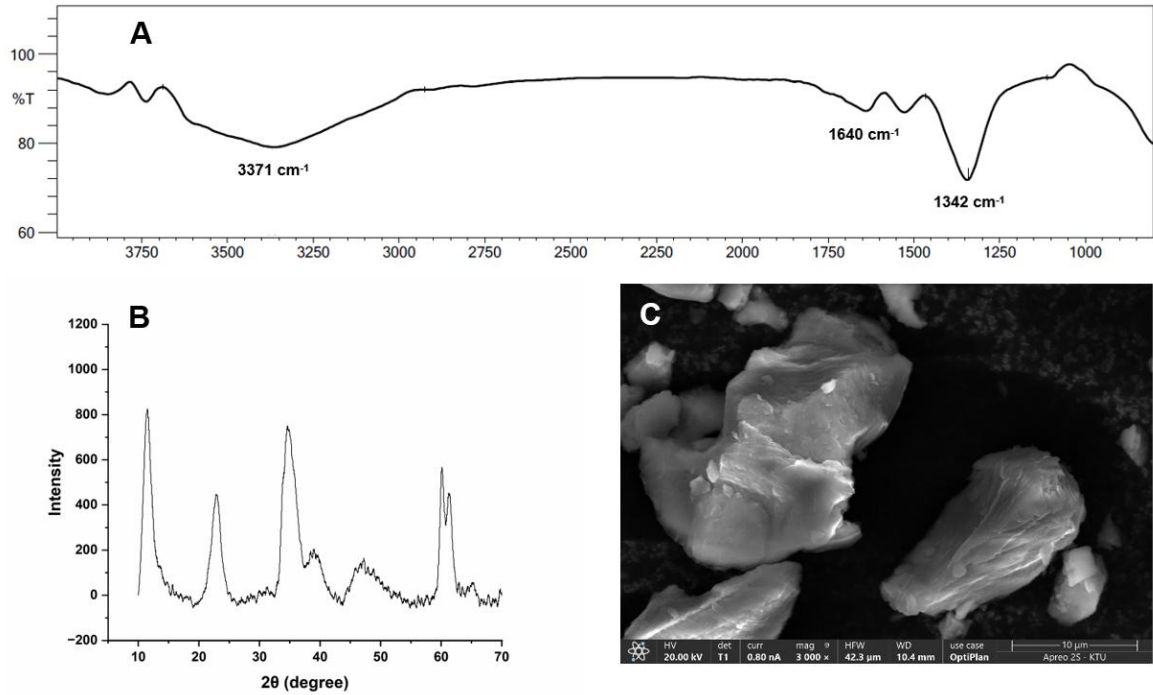


Şekil 14. Farklı öncüller kullanılarak sentezlenen LDH'ların kullanılması ile analitler için elde edilen (A) Zenginleştirme faktörleri ve (B) Geri kazanım değerleri

Analitler için hem ekstraksiyon geri kazanımı hem de zenginleştirme faktörü bakımından en iyi performansı Ni/Al ve Ni/Fe temelli LDH'lar göstermiştir. Elde edilen geri kazanım değerleri %40-90 aralığında değişmektedir. Direkt enjeksiyonla kıyaslandığında analitlerin kromatografik cevapları CANDE hariç 5.5-10.5 kat artırılmıştır. CANDE, düşük geri kazanım ve zenginleştirme faktörü değerleri sebebiyle incelenen analitler arasından çıkarılmıştır. Ni/Al ve Ni/Fe temelli LDH'lar karşılaştırıldığında Ni/Al ile daha yüksek geri kazanım ve zenginleştirme faktörü değerleri elde edilse de Ni/Al temelli LDH'ların 2 dezavantajı mevcuttur. Bu dezavantajlar şunlardır: (1) bu LDH'ların LIS sisteminde çözünmelerini sağlamak amacıyla, ekstraksiyondan sonra asit çözeltisi ile 2 dakika agresif karıştırma gerektiği görülmüştür, (2) yapılan ön deneme çalışmalarında bu LDH'ların şırınga içerisinde melamin köpük kullanılarak filtrelenmelerinin zor olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak LDH sentezinde kullanılacak öncüller Ni ve Fe olarak belirlenmiştir.

4.3.1.2. Ni-Fe Temelli LDH'in Karakterizasyonu

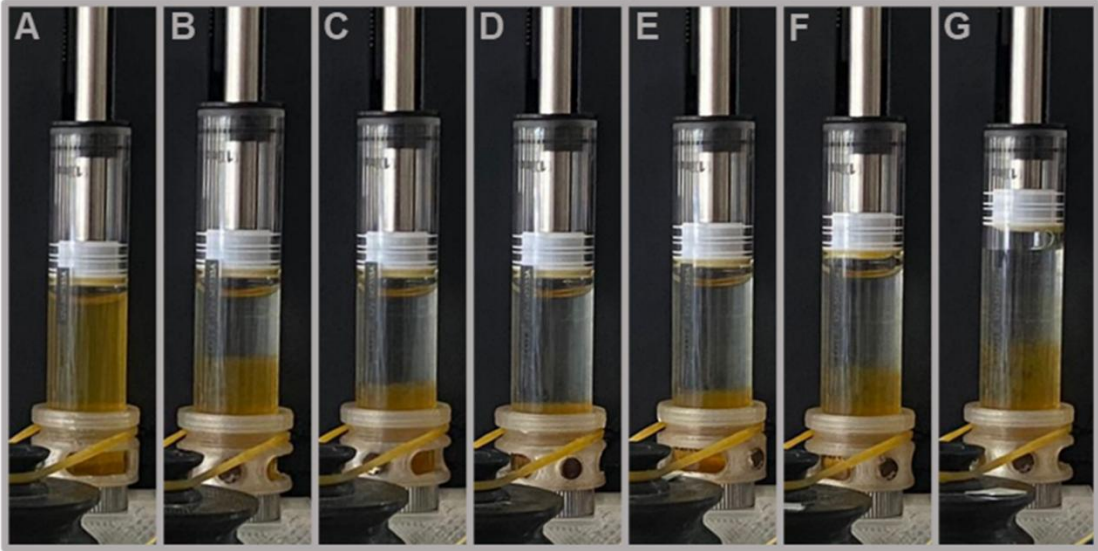
Sentezlenen Ni-Fe temelli LDH'in karakterizasyonu FTIR, XRD ve FE-SEM teknikleri kullanılarak yapılmıştır (Şekil 15). Şekil 15A'da görüldüğü üzere merkezi 3371 cm^{-1} 'de bulunan belirgin ve geniş bant, LDH'ların O-H gerilme titreşimlerini ve araya giren su moleküllerinin varlığını ortaya koymaktadır. Bu bant hem hidroksil gruplarının (3300 cm^{-1} 'de) hem de geçiş metalleriyle bağlanmış ara katman kafes suyunun (2850 cm^{-1} 'de) O-H bağ gerilme titreşimlerinin üst üste binmesinden kaynaklanmaktadır (89). 1640 cm^{-1} 'deki bant suyun bükülme titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1342 cm^{-1} 'de NO_3^{-1} 'in gerilme titreşimine karşılık gelen keskin absorpsiyon bandı, sentezlenen LDH'in ara katmanında nitrat anyonunu varlığını doğrulamaktadır (Şekil 15A) (90). Ni-Fe-LDH için XRD pikleri (Şekil 15B), daha önceki çalışmalarda rapor edilen desenlere benzer bir şekilde, $2\theta = 11.5^\circ$ (003), 22.8° (009), 34.6° (102), 38.4° (105), 46.0° (108), 60.1° (110)'de bulunmuştur. Asimetrik piklerin varlığı, SEM görüntülerinde (Şekil 15C) gözlemlendiği gibi, farklı bazal düzlemlerin farklı yönlerde veya açılarda hizalandığı turbostratik bir yapıya işaret etmektedir (89–91).



Şekil 15. Ni-Fe- NO_3 LDH'in (A) FT-IR spektrumu, (B) XRD toz kırınım deseni ve (C) FE-SEM görüntüsü

4.3.1.3. İyonik Şiddetin LDH Oluşumu ve Sedimentasyon Hızı Üzerine Etkisi

Bu çalışmanın başlangıcında, şırıngada sentezlenen LDH'ların daha önceki bir araştırmada rapor edildiği gibi (17), şırınga girişine yerleştirilen bir melamin filtre vasıtası ile izole edilmesi planlanmıştır. Tarama deneyleri sırasında, melamin filtrenin sentezlenen LDH'ların süzülmesinde tam etkinlik sergilemediği gözlemlenmiştir. Bu yüzden, validasyon ve örnek analizi basamaklarında şırınga aşağıdan yukarı konumlandırılmıştır. Bu şekilde LDH'ların oluştuktan sonra çökmesi beklenmiş ve çökme tamamlanınca matris atığa yönlendirilmiştir. İyonik şiddetin çökme üzerine etkisini incelemek için Ni-Fe çözeltisinden sonra 5 numaralı kafa valfi portu aracılığıyla şırınga içerisine 50, 100, 200, 500, 1000 ve 2000 μL derişik NaNO_3 (%60) çözeltisi aspire edilmiştir. Karıştırmanın durdurulmasından 65 saniye sonrasında çekilen fotoğraflar Şekil 16'da verilmiştir.

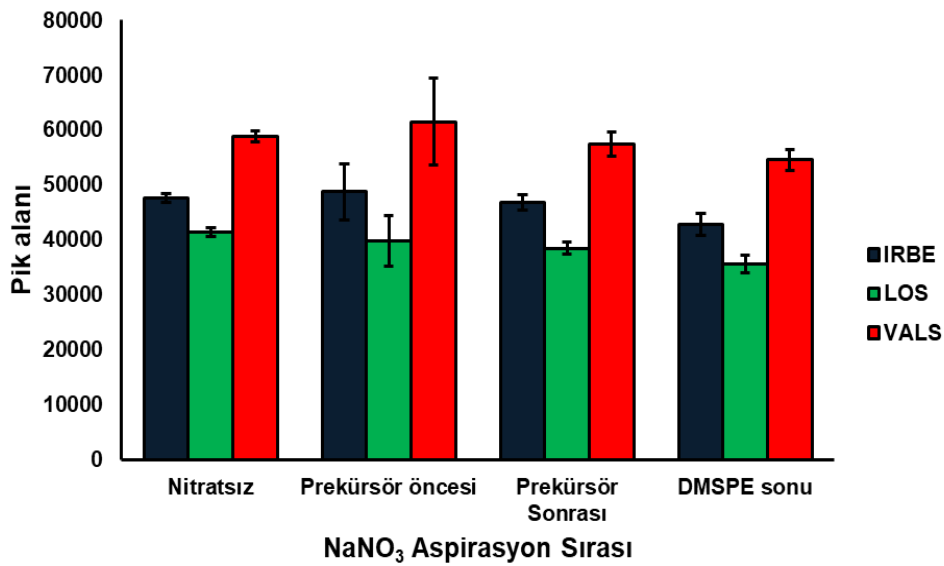


Şekil 16. NaNO_3 aspirasyonunun çökme hızına etkisi. Şırınganın (A) derişik NaNO_3 (%60) çözeltisi eklenmeden, (B) 50 μL , (C) 100 μL , (D) 200 μL , (E) 500 μL , (F) 1000 μL ve (G) 2000 μL derişik NaNO_3 (%60) çözeltisi eklenmiş ortamdaki çökmelerinin görüntüsü.

En yüksek çökme hızı 200 μL NaNO_3 aspire edildiğinde gözlemlendiğinden dolayı ilerleyen deneylerde bu hacim kullanılmıştır.

NaNO_3 çözeltisinin aspirasyon sırası da değerlendirilmiştir. Bu kapsamda 4 farklı deney yürütülmüştür: 1) nitrat eklenmemiş, (2) örnek çözeltisinden önce, (3) prekürsör çözeltisinden hemen sonra, (4) DMSPE'nin hemen ardından nitrat eklenmiş. Şekil 17'de

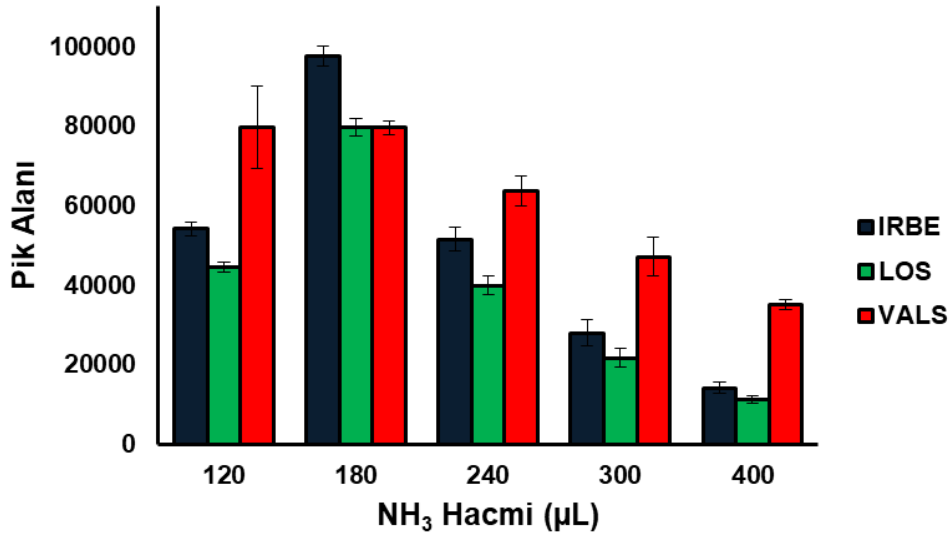
görüldüğü üzere nitrat aspirasyonu pik alanlarını önemli ölçüde etkilememiştir. Fakat nitrat eklenmemesi ve prekürsör çözeltisinden önce eklenmesi LDH'ların çökme süresini uzatmıştır (>3.5 dk). Ayrıca prekürsör çözeltisinden önce eklenmesi durumunda BSS değerleri yüksek bulunmuştur. Prekürsör çözeltisinden hemen sonra ve DMSPE'nin hemen ardından NaNO_3 aspirasyonunda benzer sonuçlar görülmüş olmakla birlikte aspirasyonun prekürsör çözeltisinden hemen sonra yapılması durumunda pik alanları hafifçe daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak NaNO_3 aspirasyonunun prekürsör çözeltisinden hemen sonra yapılmasına karar verilmiştir.



Şekil 17. NaNO_3 çözeltisinin aspirasyon sırasının analitlerin pik alanları üzerine etkisi

4.3.1.4. NH_3 Hacminin Optimizasyonu

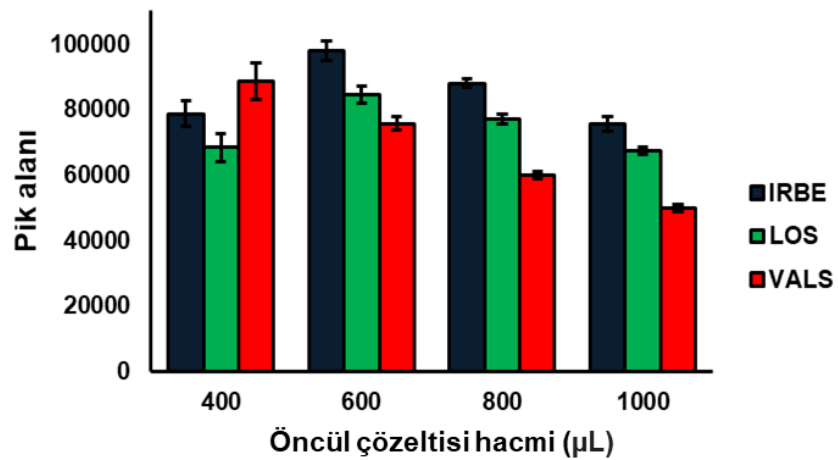
Şırınga içerisine 120-400 μL aralığında değişen hacimlerde 1.5 mol/L NH_3 çözeltisi aspire edilerek pH etkisi incelenmiştir. 120, 180, 240, 300 ve 400 μL baz aspirasyonunun ardından örnek çözeltilerinin pH değerleri sırası ile 6.7, 7.7, 8.8, 9.1 ve 9.4 olarak bulunmuştur. Şekil 18'de görüldüğü üzere pik alanları 180 μL seviyesine kadar artmış daha sonra ise azalmıştır. Bu sebeple NH_3 hacminin 180 μL ve ekstraksiyon pH'sının 7.7 olmasına karar verilmiştir. Amonyagın uçucu olduğu göz önünde bulundurularak NH_3 çözeltisi günlük olarak hazırlanmış ve her gün ilk ekstraksiyondan sonra matris pH'ı kontrol edilmiştir.



Şekil 18. NH₃ hacminin analitlerin pik alanı üzerine etkisi

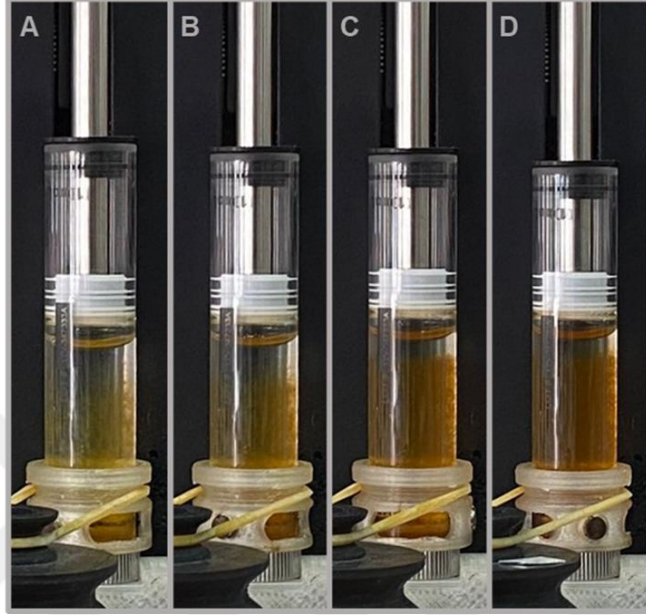
4.3.1.5. Öncül Çözeltili Hacminin Optimizasyonu

Analitlerin ekstraksiyon verimi üzerinde LDH miktarının etkisini araştırmak için, 400-1000 µL aralığında öncül çözeltisi şırınga içerisine aspire edilerek ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, ekstraksiyon pH'ının sabit tutulabilmesi için prekürsör çözeltisinin hacmi ile doğru orantılı olarak NH₃ çözeltisinin hacmi de değiştirilmiştir. LDH miktarındaki artışla IRBE ve LOS için ekstraksiyon verimliliği 600 µL'de maksimuma ulaşmış ve daha sonra azalmıştır. VALS için ise en yüksek etkinlik 400 µL'de elde edilmiş ve daha sonra pik alanları düşmüştür (Şekil 19).



Şekil 19. Öncül çözelti hacminin analitlerin pik alanları üzerine etkisi

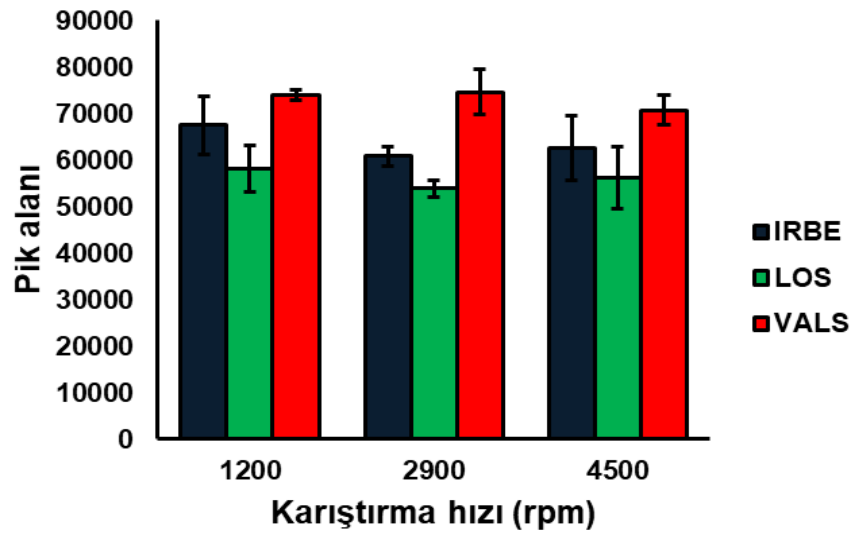
Öncül hacminin LDH'ların çökmesi üzerine etkisi incelendiğinde, Şekil 20'de görüldüğü üzere en iyi çökme 600-800 μL hacimlerde olmuştur. Sonuç olarak optimum öncül hacmi 600 μL olarak belirlenmiştir.



Şekil 20. (A) 400 μL , (B) 600 μL , (C) 800 μL , (D) 1000 μL prekürsör çözeltisi ile 3 dk karıştırma yapıldıktan sonra elde edilen çökme görüntüsü

4.3.1.6. Karıştırma Hızı ve Süresinin Optimizasyonu

Karıştırma hızının ekstraksiyon verimliliği üzerindeki etkisi 1200, 2900 ve 4500 rpm hızlarında ekstraksiyon gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. 1200 rpm'de nispeten daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 21). Ayrıca çökme hızı da Şekil 22'de görüldüğü gibi 1200 rpm'de daha yüksektir. Bu nedenle optimum karıştırma hızı 1200 rpm olarak belirlenmiştir.

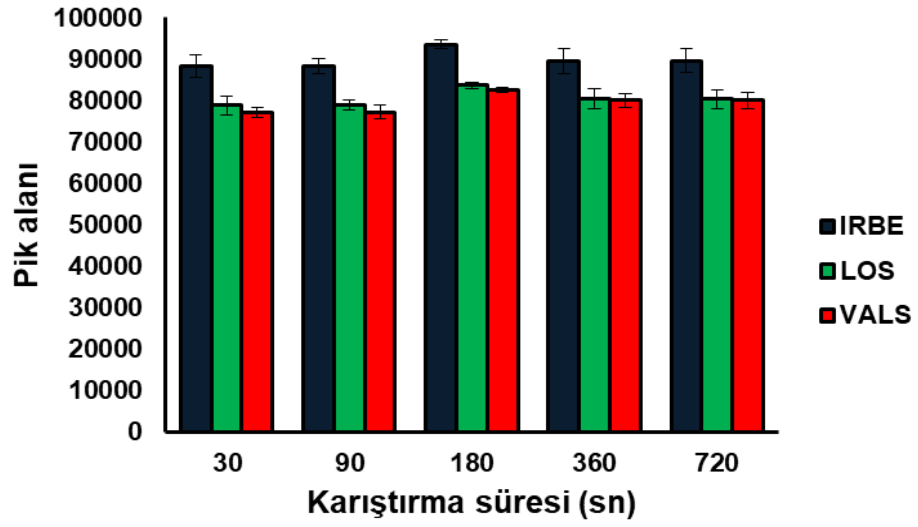


Şekil 21. Şırınga içi karıştırma hızının analitlerin pik alanları üzerine etkisi



Şekil 22. Şırınganın (A) 1200 rpm, (B) 2900 rpm, (C) 4500 rpm karıştırma hızıyla ekstraksiyonundan 30 saniye sonraki çökme görüntüsü

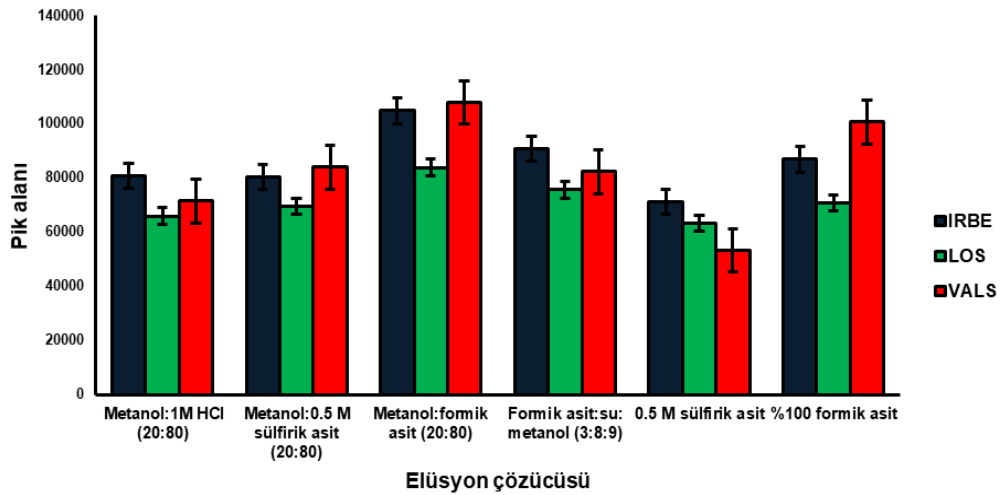
Ekstraksiyon süresinin pik alanları üzerine etkisi 30-720 sn aralığında incelenmiştir. Şekil 23'ten görüleceği üzere bütün karıştırma süreleri için benzer pik alanları elde edilmiştir. Bu sebeple, ekstraksiyon süresi olarak 30 sn seçilmiştir.



Şekil 23. Karıştırma süresinin analitlerin pik alanları üzerine etkisi

4.3.1.7. Elüsyon Çözücü Bileşiminin Seçimi

LDH yapısını bozmak için kullanılan çözücünün bileşimini belirlemek için DMSPE'den sonra elde edilen LDH'lar, Şekil 24'te verilen birçok çözelti içerisinde çözülmüş ve ekstrakt sisteme enjekte edilmiştir. En yüksek pik alanları %20 metanol içeren formik asit çözeltisinde elde edilmiştir ve bu çözelti LDH yapısının bozulması için optimum olarak seçilmiştir.

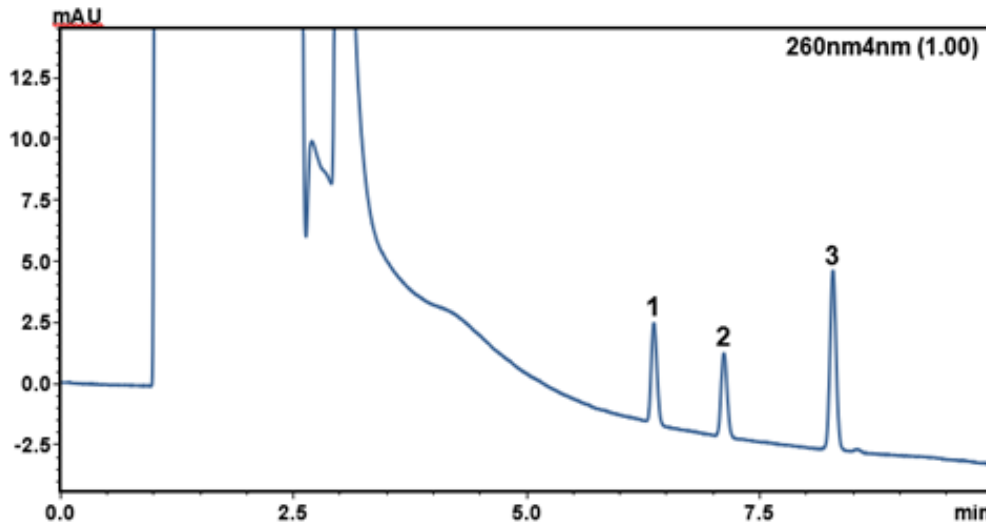


Şekil 24. Elüsyon çözücüsü bileşiminin analitlerin pik alanları üzerine etkisi

4.3.2. Enjeksiyon Hacmi

Optimizasyon çalışmaları sırasında yüksek kromatografik etkinlik sağlamasından dolayı Poroshell 120 PFP (100 mm x 4.6 mm, 2.7 μ m) kolon kullanılmıştır. Fakat uygulanan ekstraksiyon prosedüründen sonra LDH'lar matris sıvısından tamamen uzaklaştırılamadığından dolayı bir seyrelme meydana gelmektedir ve bu da yöntem duyarlılığını olumsuz etkilemektedir. Yöntem duyarlılığını artırmak için yüksek hacimli enjeksiyon yapılması yaklaşımı değerlendirilmiştir. Bu sebeple, büyük yüzey alanı sunarak daha yüksek yükleme kapasitesi sağlamaları sebebiyle optimizasyon sonrası deneylerde kolon olarak GLSciences ODS-V3 kolon (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m) kullanılmıştır.

Otomatik DMSPE'den sonra HPLC sistemine örnek enjeksiyonu 10-200 μ L aralığında incelenmiş ve pik şeklinde herhangi bir bozulma gözlenmemiştir. Bu yüzden yüksek pik alanı sunmasından dolayı enjeksiyon hacmi 200 μ L olarak belirlenmiştir. Şekil 25'te 200 μ L ekstrakt enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram gösterilmiştir.



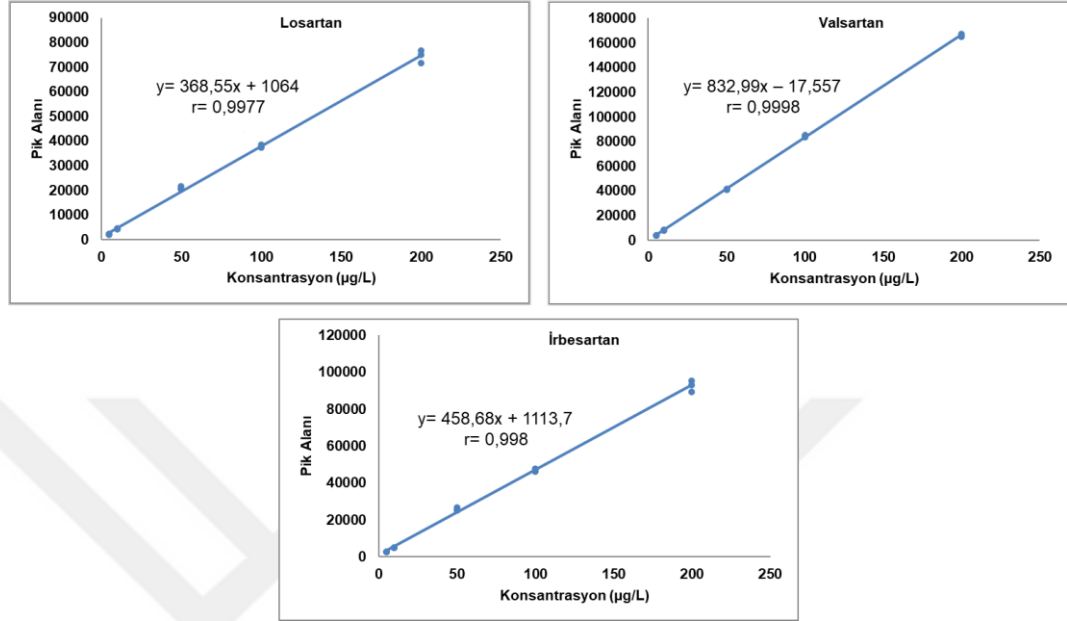
Şekil 25. Standart ARB çözeltisinin otomatik DMSPE ardından 200 μ L ekstrakt enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram. 1-IRBE, 2-LOS, 3-VALS

4.4. Yöntem Validasyonu

4.4.1. Doğrusallık

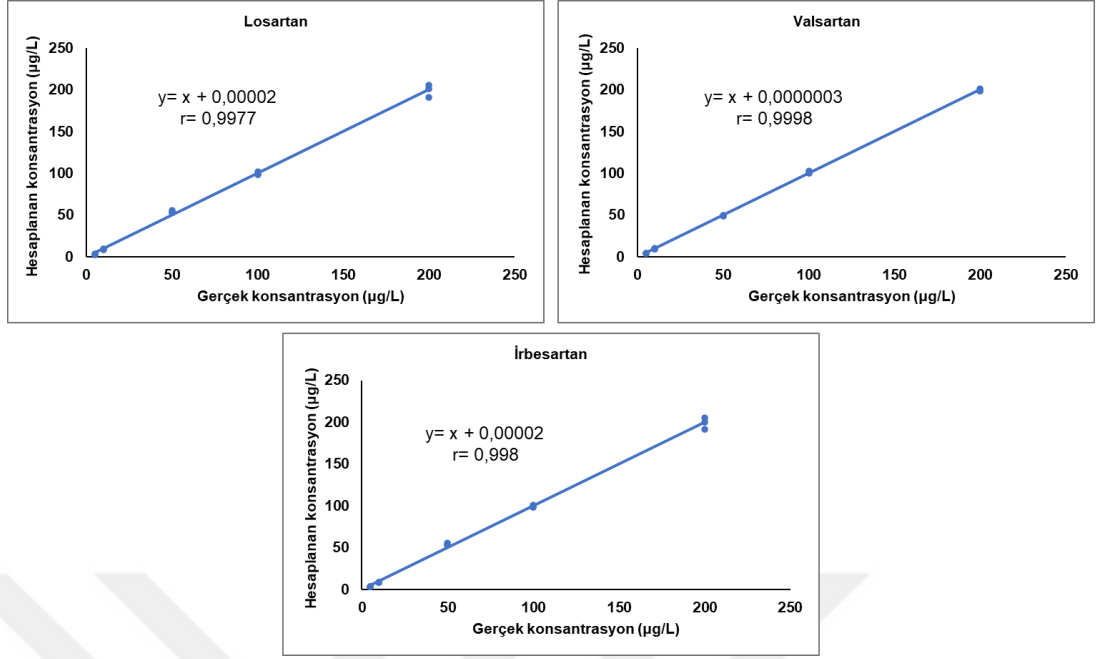
Yöntem doğrusallığı, dış standart yöntemi kullanılarak; tüm analitlerin beş farklı konsantrasyon seviyesinde (5, 10, 50, 100, 200 μ g/L) hazırlanan standart çözeltilerinin analizleri sonucunda her bir analite ait pik alanı değerlerinin, analit derişimlerine karşı

grafiğe geçirilmesiyle oluşturulan kalibrasyon eğrileri üzerinden değerlendirilmiştir. Her bir analite ait kalibrasyon eğrileri şekil 26’da verilmiştir.



şekil 26. Analitlere ait kalibrasyon eğrileri

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için kullanılan standart çözeltilerin pik alanları, kalibrasyon eğrisine yerleştirilmiş ve bu verilerle hesaplanan konsantrasyonlar, gerçek konsantrasyonlarla karşılaştırılarak yöntem doğrusallığı kontrol edilmiştir (şekil 27).



Şekil 27. Analitlere ait doğrusallık kontrol grafikleri

4.4.2. Duyarlılık

LOD ve LOQ değerleri, sinyal/gürültü oranlarına dayalı olarak belirlenmiştir. Analitlerin LOD ve LOQ değerleri Tablo 8’te gösterilmiştir.

Tablo 8. Analitlerin LOD ve LOQ değerleri

Analit	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
LOS	1.5	4.5
VALS	1.0	3.0
IRBE	1.5	4.5

4.4.3. Doğruluk ve Kesinlik

Bütün analitler için 75 µg/L seviyesinde, aynı gün içinde beş, üç farklı günde toplam 15 analiz yapılarak geliştirilen yöntemin doğruluk ve kesinliği değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları, kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmış ve Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Geliştirilen yöntemin analitler için doğruluk ve kesinlik sonuçları

Analit	Doğruluk (%)*		Kesinlik (%BSS)*	
	Gün içi (n=5)	Günler arası (n=15)	Gün içi (n=5)	Günler arası (n=15)
LOS	101.8	99.95	2.5	5.3
VALS	100.8	98.5	0.33	3.7
IRBE	102.2	100.5	1.6	5.2

* 75 µg/L konsantrasyon seviyesinde yürütülmüştür.

4.4.4. Geri Kazanım

Analitlerin geri kazanımı, 200 µg/L seviyesinde, deiyonize suda hazırlanmış standart çözeltinin sisteme direkt enjeksiyonu ve aynı çözelti içerisinde LDH oluşumundan sonra üstte kalan sıvının direkt enjeksiyonu sonucunda pik alanındaki azalma kullanılarak hesaplanmıştır. LOS, VALS ve IRBE için %geri kazanım değerleri sırasıyla %62.8, %88.7 ve %62.0 bulunmuştur.

4.4.5. Zenginleştirme Faktörü

Zenginleştirme faktörleri, 200 µg/L seviyesinde, geliştirilen DMSPE yönteminin uygulanması ve DMSPE yönteminin kullanılan kimyasallar yerine su çekilmesi ile uygulanması sonucu elde edilen pik alanlarının karşılaştırılması ile hesaplanmıştır. LOS, VALS ve IRBE için zenginleştirme faktörleri sırasıyla 13.3, 25.8 ve 15.3 bulunmuştur.

4.5. Yöntem Geçerliliğinin Gerçek Örnek Analizlerinde Kanıtlanması İçin Yürütülen Validasyon Çalışmaları

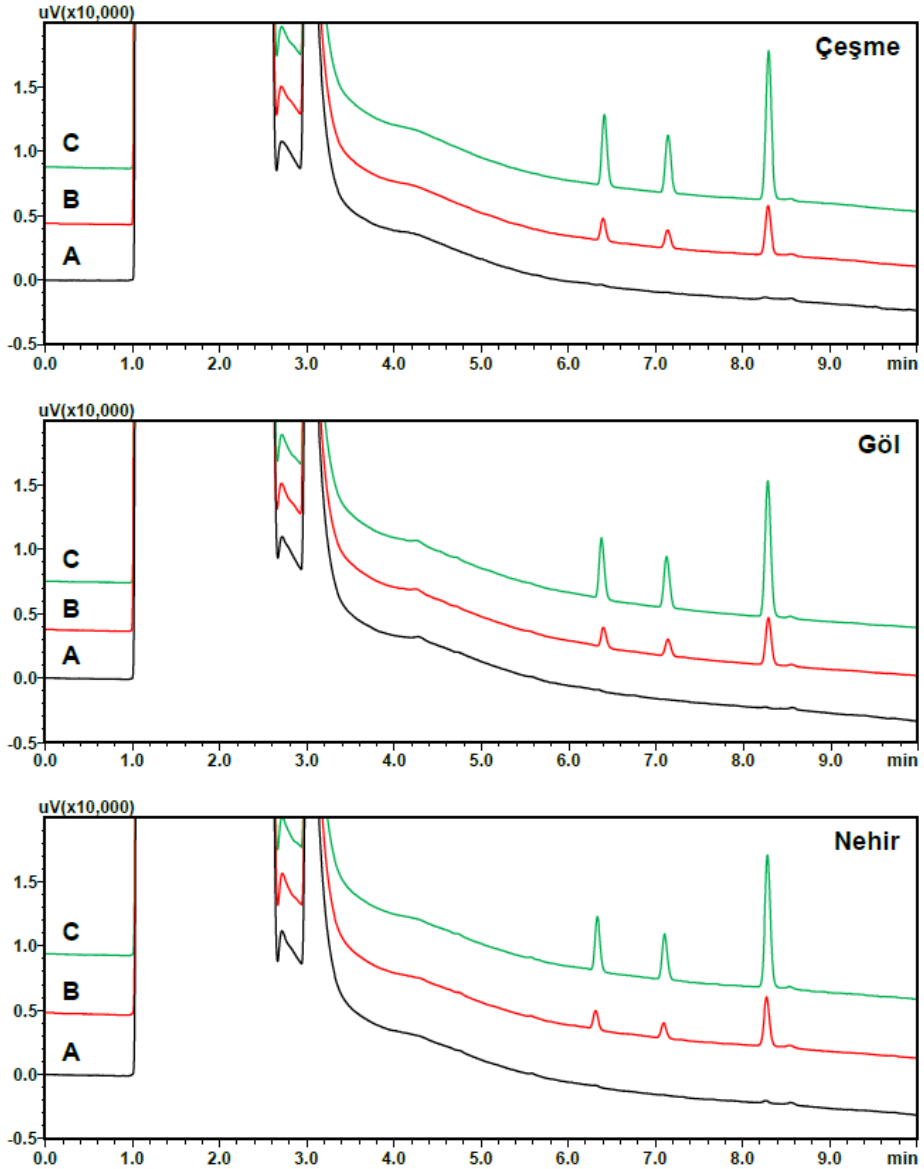
Gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik, üç konsantrasyon seviyesinde (25, 75 ve 150 µg/L) analit eklenmiş Değirmendere Nehri, Kalyan Gölü ve musluk suyu örnekleri analiz edilerek değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Nehir, göl ve musluk suyu örneklerinde ARB analizi için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk sonuçları

Analit	Nehir suyu				Muskuk suyu				Göl suyu			
	Eklenen (µg/L)	Bulunan (µg/L)	Doğruluk (%)	BSS (%)	Bulunan (µg/L)	Doğruluk (%)	BSS (%)	BSS (%)	Bulunan (µg/L)	Doğruluk (%)	BSS (%)	BSS (%)
IRBE	0	n.d.	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-	-	-
	25	24.07	96.3	3.3	23.5	94.1	2.7	2.7	24.8	99.3	2.3	2.3
	75	72.0	96.0	2.6	75.1	100.2	1.9	1.9	76.0	101.4	3.1	3.1
	150	146.3	97.5	3.4	157.2	104.8	2.8	2.8	154.4	103.0	3.2	3.2
LOS	0	n.d.	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-	-	-
	25	24.1	96.3	3.4	23.6	94.2	1.3	1.3	23.9	95.5	1.3	1.3
	75	72.4	96.5	2.0	74.6	99.4	1.8	1.8	75.8	101.0	2.7	2.7
	150	146.4	97.6	3.2	157.0	104.7	3.3	3.3	153.9	102.6	3.1	3.1
VALS	0	n.d.	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-	-	-
	25	25.6	102.6	0.4	23.8	95.0	2.6	2.6	25.1	100.3	0.7	0.7
	75	72.4	96.6	1.5	78.2	104.3	1.1	1.1	76.5	102.1	0.2	0.2
	150	147.1	98.1	1.5	152.3	101.6	1.1	1.1	156.0	104.0	1.0	1.0

n.d.- Saptanmadı (Not detected)

Seçicilik değerlendirme kapsamında, Şekil 28’de boş ve analit eklenmiş örneklere ait kromatogramlardan görüldüğü üzere tüm örnekler için analitlerin alıkonma sürelerinde matris bileşiklerinden kaynaklanan herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Spesifiklik ayrıca DAD ile pik saflıkları ölçülerek değerlendirilmiştir. Hesaplanabilir olduklarında, pik saflık indeksi değerleri 0.99’dan büyük bulunmuştur.



Şekil 28. Analiz edilen örneklere ait boş ve bilinen miktarda analit eklenmiş (spiked) kromatogramlar. (A) Analit eklenmemiş boş (blank) örnek, (B) Küçük kalite kontrol seviyesinde (25 µg/L) analit eklenmiş örnek ve (C) orta kalite kontrol seviyesinde (75 µg/L) analit eklenmiş örnek.

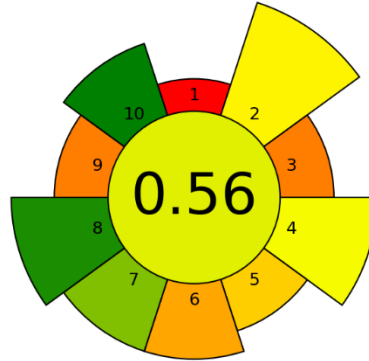
4.6. Yöntemin Gerçek Örnek Analizlerinde Uygulanması

Geliştirilen yöntemin gerçek matrislere uygulanabilirliği, Kalyan Gölü (Trabzon/Maçka), Değirmendere Nehri (Trabzon/Ortahisar) ve laboratuvarımızdan toplanan çeşme suyu örnekleri analiz edilerek değerlendirilmiştir. Örnekler amber renkli cam şişelere toplanmış ve laboratuvara getirildikten sonra süzgeç kağıdından süzölmüş ve analize kadar +4°C’de saklanmıştır. HCO_3^- ’in çökme üzerine etki etmesini önlemek için ortam pH’ı ekstraksiyondan önce 4’e ayarlanmıştır.

Örnek analizi, standart ekleme yöntemi ile yapılmıştır. Bu kapsamda her örneğe 5 farklı konsantrasyon seviyesinde (5, 10, 50, 100, 200 µg/L) standart çözeltiler ilave edilmiş ve 3 tekrarlı analizler yürütölmüştür. Toplanan su örneklerinde hiçbir ARB tespit edilememiştir.

4.7. Yeşillik Değerlendirmesi

Geliştirilen tam otomatik örnek hazırlama yönteminin yeşilliği AGREEprep yazılımı kullanılarak değerlendirilmiş ve yeşil kimya (GrC) ilkelerine kabul edilebilir ölçüde bağlılığı gösteren 0.56’lık bir puan elde edilmiştir (Şekil 29).



Şekil 29. AGREEprep metriği kullanılarak HPLC yönteminin yeşillik değerlendirilmesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

LDH'lara yüksek afinite göstermeyen ve kolay iyon değişimine olanak veren NO_3^- iyonlarına dayanan LDH'ların sentezlenmesi amacıyla LDH sentezinde metallerin NO_3^- tuzları kullanılmıştır. Diğer taraftan, çözelti içerisinde bulunan ve LDH'lara yüksek afinite gösteren CO_3^{2-} iyonlarının tamamen uzaklaştırılması için ısıtma ve inert atmosfer sağlanması gerekmektedir. Literatürde LDH'ların analitik uygulamalarında pH çoğunlukla NaOH kullanılarak ayarlanmıştır (12, 68, 72, 92–94). Diğer taraftan, LDH sentezinde alternatif olarak NH_3 'ın kullanımının NO_3^- iyonu içeren LDH'ların kolay sentezinde kullanılabileceği rapor edilmiştir (95). Bu kapsamda, ortam pH'nın ayarlamasında kullanılan baz tipinin ekstraksiyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Baz hacimleri ekstraksiyon sonrası pH birbirine yakın (8.5-9) olacak şekilde ayarlanmıştır. NaOH çözeltisi ile yürütülen deneylerde analitler zenginleştirilememiştir. Diğer taraftan, NH_3 kullanılarak yürütülen deneylerde pik alanları artmıştır. NH_3 , çözeltideki CO_3^{2-} iyonları ile kompleks oluşturmakta ve böylelikle NO_3^- temelli LDH'ların oluşmasına olanak vermektedir (95). Dolayısı ile, NH_3 kullanılarak elde edilen daha iyi zenginleştirme faktörleri, anyon değişimi kapasitesine sahip NO_3^- temelli LDH'ların sentezlenmesine atfedilebilir. Bu sonuçlar ışığında, pH ayarlanması için 1.5 mol/L NH_3 çözeltisi kullanılmıştır.

Tarama deneyleri yürütülürken, melamin filtrenin sentezlenen LDH'ların süzülmesinde tam etkinlik sergilemediği gözlemlenmiştir. Bu kapsamda, alternatif sistem konfigürasyonları incelenmiştir. LDH'ların örnek matrisinden ayrılması iki şekilde kolaylaştırılabilir: (1) sentezlenen LDH'ların agregasyona uğramaları sağlanarak partikül çapı büyütülebilir ve böylelikle daha kolay süzülebilirler, (2) şırınga yukarıdan aşağıya konumlandırılmak yerine, aşağıdan yukarıya konumlandırılabilir. Böylelikle, LDH'ların süzülmesi yerine, şırınga içerisinde sedimantasyona uğramaları sağlanabilir. Bu konumlandırmanın avantajı çökme tamamlandıktan sonra, örnek matrisinin hızlıca atığa yönlendirilebilmesidir. Dezavantajı ise, içeriye yerleştirilen karıştırma çubuğundan dolayı, şırınga içeriğinin tam olarak boşaltılmasının mümkün olmayışıdır. Literatürde, yük nötralizasyon etkisi ve elektrostatik çift tabakanın sıkışması nedeniyle iyonik şiddetin artırılmasının nanopartiküllerin negatif zeta potansiyelini azalttığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak, partiküller arasındaki daha zayıf elektrostatik itme kuvveti, daha büyük agregatların oluşmasına ve tuz çözeltilerinin eklenmesinin ardından daha yüksek bir sedimantasyon hızı elde edilmesine sebep olur (96, 97). Nitrat temelli LDH'lar yüksek iyon değiştirme

kapasitelerinden dolayı bu çalışmada tercih edilmiştir. Bu tip LDH'ların sentezlerinde, NO_3^- konsantrasyonunun artırılması için ortama NaNO_3 eklenmesi literatürde rapor edilmiştir (98, 99). Dolayısı ile, hem NO_3^- temelli LDH'ların sentezini kolaylaştırmak hem de iyonik şiddetin sedimentasyon üzerine etkisini incelemek için Ni-Fe çözeltisinden sonra 5 numaralı kafa valfi portu aracılığıyla şırınga içerisine derişik NaNO_3 (%60) çözeltisi aspire edilmesine karar verilmiştir. Şekil 16'dan da görüleceği üzere NaNO_3 aspirasyonu sedimentasyon hızını artırmıştır ve en yüksek sedimentasyon hızı, 200 μL NaNO_3 kullanıldığında elde edilmiştir. Ayrıca yöntem geliştirmenin ilerleyen basamaklarında, elüsyon çözücüsü için boş bir porta gereksinim duyulmuştur. Bu sebeple, NaNO_3 katısı prekürsör çözeltisi içerisinde çözülerek kullanılmıştır. Optimum prekürsör çözeltisi hacmi (600 μL), optimum NaNO_3 hacminin (200 μL) 3 katı olduğu için, prekürsör çözelti içindeki NaNO_3 konsantrasyonu %60'tan %20'ye düşürülmüştür.

Ortamda bulunan OH^- iyonları hem analitlerin iyonizasyonunu etkilediği hem de LDH yapısına katıldığı için ekstraksiyon verimini önemli oranda etkiler. Bu kapsamda, pH etkisi şırınga içerisine 120-400 μL aralığında değişen hacimlerde 1.5 mol/L NH_3 çözeltisi çekilerek incelenmiştir. Şekil 18'de görülebileceği üzere, pik alanları 180 μL seviyesine kadar artmış, daha sonra azalmıştır. Bu durum yüksek pH'larda hidroksit iyonlarının LDH yapısına katılmak için analitler ile yarışmasına atfedilebilir (72, 74, 99, 100). Sonuç olarak optimum NH_3 hacmi ve ekstraksiyon pH'ı sırası ile 180 μL ve 7.7 olarak bulunmuştur.

LDH miktarının ARB'lerin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisini araştırmak için, 400-1000 μL aralığında öncül çözeltisi şırınga içerisine çekilerek ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. 400 ve 1000 μL prekürsör hacmi için son ekstrakt hacimleri sırası ile 300 ve 455 μL olarak bulunmuştur. Dolayısı ile, pik alanlarında gözlemlenen düşüş, analitlerin son çözelti içerisinde seyrelmesine bağlanabilir. Sonuç olarak öncül hacminin LDH'ların sedimentasyonu üzerine etkisi incelendiğinde, Şekil 19'da görüldüğü üzere en iyi çökmenin 600-800 μL hacimlerde olduğu gözlemlenmiştir.

Karıştırma hızı, sorbentin örnek içerisinde dispersiyon derecesini önemli ölçüde etkilemektedir. Yüksek karıştırma hızlarında, daha küçük çaplı LDH partiküllerinin oluşması muhtemeldir. Daha küçük partiküller, artan yüzey alanı nedeniyle daha yüksek ekstraksiyon verimliliği sağlayabilir. Öte yandan, şırınga girişine yerleştirilen filtre çok küçük partikülleri etkili bir şekilde tutamayabilir. Karıştırma işlemi, aynı zamanda analitin örnekten adsorbana kütle transferini de kolaylaştırabilir (101). Karıştırma hızının ekstraksiyon üzerindeki etkisi

1200, 2900 ve 4500 rpm hızlarında değerlendirilmiştir ve en iyi çökme hızı ve pik alanları 1200 rpm’de elde edilmiştir.

LDH’lar, örnek içerisinde *in situ* olarak oluşturulduğundan dolayı temas alanı çok büyüktür. Bu durum, teoride ekstraksiyonunun kısa süre içerisinde tamamlanabileceğini işaret etmektedir. Bu kapsamda, ekstraksiyon süresinin pik alanları üzerine etkisi 30-720 sn aralığında incelenmiştir ve Şekil 23’te de görüldüğü üzere benzer pik alanları elde edildiğinden dolayı ekstraksiyon süresi 30 sn seçilmiştir. Ayrıca ekstraksiyonun kısa sürede tamamlanıyor oluşu, gerekli görüldüğünde şırınga içerisine ardışık olarak birkaç kez örnek çekilmesi ile daha yüksek zenginleştirme faktörlerinin elde edilebilmesine olanak vermesi sebebiyle de avantajlıdır.

LDH yapısını bozmak için çeşitli çözücü bileşimleri denenmiştir ve en yüksek pik alanı %20 metanol içeren formik asit çözeltisinde elde edilmiştir. Belirtilmelidir ki, %20 metanol içeren formik asit çözeltisinin bir diğer avantajı ise daha düzgün kromatografik taban çizgisi (baseline) elde edilmesidir.

Elüsyon çözücüsünün seçilmesinin ardından LIS sisteminin HPLC sistemine online bağlanması amaçlanmıştır. Bu noktaya kadar, DMSPE’nin ardından örnek matrisi ve LDH’lar bir deney tüpünde toplanmış ve santrifüj işleminin ardından LDH’lar ayrılıp, manuel olarak çözülmüştür. Online bağlantı için LDH’ların şırınga içerisindeyken matristen uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için, şırınga girişine bir melamin filtre yerleştirilerek örnek matrisinin uzaklaştırılması planlanmıştır. Diğer taraftan birçok farklı üreticiden alınan melamin köpükler denenmiş ancak LDH filtreleme etkinliklerinin zayıf olduğu bulunmuştur. Filtreleme için adi süzgeç kâğıdı, makyaj süngeri, pamuk, cam pamuğu gibi diğer malzemeler de denenmiş ancak istenen filtrasyon etkinliğine ulaşamamıştır. Sonuçlar, LDH’ların örnek matrisinden ayrılması için çok küçük por çaplı filtrelerin kullanılması gerektiğini göstermiştir. Diğer taraftan, şırınga girişinin yüzey alanının çok küçük olmasından dolayı, bu filtreler hızlıca tıkanmış ve basınç problemleri ortaya çıkmıştır. Belirtilmelidir ki, şırınga tipi otomatik pompalar 10 bar basınca kadar çalışabilmektedirler ve düşük por çaplı membran filtrelerin kullanımı bu sebeple uygun bulunmamıştır. Bu noktada, aşağıdan-yukarıya şırınga oryantasyonunun kullanılmasının daha problemsiz bir LDH ayırımına olanak tanıyabileceği düşünülmüştür. Yapılan deneylerde, ekstraksiyondan sonra 120 sn beklenmesi sonucunda LDH’ların stabil bir yığın halinde şırınga dibinde biriktiği gözlenmiştir. Dolayısı ile ekstraksiyondan sonra 1-2 dakikalık bir bekleme süresi

sonrasında örnek matrisinin atığa yönlendirilmesi mümkündür. Diğer taraftan LDH'lar bir bulamaç halinde dipte toplandıklarından dolayı örnek matrisinin tam olarak uzaklaştırılması mümkün olmamıştır. Bunun için, şırınga içerisine iki defa saf su çekilmiş, LDH'lar yıkanmış, çökmeleri beklenmiş ve üstte kalan sıvı tekrar atığa yönlendirilmiştir. Böylelikle hem matris büyük oranda uzaklaştırılmış hem de bir temizleme basamağı yönteme entegre edilmiştir. Son yıkamanın ardından şırınga içerisine 200 µL elüsyon çözücüsü çekilip LDH'lar çözölmüş ve ekstrakt 10 portlu enjeksiyon valfine bağlı olan enjeksiyon döngüsüne (loop'a) transfer edilmiştir.

LIS sistemi içinde gerçekleştirilen DMSPE prosedürüne ve LDH elüsyonuna ilişkin uygulama aşamaları, bağlantıda yer alan videoda gösterilmektedir: <https://www.youtube.com/watch?v=vtqr5kLiP14>.

Şırınganın aşağıdan-yukarı yönde kullanılmasında, LDH'lar sıvıdan tamamen uzaklaştırılmadığı için bir seyrelme meydana gelmekte ve bu durum yöntem duyarlılığını olumsuz etkilemektedir. Yöntem duyarlılığını artırmak için yüksek hacimli enjeksiyon yapılması yaklaşımı değerlendirilmiştir. Sıvı kromatografisinde, eğer örnek, hareketli faz içeriğinden daha zayıf bir çözücüde çözölmüşse yüksek hacimlerde enjeksiyon yapılması mümkündür (102, 103). Tez kapsamında analizi yapılan ARB'ler oldukça lipofilik yapıdadır ve gradient analiz görece yüksek oranda (%20) asetonitril ile başlamaktadır. Bu kapsamda, son elde edilen ekstraktın organik çözücü yüzdesinin az oluşundan faydalanılarak ve gradient analizin başına bir izokratik tutuş (%20 ACN) koyularak yüksek hacimde enjeksiyon yapılması planlanmıştır. Yüksek hacimli enjeksiyon için göz önünde bulundurulması gereken parametrelerden biri de kolonun yükleme kapasitesidir. Optimizasyon çalışmalarında yüksek kromatografik etkinlik sağlamasından dolayı Poroshell 120 PFP (100 mm x 4.6 mm, 2.7 µm) kolon tercih edilmiştir. Diğer taraftan, çekirdek-kabuk (core-shell) partiküller daha az gözenekliliğe sahiptir, bu da birim kütle başına daha az analit tuttukları ve daha düşük yükleme kapasitesine sahip oldukları anlamına gelir. Diğer taraftan, tamamen gözenekli partiküller büyük ulaşılabilir yüzey alanı sunarak daha fazla analit tutma ve dolayısıyla daha yüksek yükleme kapasitesi sağlar (104). Bu kapsamda, ilerleyen deneylerde GLSciences ODS-V3 kolon (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) analitik kolon olarak kullanılmıştır.

Hareketli faz olarak %0.1 formik asit ve asetonitril kullanıldığında ve 0-15 dk, %20-100 ACN gradientinde tüm ARB'ler için kabul edilebilir bir ayırım sağlanmıştır. Bu şartlar

altında kolonu en geç terk eden bileşiğin CANDE olduğu ve alıkonma süresinin 10.5 dk'dan az olduğu görülmüştür. Bu sebeple gradient eğimini koruyarak (%5.33 asetonitril/dk) analiz süresinin kısaltılması amaçlanmıştır.

Çevresel örneklerin ayırımı sırasında, örnek içerisindeki güçlü tutulan bileşikler, kolonun kirlenmesine sebep olarak performansını düşürebilir. Bu durum ayrıca ardışık analizlerde kromatogramlarda beklenmeyen piklerin oluşmasına neden olarak sonuçların yanlış yorumlanmasına yol açabilir (105). Bunun önüne geçmek için gradiente kolon temizleme ve kolon şartlandırma basamakları da eklenmiştir. Sonuç olarak analiz süresi 16 dk olarak belirlenmiştir. Optimum şartlar şu şekildedir: 0 dk, %20 B; 1 dk, %20 B; 8 dk, %100 B; 9 dk, %100 B; 10 dk, %20 B; 16 dk, %20 B.

Geliştirilen yöntemin ARB'lerin analizinde performansını değerlendirmek için yapılan validasyon çalışmalarında, elde edilen kalibrasyon eğrisinin r değerlerinin 0.9988'den büyük olması yöntem doğrusallığını kanıtlamıştır. Yöntem doğrusallığının sağlamasını yapmak amacıyla kalibrasyon eğrisini oluşturmak için kullanılan standart çözeltilerin pik alanları, kalibrasyon eğrisine yerleştirilmiş ve bu verilerle hesaplanan konsantrasyonlar, gerçek konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilerek bir eğri elde edilmiştir. Bu eğrinin r değerinin >0.9977 olması yöntem doğrusallığını kanıtlamıştır.

Analitlerin LOD değerleri 1-1.5 µg/L aralığında bulunmuştur. ARB'lerin çevresel sularda 10 µg/L konsantrasyona kadar bulunabildikleri göz önüne alındığında (7), geliştirilen yöntem yeterli duyarlılık göstermiştir.

Doğruluk ve kesinlik çalışmaları, gün içi ve günler arası olarak tek konsantrasyon seviyesinde yürütülen deneylerle değerlendirilmiştir. Tüm analitler için gün içi ve günler arası doğruluk sırasıyla %100.8-102.2 ve %98.5-100.5 arasında değişmiştir. Gün içi BSS %0.33-2.5, günler arası BSS %3.7-5.3 olmakla birlikte yöntem tekrarlanabilirliği kabul edilebilir bulunmuştur (106).

Örneğin sisteme direkt enjeksiyonu ve LDH oluşumundan sonra üstte kalan sıvının direkt enjeksiyonu sonucunda pik alanındaki azalma ile geri kazanım, geliştirilen DMSPE yönteminin uygulanması ve DMSPE yönteminin kullanılan kimyasallar yerine su çekilmesi ile uygulanması sonucu elde edilen pik alanlarının karşılaştırılması ile de zenginleştirme faktörü hesaplanmıştır. Tüm analitler için %62-88.7 aralığında iyi geri kazanım değerleri ve 13.3-25.8 aralığında iyi zenginleştirme faktörleri elde edilmiştir. FDA'nın 2022 yılında yayımladığı M10 Biyoanalitik Yöntem Validasyonu kılavuzuna göre, analitin geri kazanımı

%100 olmak zorunda değildir; ancak analit için geri kazanımın tutarlı olması beklenmektedir (106). Bu bağlamda, elde edilen geri kazanım değerleri kabul edilebilir bulunmuştur.

Gerçek örneklerin analizinde matris kaynaklı 2 zorlukla karşılaşmıştır. İlk olarak, LDH'ların sedimentasyonunun standart çözeltilere kıyasla daha az olduğu ve dolayısı ile şırınga dibindeki LDH katmanının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu duruma gerçek örneklerde yüksek konsantrasyonlarda bulunabilecek iyonların sebep olabileceği düşünülmüştür. Dolayısı ile, Na^+ (400 mg/L), K^+ (16 mg/L), Ca^{+2} (240 mg/L), Mg^{+2} (240 mg/L), Cl^- (16 mg/L), HCO_3^- (400 mg/L) ve SO_4^{-2} (480 mg/L) iyonları ayrı ayrı deiyonize suda hazırlanmış standartlara eklenerek sedimentasyon üzerine etkileri görsel olarak incelenmiştir. İyon konsantrasyonlarına sert su reçetesi göz önünde bulundurularak karar verilmiştir (79). İncelenen anyonlar arasında sadece HCO_3^- 'nin çökme üzerine etkisi olduğu bulunmuştur. Bu sebeple, ortam pH'ı ekstraksiyondan önce 4'e ayarlanmıştır ve böylelikle HCO_3^- 'in, H_2CO_3 formunda kalarak çökme üzerine etki etmesi önlenmiştir.

Gerçek örneklerin analizinde karşılaşılan bir diğer olumsuzluk ise, deiyonize suda hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanıldığında düşük geri kazanım elde edilmesi olmuştur. Çevresel örnekler hem farklı iyonik şiddete hem de farklı matris bileşimine sahiptir. Bu bağlamda, gerçek örnek matrisini temsil etmesi için kalibrasyon çözeltileri sert su içerisinde hazırlanmıştır (79). Ancak yüksek doğruluk elde edilememiştir. Dolayısı ile, örnek analizinin standart ekleme yöntemi ile yapılmasına karar verilmiştir. Bu kapsamda her örneğe 5 farklı konsantrasyon seviyesinde (5, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/L}$) standart çözeltiler ilave edilmiş ve 3 tekrarlı analizler yürütülmüştür. Toplanan su örneklerinde hiçbir ARB tespit edilememiştir.

Çevresel örneklerde gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik, üç konsantrasyon seviyesinde (25, 75 ve 150 $\mu\text{g/L}$) analit eklenmiş Değirmendere Nehri, Kalyan Gölü ve musluk suyu örnekleri analiz edilerek değerlendirilmiştir. Elde edilen doğruluk değerleri %94-105 aralığında olup kabul edilebilir bulunmuştur. Tam otomasyon sebebi ile, deneylerin bağıl standart sapması %3.5'i geçmemiştir.

Analit eklenmiş nehir, göl ve musluk suyu örneklerine ait kromatogramlar (Şekil 28) incelendiğinde, tüm örnekler için analitlerin alıkonma sürelerinde matris bileşiklerinden kaynaklanan herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Ayrıca DAD ile pik saflıkları ölçülmüştür ve hesaplanabilir olduklarında pik saflık indeksi değerleri 0.99'dan büyük bulunmuştur. Bu veriler, geliştirilen yöntemin ARB'ler için spesifik olduğunu ve tespit edilen piklerin birden fazla bileşiğe atfedilemeyeceğini göstermektedir.

AGREEprep, kimyasal analizlerde örnek hazırlama sürecinin çevresel etkisini değerlendirmek için geliştirilmiş bir "yeşil kimya" metriğidir. Bu araç, çözücü seçimi, enerji tüketimi, atık üretimi ve kullanılan malzemelerin sürdürülebilirliği gibi on farklı kriterle dayalı bir değerlendirme yapar. Her bir kriter, 0 ile 1 arasında bir puanla ölçülür ve sonuçlar, genel çevresel performansı ve iyileştirme alanlarını görselleştiren bir piktograf ile sunulur (88). Geliştirilen tam otomatik örnek hazırlama yönteminin yeşilliği AGREEprep yazılımı kullanılarak değerlendirilmiş ve GrC ilkelerine kabul edilebilir ölçüde bağlılığı gösteren 0.56'lık bir puan elde edilmiştir.

Tez kapsamında geliştirilen tam otomatik LIS-DMSPE yöntemi, ARB'lerin analizine yönelik literatürde bildirilen bazı örnek hazırlama yaklaşımlarıyla (Tablo 11) analitik performans parametreleri açısından karşılaştırıldı. Karşılaştırmadan görüldüğü üzere geliştirilen yöntemin tam otomasyonu, manuel yöntemlerde sıkça karşılaşılan operatöre bağlı değişkenliği ortadan kaldırmakta ve sabit ekstraksiyon koşullarını koruyarak yüksek tekrarlanabilirliğe sahip sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. LIS-DMSPE yöntemi, UPLC-MS/MS gibi düşük LOQ değerlerine ulaşabilen tekniklere (7) kıyasla daha düşük hassasiyete sahip olsa da, MS gibi yüksek donanım ve maliyet gerektiren sistemlere göre daha basit ve ekonomik bir yöntemdir. Literatürde bildirilen bazı yöntemler 2 dakika gibi çok kısa örnek hazırlama süreleri sunsa da, bu yöntemler genellikle birkaç saat sürebilen çok adımlı sorbent sentezi gerektirir (47, 107). Hazır SPE kartuşları kullanan yöntemler (7) daha hızlı olmakla birlikte, bunlar da dış tedarikçilere olan bağımlılığı artırabilir. Tez kapsamında geliştirilen yöntemde ise sorbent sentezi ve ekstraksiyon tek adımda gerçekleştirilir ve işlem 15 dakika içinde tamamlanır. Bu entegre sistem, hız, tekrarlanabilirlik ve kullanıcıdan bağımsız çalışma imkânı sunarak rutin uygulamalara uygunluğu artırmaktadır. Büyük hacimli enjeksiyona bağlı olarak, geliştirilen yöntem, UV ve DAD dedektörlü diğer yöntemlerle (43, 107, 108) karşılaştırıldığında daha yüksek hassasiyet sergilemektedir.

Tablo 11. ARB'lerin analizine yönelik literatürde bildirilen bazı örnek hazırlama yaklaşımları

Analitler	Örnek	Ekstraksiyon Yöntemi	Enstrümental Yöntem	Örnek Hazırlama Süresi	Geri Kazanım (%)	Kesinlik (%BSS)	LOQ (µg/L)	Kaynak
EPRO, LOS, IRBE, CANDE, TELMI, VALS	Çevresel su örnekleri	Karışık mod SPE	UPLC-MS/MS	-	88 – 135	<18	0.002 – 0.05	(7)
VALS, LOS	Çevresel su ve biyolojik örnekler	MWCNT (kitosan ile işlevselleştirilmiş) – SPME	HPLC-UV	43 dakika	91.8 – 97.8	<4.10	3.1 – 3.4	(43)
LOS	Biyolojik örnek	RACNT ile doldurulmuş ekstraksiyon kolonu	UHPLC-MS/MS	2 dakika	94.9 – 112.4	<7.5	14.26	(47)
LOS	Çevresel su	MOFCu@GO – DMSPE	HPLC-UV	>11 dakika	99 – 101	0.75	80	(108)
VALS	Çevresel su, biyolojik örnek ve tablet dozaj formları	MIONP – DSPE	HPLC-DAD	>8 dakika	67 – 102	<3.8	6.7	(107)
LOS, VALS, IRBE	Çevresel su örnekleri	LDH – DMSPE	HPLC-DAD	15 dakika	62 – 88.7	<3.5	3 – 4.5	Bu tez çalışması

Örnek hazırlama basamağının otomasyonu, gerekli iş gücü ve zamanın azaltılmasıyla birlikte daha yüksek yöntemsel tekrarlanabilirlik, güvenilirlik ve kullanım güvenliği elde edilmesi açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Bu bağlamda geliştirilen yöntem otomasyon, enerji tüketimi ve operatör güvenliği başlıkları bakımından öne çıkmaktadır. Prosedürün tamamen otomatik olarak yürütülmesi ve çevrim içi HPLC bağlantısı yöntem tekrarlanabilirliğini artırmakta ve insan hatasını minimize etmektedir. Otomasyon ayrıca, işlem sırasında operatörün tehlikeli kimyasal maddelere temasını minimize ettiğinden dolayı, geliştirilen yöntem laboratuvar çalışanlarının güvenliği için ideal bir alternatif olarak görülebilir. Örnek hazırlama işleminin küçük bir şırınga tipi pompa ile yürütülmesinden dolayı, yöntem enerji verimliliği açısından da oldukça başarılıdır.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, çevresel su örneklerinde ARB'lerin (LOS, VALS, IRBE) tayini için ilk kez LIS otomasyon tekniği kullanılarak *in situ* LDH sentezine dayanan bir DMSPE yöntemi geliştirilmiş, valide edilmiş ve HPLC'ye çevrim içi bağlanarak tam otomasyon sağlanmıştır.

Kolon temizleme ve şartlandırma adımları da dahil olmak üzere toplam kromatografik analiz süresi 16 dakikadır. Çevresel su örneklerinin analize hazırlanmasında hızlı, basit ve ekstraksiyon etkinliği yüksek olan DMSPE yöntemi kullanılmıştır. DMSPE yöntemi LDH öncül tipi, LDH hacmi, iyonik şiddet, NH₃ hacmi, karıştırma hızı, ekstraksiyon süresi, elüsyon çözücü bileşimi ve hacmi parametrelerine göre optimize edilmiştir. Optimizasyondan sonra LIS sistemi HPLC'ye çevrim içi olarak başarıyla bağlanmıştır. Bu şekilde analitlerin cihaza daha yüksek verimlilikte transferi sağlanmış olup daha yüksek yöntem duyarlılığı elde edilmiştir. Validasyon çalışmaları sonucunda geliştirilen tam otomatik yöntemin kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlik ve yeterli duyarlılık gösterdiği görülmüştür. Yöntemin uygulanabilirliği Değirmendere Nehri, Kalyan Gölü ve musluk suyu örnekleri analiz edilerek kanıtlanmıştır. Ayrıca örnek analizlerinde temiz kromatogramların elde edilmesi yöntemin spesifikliğini kanıtlamıştır. Yöntem, yeşil analitik kimya açısından değerlendirildiğinde de başarı ölçütü tutturulmuştur (>0.5). Genel olarak, geliştirilen LIS-DMSPE-HPLC-DAD yöntemi, çevresel sulardaki ilaç kalıntılarının rutin olarak izlenmesi için önemli bir potansiyel göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Zheng M-H, Li F-X-Z, Xu F, Lin X, Wang Y, Xu Q-S, Guo B, Yuan L-Q (2020). The Interplay Between the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Parathyroid Hormone. *Frontiers in Endocrinology* 11: 539.
2. Carey RM, Jin X-H, Siragy HM (2001). Role of the angiotensin AT2 receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications. *American Journal of Hypertension* 14: 98-102.
3. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, et al. (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *European Heart Journal* 39: 3021–3104.
4. Kreutz R, Brunström M, Burnier M, Grassi G, Januszewicz A, Muiesan ML, Tsoufis K, de Pinho RM, Albini FL, Boivin J-M, et al. (2024). 2024 European Society of Hypertension clinical practice guidelines for the management of arterial hypertension. *European Journal of Internal Medicine* 126: 1–15.
5. Iversen DB, Andersen NE, Dalgård Dunvald A-C, Pottegård A, Stage TB (2022). Drug metabolism and drug transport of the 100 most prescribed oral drugs. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 131: 311–324.
6. Fuentes A V, Pineda MD, Venkata KCN (2018). Comprehension of Top 200 Prescribed Drugs in the US as a Resource for Pharmacy Teaching, Training and Practice. *Pharmacy* 6: 43.
7. Castro G, Rodríguez I, Ramil M, Cela R (2019). Selective determination of sartan drugs in environmental water samples by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 224: 562–571.
8. Li N, Zhang T, Chen G, Xu J, Ouyang G, Zhu F (2021). Recent advances in sample preparation techniques for quantitative detection of pharmaceuticals in biological samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 142: 116318.
9. Ghorbani M, Aghamohammadhassan M, Chamsaz M, Akhlaghi H, Pedramrad T (2019). Dispersive solid phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 118: 793–809.
10. Chisvert A, Cárdenas S, Lucena R (2019). Dispersive micro-solid phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 112: 226–233.

11. López-Lorente ÁI, Pena-Pereira F, Pedersen-Bjergaard S, Zuin VG, Ozkan SA, Psillakis E (2022). The ten principles of green sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 148: 116530.
12. Yang Y, Zhang J, Li Y, Yin S, Jiang Y, Sun C (2021). Determination of seven tetracyclines in milk by dissolvable layered double hydroxide-based solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytical Methods* 13: 1618–1624.
13. Grover A, Mohiuddin I, Lee J, Brown RJC, Malik AK, Aulakh JS, Kim K-H (2022). Progress in pre-treatment and extraction of organic and inorganic pollutants by layered double hydroxide for trace-level analysis. *Environmental Research* 214: 114166.
14. Horstkotte B, Solich P (2020). The Automation Technique Lab-In-Syringe: A Practical Guide. *Molecules* 25: 1612.
15. González A, Avivar J, Maya F, Palomino Cabello C, Turnes Palomino G, Cerdà V (2017). In-syringe dispersive μ -SPE of estrogens using magnetic carbon microparticles obtained from zeolitic imidazolate frameworks. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409: 225–234.
16. Gemuh CV, Macháček M, Solich P, Horstkotte B (2022). Renewable sorbent dispersive solid phase extraction automated by Lab-In-Syringe using magnetite-functionalized hydrophilic-lipophilic balanced sorbent coupled online to HPLC for determination of surface water contaminants. *Analytica Chimica Acta* 1210: 339874.
17. Moe Htet TT, Gemuh CV, Yıldırım S, Sklenářová H, Solich P, Horstkotte B (2025). Lab-in-syringe automated dispersive solid-phase microextraction of alkylphenols coupled online to liquid chromatography using iron (III) thenoyltrifluoroacetate as dissolvable sorbent. *Analytica Chimica Acta* 1345: 343764.
18. Maya F, Palomino Cabello C, Estela JM, Cerdà V, Turnes Palomino G (2015). Automatic In-Syringe Dispersive Microsolid Phase Extraction Using Magnetic Metal–Organic Frameworks. *Analytical Chemistry* 87: 7545–7549.
19. Mancia G, Kreutz R, Brunström M, Burnier M, Grassi G, Januszewicz A, Muiesan ML, Tsioufis K, Agabiti-Rosei E, Algharably EAE, et al. (2023). 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension: Endorsed by the International Society of Hypertension (ISH) and the European Renal Association (ERA). *Journal of Hypertension* 41: 1874-2071.

20. Obezite Diyabet Hipertansiyon Çalışma Grubu (2022). Hipertansiyon Tanı ve Tedavi Kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, Ankara.
21. Liu Y-H, Chen S-C, Lee W-H, Chen Y-C, Hsu P-C, Tsai W-C, Lee C-S, Lin T-H, Hung C-H, Kuo C-H, et al. (2022). Prognostic Factors of New-Onset Hypertension in New and Traditional Hypertension Definition in a Large Taiwanese Population Follow-up Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19: 16525.
22. Zhang R, Yin H, Yang M, Lei X, Zhen D, Zhang Z (2023). Advanced Progress of the Relationship Between Antihypertensive Drugs and Bone Metabolism. *Hypertension* 80: 2255–2264.
23. Moore CL, Henry DS, McClenahan SJ, Ball KK, Rusch NJ, Rhee SW (2021). Metoprolol Impairs β 1-Adrenergic Receptor-Mediated Vasodilation in Rat Cerebral Arteries: Implications for β -Blocker Therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 376: 127–135.
24. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O, et al. (2014). 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults: Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 311: 507–520.
25. Laurent S (2017). Antihypertensive drugs. *Pharmacological Research* 124: 116–125.
26. Sica DA, Carter B, Cushman W, Hamm L (2011). Thiazide and Loop Diuretics. *The Journal of Clinical Hypertension* 13: 639–643.
27. Lee EM (2023). Calcium channel blockers for hypertension: Old, but still useful. *Cardiovascular Prevention and Pharmacotherapy* 5: 113–125.
28. te Riet L, van Esch JHM, Roks AJM, van den Meiracker AH, Danser AHJ (2015). Hypertension. *Circulation Research* 116: 960–975.
29. Cheung BMY (2006). Therapeutic potential of angiotensin receptor blockers in hypertension. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 15: 625–635.
30. Ma TKW, Kam KKH, Yan BP, Lam Y-Y (2010). Renin–angiotensin–aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *British Journal of Pharmacology* 160: 1273–1292.
31. Sayer G, Bhat G (2014). The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Heart Failure. *Cardiology Clinics* 32: 21–32.

32. Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, et al. (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *The Lancet* 359: 995–1003.
33. Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, Hua T, Laragh J, McInnes GT, Mitchell L, et al. (2004). Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *The Lancet* 363: 2022–2031.
34. Sica DA, Gehr TWB, Ghosh S (2005). Clinical Pharmacokinetics of Losartan. *Clinical Pharmacokinetics* 44: 797–814.
35. Siddiqui N, Husain A, Chaudhry L, Alam MS, Mitra M, Bhasin PS (2011). Pharmacological and pharmaceutical profile of valsartan: a review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 12–19.
36. Virani P, Sojitra R, Raj H, Jain V (2015). Development and validation of analytical method for Irbesartan and atorvastatin by simultaneous equation spectroscopic method. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology* 7: 98–102.
37. Croom KF, Curran MP, Goa KL, Perry CM (2004). Irbesartan. *Drugs* 64: 999–1028.
38. Asif Husain MSAMM and PSB (2011). A Review on Candesartan: Pharmacological and Pharmaceutical Profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01: 12–17.
39. Mendis B, and Page SR (2009). Candesartan: widening indications for this angiotensin II receptor blocker? *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 10: 1995–2007.
40. Giebułtowiec J, Stankiewicz A, Wroczyński P, Nałęcz-Jawecki G (2016). Occurrence of cardiovascular drugs in the sewage-impacted Vistula River and in tap water in the Warsaw region (Poland). *Environmental Science and Pollution Research* 23: 24337–24349.
41. Santos LHMLM, Gros M, Rodriguez-Mozaz S, Delerue-Matos C, Pena A, Barceló D, Montenegro MCBSM (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of The Total Environment* 461–462: 302–316.
42. Marghany KA, Abdelsalam RA, Haddad GM (2020). HPLC method transfer study for simultaneous determination of seven angiotensin II receptor blockers. *Journal of Separation Science* 43: 1398–1405.

43. Ansari Mohseni A, Ebrahimi M, Beyramabadi S (2025). Development of a disposable hollow fibre-solid phase microextraction device using chitosan functionalised MWCNTs and a polyoxometalate for the simultaneous extraction of angiotensin II receptor blocker drugs. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 105: 245-260.
44. Li R, Liang C, Svendsen SB, Kisielius V, Bester K (2023). Sartan blood pressure regulators in classical and biofilm wastewater treatment – Concentrations and metabolism. *Water Research* 229: 119352.
45. Montemurro N, Postigo C, Lonigro A, Perez S, Barceló D (2017). Development and validation of an analytical method based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection for the simultaneous determination of 13 relevant wastewater-derived contaminants in lettuce. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409: 5375–5387.
46. e Souza MAC, Reis NFA, da Silva Leite IM, Gloria MBA, Pianetti GA, Parreiras Martins MA, de Oliveira Pacheco ICP, Fernandes C (2020). A simple and sensitive HPLC-FL method for simultaneous determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 188: 113403.
47. de Faria HD, Bueno CT, Krieger JE, Krieger EM, Pereira AC, Santos PCJL, Figueiredo EC (2017). Online extraction of antihypertensive drugs and their metabolites from untreated human serum samples using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system. *Journal of Chromatography A* 1528: 41–52.
48. Farahani A, Azimi S, Tajaddodi A, Docoslis A, Tashakori C (2021). Screen-printed anion-exchange solid-phase extraction: A new strategy for point-of-care determination of angiotensin receptor blockers. *Talanta* 222: 121518.
49. Shaikh JSA, Raut S, Abdul A, Pathan MAAK (2020). High performance liquid chromatographic assay of amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide simultaneously and its application to pharmaceuticals, urine and plasma analysis. *Journal of Chromatography B* 1155: 122295.
50. Ebeid WM, Elkady EF, El-Zaher AA, El-Bagary RI, Patonay G (2014). Synchronized separation of seven medications representing most commonly prescribed antihypertensive classes by using reversed-phase liquid chromatography: Application for analysis in their combined formulations. *Journal of Separation Science* 37: 748–757.

51. Kanu AB (2021). Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. *Journal of Chromatography A* 1654: 462444.
52. Li N, Zhang T, Chen G, Xu J, Ouyang G, Zhu F (2021). Recent advances in sample preparation techniques for quantitative detection of pharmaceuticals in biological samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 142: 116318.
53. Buszewski B, Szultka M (2012). Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 42: 198–213.
54. Szultka M, Pomastowski P, Railean-Plugaru V, Buszewski B (2014). Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis. *Journal of Separation Science* 37: 3094–3105.
55. Sajid M, Basheer C (2016). Layered double hydroxides: Emerging sorbent materials for analytical extractions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 75: 174–182.
56. Maya F, Palomino Cabello C, Ghani M, Turnes Palomino G, Cerdà V (2018). Emerging materials for sample preparation. *Journal of Separation Science* 41: 262–287.
57. Ghani M, Palomino Cabello C, Saraji M, Manuel Estela J, Cerdà V, Turnes Palomino G, Maya F (2018). Automated solid-phase extraction of phenolic acids using layered double hydroxide–alumina–polymer disks. *Journal of Separation Science* 41: 2012–2019.
58. Abdallah IA, Hammad SF, Bedair A, Abdelhameed RM, Locatelli M, Mansour FR (2023). Applications of layered double hydroxides in sample preparation: A review. *Microchemical Journal* 192: 108916.
59. Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International* 86: 412–431.
60. Fedotov PS, Malofeeva GI, Savonina EYu, Spivakov BYa (2019). Solid-Phase Extraction of Organic Substances: Unconventional Methods and Approaches. *Journal of Analytical Chemistry* 74: 205–212.
61. Ścigalski P, Kosobucki P (2020). Recent Materials Developed for Dispersive Solid Phase Extraction. *Molecules* 25: 4869.
62. Khezeli T, Daneshfar A (2017). Development of dispersive micro-solid phase extraction based on micro and nano sorbents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 89: 99–118.

63. Sajid M, Nazal MK, Ihsanullah I (2021). Novel materials for dispersive (micro) solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples: A review. *Analytica Chimica Acta* 1141: 246–262.
64. Tsai W-H, Huang T-C, Huang J-J, Hsue Y-H, Chuang H-Y (2009). Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A* 1216: 2263–2269.
65. Ghorbani M, Aghamohammadhassan M, Ghorbani H, Zabihi A (2020). Trends in sorbent development for dispersive micro-solid phase extraction. *Microchemical Journal* 158: 105250.
66. Ghani M, Frizzarin RM, Maya F, Cerdà V (2016). In-syringe extraction using dissolvable layered double hydroxide-polymer sponges templated from hierarchically porous coordination polymers. *Journal of Chromatography A* 1453: 1–9.
67. Tang S, Yao Y, Chen T, Kong D, Shen W, Lee HK (2020). Recent advances in the application of layered double hydroxides in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta* 1103: 32–48.
68. Sansuk S, Nanan S, Srijaranai S (2015). New eco-friendly extraction of anionic analytes based on formation of layered double hydroxides. *Green Chemistry* 17: 3837–3843.
69. Sharma R, Arizaga GGC, Saini AK, Shandilya P (2021). Layered double hydroxide as multifunctional materials for environmental remediation: from chemical pollutants to microorganisms. *Sustainable Materials and Technologies* 29: e00319.
70. Jing C, Dong B, Zhang Y (2020). Chemical Modifications of Layered Double Hydroxides in the Supercapacitor. *Energy and Environmental Materials* 3: 346–379.
71. Fontanals N, Borrull F, Marcé RM (2020). Overview of mixed-mode ion-exchange materials in the extraction of organic compounds. *Analytica Chimica Acta* 1117: 89–107.
72. Phiroonsoontorn N, Sansuk S, Santaladchaiyakit Y, Srijaranai S (2017). The use of dissolvable layered double hydroxide components in an in situ solid-phase extraction for chromatographic determination of tetracyclines in water and milk samples. *Journal of Chromatography A* 1519: 38–44.
73. Chao H-P, Wang Y-C, Tran HN (2018). Removal of hexavalent chromium from groundwater by Mg/Al-layered double hydroxides using characteristics of in-situ synthesis. *Environmental Pollution* 243: 620–629.

74. Tang S, Lee HK (2013). Application of Dissolvable Layered Double Hydroxides As Sorbent in Dispersive Solid-Phase Extraction and Extraction by Co-Precipitation for the Determination of Aromatic Acid Anions. *Analytical Chemistry* 85: 7426–7433.
75. Tang S, Chia GH, Chang Y, Lee HK (2014). Automated Dispersive Solid-Phase Extraction Using Dissolvable Fe₃O₄-Layered Double Hydroxide Core–Shell Microspheres as Sorbent. *Analytical Chemistry* 86: 11070–11076.
76. Horstkotte B, Miró M, Solich P (2018). Where are modern flow techniques heading to? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410: 6361–6370.
77. Economou A (2005). Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24: 416–425.
78. Alexovič M, Horstkotte B, Šrámková I, Solich P, Sabo J (2017). Automation of dispersive liquid–liquid microextraction and related techniques. Approaches based on flow, batch, flow-batch and in-syringe modes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 86: 39–55.
79. Yildirim S, Cocovi-Solberg DJ, Uslu B, Solich P, Horstkotte B (2022). Lab-In-Syringe automation of deep eutectic solvent-based direct immersion single drop microextraction coupled online to high-performance liquid chromatography for the determination of fluoroquinolones. *Talanta* 246: 123476.
80. Maya F, Horstkotte B, Estela JM, Cerdà V (2012). Lab in a syringe: fully automated dispersive liquid–liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404: 909–917.
81. Horstkotte B, Alexovič M, Maya F, Duarte CM, Andruch V, Cerdá V (2012). Automatic determination of copper by in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction of its bathocuproine-complex using long path-length spectrophotometric detection. *Talanta* 99: 349–356.
82. Horstkotte B, Suárez R, Solich P, Cerdà V (2013). In-syringe-stirring: A novel approach for magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta* 788: 52–60.
83. Skoog D, Holler J, Crouch S (2018). *Principles of Instrumental Analysis*, Seventh Edition Cengage Learning, USA; Pages: 695-778.
84. Harvey D (2000). *Modern Analytical Chemistry*. First Edition. McGraw-Hill Higher Education, USA; Pages: 544-588.

85. Snyder L, Kirkland J, Dolan J (2010). Introduction to Modern Liquid Chromatography. Third Edition. John Wiley & Sons, Inc., USA; Pages: 1-83.
86. Cocovi-Solberg DJ, Miró M (2015). CocoSoft: educational software for automation in the analytical chemistry laboratory. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407: 6227–6233.
87. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (2023). Validation of Analytical Procedures: ICH Q2(R2), Geneva .
88. Wojnowski W, Tobiszewski M, Pena-Pereira F, Psillakis E (2022). AGREeprep – Analytical greenness metric for sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 149: 116553.
89. Maria Cardinale A, Fortunato M, Ardini F (2024). NiFe based synthetic LDH, study of chromate adsorption mechanisms. *Results in Surfaces and Interfaces* 16: 100242.
90. Fortunato M, Reverberi A Pietro, Fabiano B, Cardinale AM (2024). Thermal Evolution of NiFe-NO₃ LDH and Its Application in Energy Storage Systems. *Energies* 17: 1035.
91. Lesbani A, Taher T, Palapa NR, Mohadi R, Yuliana A, Mardiyanto (2020). Methyl orange dye removal using Ni/Fe-NO₃ and Ni/Fe-[α -SiW₁₂O₄₀] layered double hydroxides. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 902: 012042.
92. Gissawong N, Srijaranai S, Sansuk S (2019). A simple capture-release strategy based on an instantly formed mixed metal hydroxide sorbent for determination of salicylic acid in cosmetics. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 13: 100154.
93. Khezeli T, Daneshfar A (2022). Deep Eutectic Solvents and Layered Double Hydroxides in Solid-Phase Extraction of Antidepressant Drugs. *Chemical Engineering and Technology* 45: 1318–1325.
94. Santaladchaiyakit Y, Srijaranai S (2020). Dissolvable Mg/Al layered double hydroxides and surfactant as an extractant for trace analysis of benzoylurea insecticides by high performance liquid chromatography. *Analytical Methods* 12: 5380–5391.
95. Olanrewaju J, Newalkar BL, Mancino C, Komarneni S (2000). Simplified synthesis of nitrate form of layered double hydroxide. *Materials Letters* 45: 307–310.
96. Li Y, Wang X, Fu W, Xia X, Liu C, Min J, Zhang W, Crittenden JC (2019). Interactions between nano/micro plastics and suspended sediment in water: Implications on aggregation and settling. *Water Research* 161: 486–495.

97. Zhao J, Li Y, Wang X, Xia X, Shang E, Ali J (2021). Ionic-strength-dependent effect of suspended sediment on the aggregation, dissolution and settling of silver nanoparticles. *Environmental Pollution* 279: 116926.
98. Rocha DP, Anjos GTC, Neri TS, Tronto J, Pinto FG, Silva SG, Coelho NMM (2018). A flow injection procedure using Layered Double Hydroxide for on line pre-concentration of fluoride. *Talanta* 178: 102–108.
99. Zhou W, Wang C, Liu Y, Zhang W, Chen Z (2017). Layered double hydroxides based ion exchange extraction for high sensitive analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Chromatography A* 1515: 23–29.
100. Mousa A, Basheer C, Abdullah M, Al-Arfaj A (2020). Determination of Trace Level Perchlorate in Seawater Using Dispersive Solid-Phase Extraction and Co-precipitation Extraction with Layered Double Hydroxides Followed by Ion Chromatography Analysis. *Arabian Journal for Science and Engineering* 45: 4635–4646.
101. Xu J, Hu Q, Liu X, Wei S, Zheng J, Lin W, Ye Y, Zhu F, Ouyang G (2020). Determination of the mass transfer coefficients in direct immersion solid-phase microextraction. *Journal of Separation Science* 43: 1847–1853.
102. Beale DJ, Kaserzon SL, Porter NA, Roddick FA, Carpenter PD (2010). Detection of s-triazine pesticides in natural waters by modified large-volume direct injection HPLC. *Talanta* 82: 668–674.
103. Kutlucinar KG, Hann S (2021). Comparison of preconcentration methods for nontargeted analysis of natural waters using HPLC-HRMS: Large volume injection versus solid-phase extraction. *Electrophoresis* 42: 490–500.
104. Gritti F, Guiochon G (2007). Comparison between the loading capacities of columns packed with partially and totally porous fine particles: What is the effective surface area available for adsorption? *Journal of Chromatography A* 1176: 107–122.
105. Yıldırım S (2020). Yeni Nesil Kolonlar Kullanılarak Bazı Florokinolon Grubu Antibiyotiklerin Biyolojik Sıvılarda Eş Zamanlı Tayini için Sıvı Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılıkta Analitik Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
106. U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2022). M10 Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis: Guidance for Industry, Silver Spring, MD.
107. Ragab GH, and Bahgat EA (2021). Magnetic iron oxide nanoparticles for HPLC determination of valsartan in aqueous environmental samples, biological samples and

tablet dosage forms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 101: 2612–2628.

108. Valenzuela IE, Muñoz-Acevedo JC, Pabón E, Paim APS (2024). Cu (II)-based metal-organic framework functionalized with graphene oxide as a sorbent for the dispersive micro-solid-phase extraction of losartan potassium from water. *Journal of Porous Materials* 31: 1737–1752.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hilal Rabia ÇEVİK
Uyruğu :
Doğum Tarihi :
Telefon (İş) : -
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2022
Lise	Trabzon Tevfik Serdar Anadolu Lisesi	2016

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. İkinci Eczacı	Trabzon Ortahisar Üniversite Eczanesi	2022-2024
2. Araştırma Görevlisi	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı	2024-

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Analitik Kimya

YAYINLAR

1. -

BİLDİRİLER

1. -

ÖDÜLLER / TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. -

HOBİLER

1. Yürüyüş yapmak
2. Kitap okumak
3. Seyahat etmek

