

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**KROMATOĞRAFİK TEKNİKLERLE
TABLETLERDE FLURBİPROFEN
ANALİZİ VE BOZUNMA KİNETİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Ersin KILINÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

(KİMYA ANABİLİM DALI)

DİYARBAKIR

AĞUSTOS-2008

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Ersin KILINÇ tarafından yapılan "Kromatografik Tekniklerle Tabletlerde Flurbiprofen Analizi ve Bozunma Kinetiğinin İncelenmesi" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

	<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>
Başkan	: Prof. Dr. Recep ZİYADANOĞULLARI	
Üye	: Doç. Dr. Ömer YAVUZ	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Fırat AYDIN (Danışman)	

Tez Savunma Sınavı Tarihi : 31 / 07 / 2008

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

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

Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇCİOĞLU

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince tez konumun seçilmesinde ve sonuçların değerlendirilmesinde desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Fırat AYDIN'a, laboratuvar imkanlarının temini ve deneysel çalışmaların sürdürülmesinde ciddi katkıları bulunan Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Bahattin GÜMGÜM'e ve başta Analitik Kimya Anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Recep ZİYADANOĞULLARI, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akçay olmak üzere tüm Kimya bölümü elemanlarına, bu süreçte "Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı" çerçevesinde burs aldığım TÜBİTAK'a ve yüksek lisans çalışmasını araştırma projesi çerçevesinde destekleyen DÜAPK'ya teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
AMAÇ	iv
ÖZET	v
SUMMARY	vi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Non-steroid Anti-İnflammatuvar (NSAII) Analjezik ve Antipiretikler Hakkında Genel Bilgi	1
1.1.1. Etki Mekanizmaları.....	2
1.1.1.1. Anti-inflammatuvar Etki.....	3
1.1.1.2. Analjezik Etki	4
1.1.1.3. Antipiretik Etki.....	5
1.1.1.4. Çeşitli Etkiler	5
1.1.2. NSAII'larla Prostaglandin Sentezi İnhibisyonu	6
1.1.3. NSAII'ların Tedavide Kullanılmaları	7
1.1.4. NSAII'ların İstenmeyen Tesirleri	9
1.1.4.1. Gastrointestinal (GİK) Tesirler	9
1.1.4.2. Hematolojik Tesirler.....	10
1.1.4.3. Renal Tesirler	10
1.1.4.4. Santral Sinir Sistemi Tesirleri	11
1.1.4.5. Alerjik Reaksiyonlar.....	11
1.1.4.6. NSAII'larla Etkileşim.....	11
1.1.5. Flurbiprofenin Özellikleri.....	12
1.2. Kapiler Elektroforez.....	13
1.2.1. Elektroforez Teorisi	14
1.2.2. Elektroozmotik Akış	15
1.2.3. Kapiler Elektroforez Modları	19
1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	19
1.4. İnce Tabaka Kromatografisi.....	24
1.4.1. İnce Tabaka Kromatografisinin Mekanizması ve Teorisi	24
1.4.2. İnce Tabaka Kromatografisinin Sınıflandırılması	25
1.4.3. Kromatografik Performans Kriterleri ve Bunların İTK ile İlişkileri.....	25

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
<u>3.1. Materyal</u>	33
<u>3.1.1. Kullanılan Reaktifler</u>	33
<u>3.1.2. Kullanılan Çözeltiler</u>	33
<u>3.1.3. Kullanılan Aletler.....</u>	33
<u>3.1.4. Tabletlerin Analize Hazırlanması</u>	34
<u>3.2.4. Stres Şartlarının Hazırlanması</u>	34
4. BULGULAR.....	36
<u>4.1. Kromatografik Tekniklerle Flurbiprofen Analizi İçin Kalibrasyon Çalışmaları.....</u>	36
<u>4.1.1. YBSK ile Flurbiprofen Kalibrasyon Çalışması</u>	37
<u>4.1.2. Kapiler Elektroferez ile Flurbiprofen Kalibrasyon Çalışması.....</u>	39
<u>4.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi ile Flurbiprofen Kalibrasyon Çalışması</u>	40
<u>4.2. Kromatografik Tekniklerle Tabletlerde Flurbiprofen Analizi.....</u>	41
<u>4.3. Farklı Stres Şartlarında Flurbiprofenin Bozunma Ürünlerinin incelenmesi</u>	44
<u>4.4. Flurbiprofenin Bozunma Kinetiğinin İncelenmesi</u>	50
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	57
6. KAYNAKLAR.....	59
7. TABLO LİSTESİ	64
8. ŞEKİL LİSTESİ	65
9. ÖZGEÇMİŞ	67

AMAÇ

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez ve ince tabaka kromatografisi gibi kromatografik teknikler son yıllarda analiz gerektiren pek çok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle ilaç sektöründe, kromatografi tekniğine dayalı cihazlar, ilaç içerisindeki safsızlıkların belirlenmesi ve tablet içerisindeki ilaç etken maddelerin analizi gibi konularda kimyasal analiz laboratuvarlarında bulunması gereken en temel cihazların başında gelmektedir.

Bu kapsamda bir ilaç etken maddesi olan flurbiprofenin eczanelerde ticari olarak satılan ve flurbiprofen içeren tabletlerde analizini gerçekleştirmek için yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez ve ince tabaka kromatografisi kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. ICH (International Conference of Harmonization) tarafından belirlenen kriterlere uyularak farklı stres şartları altında flurbiprofenin bozunması ve bozunma kinetiği incelenmiştir.

ÖZET

Çalışmada, Non-steroid Anti-İnflammatuvar ilaçlar grubunun bir üyesi olan flurbiprofenin ticari tabletlerde analizi yapılmıştır. Analizler için yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi kullanılmıştır. Kullanılan kromatografik tekniklerde flurbiprofen analizi için uygun hareketli fazlar belirlenmiştir.

Flurbiprofenin farklı stres şartları altında bozunma davranışlarını incelemek için ICH (International Conference of Harmonization) tarafından belirlenen kriterler kullanılmıştır. Bozunmanın en fazla olduğu ortamda farklı süre ve sıcaklıklarda çalışılarak flurbiprofenin bozunma kinetiği incelenmiştir. Bozunma kinetiğinin incelenmesinde analizler yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi cihazı kullanılarak yapılmıştır. Kinetik sonuçlardan elde edilen veriler kullanılarak oda sıcaklığında flurbiprofenin bozunmasıyla ilgili termodinamik sabitler hesaplanmıştır.

SUMMARY

In this study, analysis of the flurbiprofen which is a member of the Non-steroidal Anti Inflammatory Drugs was performed in the commercial tablets. High performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and high performance thin layer chromatography were used for the analysis. The appropriate mobile phases were determined for the analysis of the flurbiprofen in chromatographic techniques used.

The criteria designated by ICH (International Conference of Harmonization) were used to investigate the degradation behaviors of flurbiprofen under the different stress conditions. The degradation kinetic of flurbiprofen was examined by studying in different time and temperatures at the condition which the maximum degradation was observed. The analysis were performed by using the apparatus of high performance thin layer chromatography in the study of investigation of degradation kinetic. The thermodynamic constants about the degradation of flurbiprofen at room temperature were calculated by using data obtained from kinetic results.

1. GİRİŞ

1.1. Non-steroid Anti-İnflammatuvar (NSAII) Analjezik ve Antipiretikler Hakkında Genel Bilgi

Bu ilaçlar kimyasal yapıları farklı, ancak klinik kullanım alanları, etki mekanizmaları ve istenmeyen etkileri benzerlik gösteren ilaçlardır. Kimyasal yapılarına göre sınıflandırılırlar. Etki güçleri, farmokinetik özellikleri v.b. açısından aralarında farklılıklar vardır. Periferik etkili analjezikler olarak da adlandırılırlar. Hemen hepsi değişen derecelerde antipiretik ve anti-inflammatuvar etkiye de sahiptir. Antitrombotik etki çoğunda görülür. Asetaminofen (para aminofenol türevleri) anti-inflammatuvar ve antitrombotik etkinlikleri olmadığı için NSAII'ların sınıflandırılmasının dışında bırakılırlar.

NSAII'ların anti-inflammatuvar aktiviteleri, glukokortikoidlerden düşüktür. Ancak glukokortikoidlerden daha iyi tolere edilirler ve analjezik antipiretik etkileri üstünlük sağlar. Glukokortikoidler gibi anti-inflammatuvar etki gösterdikleri için yapı farklılıklarını belirtmek için NSAII (non steroid anti-inflammatuvar ilaçlar) olarak adlandırılırlar. Periferik etkili analjezikler oldukları için analjezik etkileri opioidlerden (santral etkili analjezikler) daha zayıftır. Ancak opioidler gibi tolerans ve bağımlılık yapmazlar, narkoz hali oluşturmazlar ve solunum depresyonuna neden olmazlar. Ayrıca oral yolla kullanılabilmeleri ve opioidlerden farklı olarak anti-inflammatuvar etkilerinin olması gibi özellikleri ile yaygın kullanılırlar. Analjezik etkilerinin gücü için tavan söz konusudur. Dozun yükselmesi etkiyi arttırmaz.

NSAII'ların hepsi zayıf yada güçlü siklooksijenaz inhibitörleridir. Siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimini inhibe ederek prostoglandin sentezini baskırlar. Terapötik etkilerinin çoğu bu şekilde oluşur. COX-1 ve COX-2'ye selektiviteleri farklılık gösterebilir. Bazı NSAII'ların dışında (indometazin, diklofenak gibi) çoğu lipoksijenaz enzimini etkilemez.

Kimyasal yapı olarak zayıf asitlerdir (yeni türevlerin dışında). Yağda fazla çözünürler, GİK'dan emilimleri iyidir. Değişen oranlarda (çoğunlukla yüksek oranda) plazma proteinlerinde bağlanırlar. Bu ilaçların çoğu, sinovyal sıvıya iyi penetre olur, burada birikebilirler. Farmokinetik olarak inflamasyon dokusunun asidik ortamında daha fazla toplanırlar ve anti-inflammatuvar etkileri artar. Karaciğerde metabolize olurlar. Çoğu

glukuronid konjugatları şeklinde böbreklerden atılırlar. Eliminasyon yarı ömürleri 1-2 saatten 70-80 saate kadar uzayabilen değişkenliktedir.

Aspirin bu ilaçların prototipi olarak kabul edilir. Diğer NSAII'lar aspirin benzeri ilaçlar olarak da tanımlanır. NSAII ve analjezik antipiretik ilaçların sınıflandırılması aşağıdaki gibidir [1,2,3].

I. Asidik ilaçlar

1. Salisilik asit türevleri : Aspirin, sodyum salisilat, kolinmagnezyum trisalisilat, salsalat, salisilsalisilik asit, sulfasalazin
2. Propiyonik asit türevleri : İbuprofen, naproksen, flurbiprofen, ketoprofen, fenoprofen, tiaprofenik asit, oksaprozin v.b.
3. Asetik asit türevleri :
 - a. İndolasetik asit : İndometazin, sulindak, etodolak, tolmetin
 - b. Heteroaril asetik asit : Ketorolak
 - c. Fenilasetik asit : Diklofenak
4. Fenamik asit türevleri : Mefenamik asit, meklofenamik asit, flufenamik asit, etofenamat
5. Enolik asit türevleri :
 - a. Oksikamlar : Piroksikam, tenoksikam
 - b. Pirazolonlar : Fenilbutazon, oksifenbutazon, dipiron (metamizol), azopropazon

II. Asidik olmayan ilaçlar

1. Alkanonlar : Nabumeton, prokuazon
2. COX-2 selektif inhibitörleri : Nimesulid, meloksikam
3. COX-2 spesifik inhibitörleri : Selekoksisib, rofekoksil

III. Analjezik antipiretik ilaçlar : Paraaminofenol türevleri (asetaminofen)

1.1.1. Etki Mekanizmaları

NSAII'ların tedavi açısından en önemli etkileri anti-inflammatuvar, analjezik ve antipiretik etkileridir. Bunların sağlanmasındaki temel mekanizmanın periferde prostanooidlerin sentezinde aracı olan siklooksijenaz (prostoglandin sentetaz) enziminin

inhibisyonu olduğu kabul edilir. NSAII'ların tüm etkileri prostoglandin sentezinin engellenmesiyle açıklanamaz. Bu etkilerin oluşmasında başka mekanizmalar da vardır (kemotaksin inhibisyonu, sitokinlerin oluşumunun azalması v.b.).

1.1.1.1. Anti-inflammatuvar Etki

Akut inflamasyon bilindiği gibi çeşitli uyarılara yanıt olarak başlar, organizmayı korumaya yöneliktir. Kronik inflamasyon tersine organizmaya zarar verir. Akut inflamasyonu başlatan nedenler arasında enfeksiyon ajanları, antijen-antikor reaksiyonları, otoimmün reaksiyonlar ve termal uyarılar, radyasyon, travma gibi fiziksel hasarlar sayılabilir. Akut inflamasyonun başlıca nedenleri lokal sıcaklık, kızarıklık, şişkinlik ve ağrıdır.

Diş hekimliğinde de cerrahi travmayla başlayan inflamasyon ve buna bağlı ödem, ağrı, trismus gelişmesi en önemli sorunlardan biridir. Bir apikal apse, cerrahi çekim v.b. inflamasyon uyarıları ile karşılaşma olasılığı hiç de az değildir. Örneğin, diş çekimiyle oluşan travma doku hasarına neden olur. Böylece kan damarlarının dilatasyonu ile hasarlı bölgeye kan akımı artar. Trombosit ve lökosit adezyonu, inflamasyon bölgesine lökosit göçü oluşur. Kapiler permeabilite artışı ödeme neden olur. Sinir uçlarının duyarlılığına bağlı olarak ağrı algılanır.

İnflamasyon alanında bu değişikliklerin oluştuğu dönemde çeşitli kimyasal mediyatörler (histamin, serotonin, prostoglandin, bradikinin v.b.) sentezlenir ve/veya salıverilir. Akut inflamatuvar reaksiyonda prostoglandinler diğer mediyatörlerden sonra (hasardan 6-12 saat sonra) sıvı ve eksuda da görülür.

Lökositler inflamasyonda önemli rol oynarlar. Kemotaksis, migrasyon, fagositoz işlevlerine ek olarak kimyasal mediyatörleri de açığa çıkarırlar. Lökositlerden serbestlenen lizozomal enzimler hücre membranındaki fosfolipidlerden araşidonik asidin ayrılmasına neden olurlar. Araşidonik asitten siklooksijenaz enzimi (COX-1, COX-2) aracılığı ile prostasiklin, prostoglandin, tromboksan A2 oluşur. Lipooksijenaz enzimi aracılığı ile de lökotrienler sentezlenir.

NSAII'lar periferde prostanooidlerin sentezini baskılar, lökosit migrasyonunun ve kemotaksinin inhibisyonunu, fagositozun önlenmesini sağlarlar. Ayrıca sitokinlerin (interleukin-1, TNF) oluşumunu azaltırlar. Aktif oksijen radikallerinin artışını engellerler. Lizozomal enzimlerin salınmasını baskılar. Bradikinine bağlı inflamasyon belirtilerini önlerler. Süperoksit üretimini baskırlar. Membranda fosfolipaz-C aktivitesini inhibe ederler. Kıkırdak metabolizmasını etkilerler. Plazma proteinlerden antiinflamatuvar etkili peptid oluşumunu uyarırlar. Bazı NSAII'lar değişen derecelerde lipooksijenaz enzimini inhibe ederler. Bu etkilerin hepsi NSAII'ların geniş kapsamlı etki mekanizmalarını ifade eder. Terapötik etkilerinde hepsinin katkısı olabilir.

1.1.1.2. Analjezik Etki

Ağrı, rahatsız edici bir uyarıcı olarak çoğunlukla doku hasarıyla oluşan inflamasyon sonucu indüklenir. Ağrı reseptörlerinin (nösisseptörlerin) uyarılması da ağrı algılanmasına yol açar. Nösisseptörler çeşitli ağrılı uyarıcılar için özelleşmiş reseptörlerdir. Sinir liflerinin serbest uçlarında bulunurlar ve ağrılı uyarıcılara yanıt verirler.

Ağrı yapıcı kimyasal ve mekanik etkenler periferde prostoglandin sentezini artırırlar. Örneğin, operasyon sonrası ilk 3-8 saat arasında ağrı çok şiddetlidir. Prostoglandin ve PGE₂, bradikinin ve öteki aljezik mediyatörlere nösisseptörlerin duyarlılığını arttıran hiperaljezik ağrı mediyatörleridir. Siklooksijenaz enzimi (COX-1, COX-2) hiperaljezinin santral ve periferik mekanizmalarını düzenlemede etkilidir.

NSAII'lar periferde prostoglandin oluşumunu baskılayarak nösisseptörlerin ağrı mediyatörlerine duyarlılığını kaldırır. Ağrının algılanmasını azaltırlar. Ağrıdan başka duyarıcı etkilemezler.

NSAII'lar periferik etkili analjezikler olmalarına karşın SSS'de prostoglandin sentezini inhibe ederek santral yoldan da analjezi sağlayabilirler. NSAII'ların analjezik etkisinin prostoglandin sentezi inhibisyonundan farklı bir mekanizmayla oluştuğunu ileri süren çalışmalar da vardır. Bu araştırmalara göre NSAII'lar periferik veya santral nöronlarda antinosiseptif etki oluşturarak analjezik etki gösterir [1,2].

1.1.1.3. Antipiretik Etki

Ateş; enfeksiyon, inflamasyon, malignite, çeşitli hastalıklar ve doku hasarının sonrasında oluşabilir. Ateşe neden olan maddeler pirojen madde olarak adlandırılır. Bakteri, virüs, polipeptitler v.b. ekzojen pirojenler makrofajlardan endojen pirojenlerin serbestlenmesine neden olur. İnterleukin-1, interferonlar, tümör nekroz edici faktör gibi sitokinler endojen pirojenlerdir.

Bunlar hipotalamusta termoregülatör merkezi uyarırlar. Bu bölgedeki PGE'lerin sentezini arttırarak onların aracılığı ile ısı üretiminde artma, ısı kaybında azalma oluştururlar. Termoregülatör merkez uyarıldığında daha yüksek ısı değerine ayarlanmış olur ve ateş yükselir.

NSAII'lar PGE₂ sentezini baskılayarak ısı kaybını arttırır, ateşi düşürürler. Ciltte vazodilatasyon ve terleme aracılığı ile ısı kaybı artar. NSAII'lar yükselmiş vücut ısına etkilidirler. Normal vücut ısısını veya egzersiz, sıcak çarpması gibi faktörlerle yükselen ısıyı etkilemezler.

1.1.1.4. Çeşitli Etkiler

NSAII'ların prostoglandin sentezi inhibisyonuyla bağlantılı başka terapötik etkileri de vardır. Menstrüasyon sırasında endometriyumdan açığa çıkan prostoglandinlerle oluşan primer dismenrenin şiddetli kramplarını ve diğer semptomlarını hafifletirler. Yeni doğanlarda kapanması geciken ductus arteriosus'un kapanmasını sağlamak için etkilidirler.

NSAII'ların antitrombotik etkileri aslında terapötik etkiden daha çok istenmeyen etkileri arasında yer alır. NSAII'lar trombositlerin sikloksijenazını inhibe ederek tromboksan A₂ ve prostoglandin sentezini engellerler. Trombosit agregasyonunu etkilerler, kanama zamanını uzatırlar. Aspirin dışındaki NSAII'larda tersinir olan bu inhibisyon tedavide kullanıma uygun değildir. Sadece antitrombotik etkisi tersinmez olan aspirin kardiyovasküler koruma amaçlı kullanılır.

1.1.2. NSAII'larla Prostoglandin Sentezi İnhibisyonu

NSAII'ların siklooksinez enzimini inhibe ederek prostoglandin oluşumunu engellediği, terapötik etkilerinin büyük oranda bu mekanizmayla sağlandığı 1971 yılından bu yana bilinmektedir. 1990'lı yılların başında prostoglandin oluşumunda aracı olan siklooksijenaz enziminin iki izoform şekli olduğu saptanmıştır. Bu iki izoform şekli COX-1 ve COX-2 olarak adlandırılmıştır. Farklı doku ve organlarda COX-1 ve COX-2'nin değişen miktarlarda bulunduğu gösterilmiştir.

COX-1 normal fizyolojik durumlarda GİK'te, böbrek , trombositlerde ve endoteryal hücrelerde fazla miktarlarda bulunurlar. Tromboksan A₂ ve prostoglandinlerin oluşumuna aracılık ederler. COX-1, midede PGE₂ ve prostasiklin sentezini katalize eder. Normal hücrel olayları düzenleyen bu prostoglandinler mide mukozasının bütünlüğünü koruyan sitoprotektif (koruyucu) etkiye sahiptir. Ayrıca trombosit fonksiyonunu düzenler, vasküler hemostaza aracılık ederler, böbrek kan akımını ve böbrek fonksiyonlarını düzenlerler.

COX-2 izoformu indüklenebilir şekildir. Fizyolojik durumlarda sadece birçok özel dokuda düşük düzeyde bulunurlar. Böbrek gelişiminde, ovülasyon ve doğumda, bilinmeyen beyin fonksiyonlarında prostoglandin oluşumuna aracılık ederler. Ancak daha çok inflamasyon, ağrı ve ateşle ilişkili prostoglandin sentezine aracılık ettiği gösterilmiştir. Bu durumda çeşitli dokularda bulunurlar. Proinflamatuvar maddeler olan interleukin-1, lipopolisakkaridler, tümör nekrotik faktör, büyüme faktörleri v.b. ile indüklenerek etkileri artar. Ayrıca COX-2'nin kolon kanseri patojenezinde rol aldığı, aktivasyonun tümör gelişimini arttırdığı ileri sürülmektedir.

NSAII'lar her iki siklooksijenaz izoformunun inhibisyonuyla prostoglandin sentezini engellerler. Siklooksijenaz enzimleri antiinflamatuvar ilaçlara farklı duyarlılık gösterirler. COX-2 enziminin inhibisyonu NSAII'ların analjezik ve antiinflamatuvar etkilerini göstermesine olanak sağlar. COX-1 enziminin inhibisyonu ise NSAII'ların toksik etkilerinin nedenini oluşturur.

COX-1 ve COX-2 enzimlerinin birlikte inhibisyonu inflamasyonu azaltır ancak istenmeyen etkilere de neden olur. Prostasiklin ve PGE₂ mide mukozasında önemli koruyucu fonksiyon gösterdiği için bunların inhibisyonu NSAII'ların ülser yapıcı aktivitelerini artırır.

NSAII'ların bazıları COX-1 ve COX-2'ye farklı derecede aktivite gösterirler. COX-2'ye göre COX-1'e karşı daha yüksek aktivite gösteren NSAII'lar istenmeyen etkilere daha fazla neden olurlar.

İdeal bir analjezik antiinflamatuvar ilacın COX-2 enzimini spesifik olarak etkilemesi gerektiği fikrinden hareketle 10 yıl süresince araştırmalar yapılmıştır. Önce COX-2 enzimine nisbi selektivite gösteren NSAII'lar elde edilmiştir. Spesifik COX-2 inhibitörleri 1999 yılında selekoksib ve rofekoksib olarak tedavide kullanıma sunulmuştur. COX-2 inhibitörleri ve eski NSAII'lar ağrı ve inflamasyona karşı eşit etki gösterirler. Ancak COX-1 inhibisyonuyla gelişen GİK ve komplikasyon oluşma riski yüksek hastalarda tam olarak güven sağlayamaz. COX-2 inhibitörlerinin tromboksan A₂'yi de inhibe edici etkisi vardır ama antirombositik aktiviteleri NSAII'lardan daha azdır.

COX-2 spesifik inhibitörleri kanama zamanını uzatmaz. Normal dozlarda kullanıldığında 7-12 gün için trombosit agregasyonu ve kanama zamanı etkilenmez. Bu nedenle kardiyovasküler koruma için aspirin yerine kullanılamazlar. COX-2 inhibitörleriyle, pıhtılaşma anormalliği olanlar ve/veya birlikte alkol, antikoagülan kullananlarda kanama riski artar. COX-2 inhibitörlerinin kolon kanseri ve Alzheimer hastalığı tedavisinde yararlı olduğunu gösteren çalışmalar devam etmektedir [1,2,3].

1.1.3. NSAII'ların Tedavide Kullanılmaları

Antiinflamatuvar etkileri nedeniyle romatoid artrit, osteoartrit, ankilozan spondilit ve bazı artrozlarda uzun süreli tedavi için kullanılırlar. Semptomları hafifletirler ama eklem dejenerasyonunu ve hasarını önleyemezler. Yüksek dozlarda inflamasyonlu eklem hastalıklarında, düşük dozlarda ise daha az inflamasyonlu durumlarda kullanılırlar.

İnflamasyonu, kemik içi basıncını, ödemi azalttıkları için kemik metastazına bağlı ağrıların hafifletilmesinde de yararlı olabilirler. Analjezik olarak genellikle hafif veya orta şiddetteki baş ağrısı, diş ağrısı, myalji, artralji gibi künt ağrıların azaltılmasında kullanılırlar. Kemik kırığı, yanık ağrıları düz kaslı organların ağrıları gibi şiddetli travmaya bağlı ağrılarda etkisiz kalabilirler. NSAII'ları kullanan hastaların da değişik NSAII'lara karşı yanıtı birbirinden farklıdır. Ayrıca aynı grup ilaca hastaların her birinin yanıtı da farklı olabilir.

Dişten ve çevresindeki dokulardan kaynaklanan ağrı ve inflamasyonun tedavisinde NSAII'lar sık kullanılırlar. Dişe ait abseler ve periodontal abselerde, dişsel cerrahi ve diş çekimlerinden sonra oluşabilen ödem, ağrı ve inflamasyonun kontrol altına alınmasında özellikle antiinflamatuvar etkili analjezikler tercih edilir.

NSAII'lar küçük cerrahi işlemler sonrasında oluşan ağrılarda opioidler kadar etkinlik gösterirler. Bazen postoperatif şiddetli ağrılarda yeterli analjezi sağlayamazlar. Bu durumda ek olarak bazı opioidlerle kombine edilirler. Operasyondan hemen önce alınan NSAII'ların postoperatif ağrının şiddetinin azalttığı ve başlamasını geciktirdiği gösterilmiştir.

Şiddetli postoperatif ağrılarda opioidlerle kombinasyonunda en yaygın kullanılan opioid kodeindir. Genellikle kodein, aspirin ve asetaminofenle kombine edilir. Kodeinin 30-60 mg'ı gibi tolere edilebilir dozlarıyla aspirinin kombinasyonu sinerjik etki oluşturarak dişten kaynaklanan ağrılarının hemen hepsinde etkili analjezi sağlar. Propoksifen ve pentazosin de kombinasyonlarda kullanılabilen opioidlerdir. Ancak kodeinle karşılaştırıldığında terapötik üstünlükleri yoktur. Bu kombinasyonlarda kullanılan opioidler toksisite ve bağımlılık oluşturma potansiyelleri bakımından güvenlidir. Yine de solunum depresyonu, over dozaj, konstipasyon, uyuşukluk, bulantı, kusma, hatta bağımlılık yapabilirler. Bu sakıncalar nedeniyle günümüzde opioidlerin veya opioid kombinasyonlarının kullanılması yerine dişten kaynaklanan ağrılarda NSAII'lar tercih edilmektedir.

NSAII'ların diş hekimliğinde üzerinde çalışılan bir etkisi de periodontal hastalıklarda kemik kaybının yavaşlatılmasıdır. Periodontal inflamasyonun baskılanmasının periodontal hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceği ileri sürülmektedir. Ancak böyle bir uygulamada NSAII'lar, üst düzeyde oral hijyen ve mekanik tedavi eşliğinde kullanılmalıdır.

NSAII'ların antipiretik etkilerinden de tedavide yararlanılır. Bu ilaçların hemen hepsi ateşli durumlarda vücut ısısını düşürmek için etkilidir. Ancak fenilbutazon v.b. bazı NSAII'lar toksik etkili oldukları için bu amaçla rutin kullanılmazlar. Ayrıca ateş vücudun bir korunma mekanizması olduğundan pek çok ateşli hastalıkta, ateşin düşürülmesinin enfeksiyon tedavisini geciktirebileceği unutulmamalıdır.

NSAII'lar primer dismenorenin şiddetli kramplarında ve semptomaların hafifletilmesinde de yaygın kullanılırlar. Antiagregan olarak NSAII'lardan sadece aspirin

düşük dozda haftada 1-2 kez uygulanmalıdır. Son yıllarda NSAII'ların sürekli kullanılması ile Alzheimer hastalığı ve kolon kanseri riskinin azaldığını ileri süren çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. NSAII'lar enfeksiyon tedavisinde kullanılmamalıdır, çünkü enfeksiyonu ağırlaştırabilirler [1].

1.1.4. NSAII'ların İstenmeyen Tesirleri

Terapötik etkileri gibi istenmeyen tesirlerin çoğundan, hedef organ ve sistemlerdeki prostoglandin sentezini baskılamaları sorumlu tutulur. Toksik etkilerinin bir kısmının ise nedeni bilinmemektedir.

1.1.4.1. Gastrointestinal (GİK) Tesirler

NSAII'ların hemen hepsi ile görülebilen (setaminofen ve COX-2 spesifik inhibitörleri dışında) en önemli toksik reaksiyonlardır. Çeşitli NSAII'lara göre değişen sıklıkta ve şiddette bulantı, kusma, diare, karın ağrısı, dispepsiden mide kanaması, ülserasyon, perforasyona kadar genişleyen bir görünümündedir. NSAII'ları kullananların yaklaşık %20'sinde görülür, ancak çoğu ciddi boyutlarda değildir. Bazen de kısa süre kullanıldığında bile mide ülserine neden olabilir. GİK toksisitesinin bir nedeni oral yoldan kullanılmaya bağlı lokal irritasyondur. Asit özellikteki bu ilaçlar midenin asit ortamında noniyonize olarak mide mukozasına geri difüzyon olur. Böylece daha az asit olan mukoza hücrelerinde birikerek hasar oluştururlar (iyon tuzağı veya iyon kapağı). Lokal irritasyon dışında oral uygulama ile birlikte parenteral veya rektal kullanılmasıyla da oluşan mide üzerine toksisitenin ise prostoglandin senteziyle ilişkisi vardır.

Prostoglandin E₂ ve prostasiklinin mide mukozasındaki kan akımını, bikarbonat sağlanmasını arttıran, epitelin yenilenmesini sağlayan, mide asit sekresyonunu azaltan ve koruyucu mukus sekresyonunu arttıran etkileri olduğu bilinmektedir. NSAII'lar prostoglandinlerin sentezini engelleyerek bu koruyucu etkilerin de ortadan kaybolmasına neden olurlar. Bu etkiler, siklooksijenaz enzimini inhibe eden aktivitelerine göre her NSAII için farklı şiddette olabilir.

NSAII'ların GİK üzerindeki olumsuz etkilerini arttıran bazı faktörler de vardır. Bunlar; ilerlemiş yaştaki hastalıklar, ülser öyküsü olanlar, ailesinde ülser hastalığı geçirmiş

görülenler, kortikosteroid ve oral antikoagülanların NSAII'larla birlikte alınması, yüksek dozda NSAII kullanılması, birden fazla NSAII'ların birlikte alınması, ciddi sistemik hastalıkların varlığı gibi risk faktörleridir. Ayrıca sigara, alkol kullanılması ve helikobakter pylori'li enfeksiyonlarda da gastrointestinal ülserler için olası risk faktörleridir.

Genellikle NSAII'larla görülebilen mide kanamaları anemiye yol açabilecek şiddette değildir. Anemi ancak kan kaybı, menstürasyon, demir eksikliği v.b. durumlarda oluşur. GİK'le ilgili olumsuz etkileri hafifletmek için yararlı olabilecek bazı önlemler alınabilir. Örneğin, ilaçlar yemekten sonra alınabilir. Hatta istenmeyen tesirlerin sabah yerine akşamları ilaç alındığında daha az olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca NSAII'larla birlikte bir PGE analogu olan misoprostal kullanılabilir [1].

1.1.4.2. Hematolojik Tesirler

NSAII'lar trombositlerin siklooksijenazını inhibe ederek tromboksan A₂'nin sentezini engeller, kanama eğilimini arttırmırlar. NSAII'ların kanama ve pıhtılaşma ile ilgili istenmeyen tesirlerin nedeni olan trombosit siklooksijenazının inhibisyonu aspirin dışındakilerle tersinirdir. NSAII'lar trombosit fonksiyonunu bozarlar ancak bunlarla kanama oluşması klinik olarak önemli değildir. Protrombin zamanı da etkilenmez.

Uzun etki süreli NSAII'lar (oksikomlar), kısa süreli olanlara göre (diklofenak, ketorolak) hemostazın bozulmasında daha fazla risk taşır. NSAII'larla seyrek de olsa trombositopeni, hemolitik anemi, agranülostoza, lökopeni, aplastik anemi görülebilir. NSAII'larla oluşabilecek kanama komplikasyonları için 60 yaş üzerindeki hastalar, hemofili gibi kan hastalığı olanlar, karaciğer fonksiyon yetersizliği, trombositopeni, alkol ve oral antikoagülan kullananlar yüksek risk taşırlar. NSAII'ların trombosit agregasyonunu inhibe ederek kanama zamanını uzatmaları dış hekimliğinde de olumsuz etkilerdendir.

1.1.4.3. Renal Tesirler

Çok yaygın olmayan bu tesirler böbrek kan akımının azalması, glomerül filtrasyonda azalma, sodyum ve su retansiyonu, hipertalemi, akut böbrek yetmezliğidir. Akut interstisyel nefritle birlikte nefrotik sendrom, papiller nekroz ise çok seyrek görülebilir. Bu tesirlerin de prostoglandin sentez inhibisyonuyla ilişkisi vardır. Renal prostoglandinler renal kan akımını

düzenlerler, renin açığa çıkışını baskırlarlar, sodyum klorür reabsorpsiyonunu düzenlerler. Prostaglandinlerin antidiüretik hormon üzerine olan inhibitör etkisi NSAII'larla kaldırıldığında sodyum ve su retansiyonu artar, ödem oluşabilir.

Paraasetamol renal prostoglandin oluşumunu engellemez. Bazı NSAII'ların da böbrek fonksiyonu üzerindeki etkileri farklıdır. Diklofenak ve indometazin antiinflamatuar dozda böbreklerde PGE₂ düzeyini %50 azaltır. Pirazolonlarla su ve tuz tutulması daha sık görülür. NSAII'ların (özellikle indometazin) kullanılması hipertansif ve normotansif kişilerde kan basıncının yükselmesine neden olabilir.

1.1.4.4. Santral Sinir Sistemi Tesirleri

Baş ağrısı, baş dönmesi, titreme, uyuklama, depresyon, kulak çınlaması, huzursuzluk, dikkat azalması, psikoz, epilepsi provakasyonu, aseptik menenjit görülebilir. Baş ağrısı ve baş dönmesi indometazinle daha sık oluşur. Doza bağlı olarak artar. NSAII'larla oluşan SSS tesirleri genellikle tersinirdir.

1.1.4.5. Alerjik Reaksiyonlar

En yaygın alerjik reaksiyon ciltte kızarma, kaşıntı, ürtikerdir. Bu reaksiyonlar immün sistemle ilgilidir. Duyarlı kişilerde ek olarak anjiyo ödem, bronkokonstriksiyon, hipotansiyon, astma görülebilir. NSAII'ları kullananların %0.3'ünde alerji oluşabilir. Özellikle astmal, nasal polipli veya kronik ürtikerli hastalarda düşük dozlarda da oluşabilir. Siklooksijenaz enzim inhibisyonu sonucu lökotrien sentezini arttırmasına bağlanır. Kimyasal yapıları farklı olmasına karşın NSAII'lar arasında çapraz duyarlılık vardır. Diş hekimliğindeki mukoza ve dişeti ülserasyonlarının nedeni, NSAII kullanılmasıyla gelişebilen aşırı duyarlılık reaksiyonları olabilir [1,2,3].

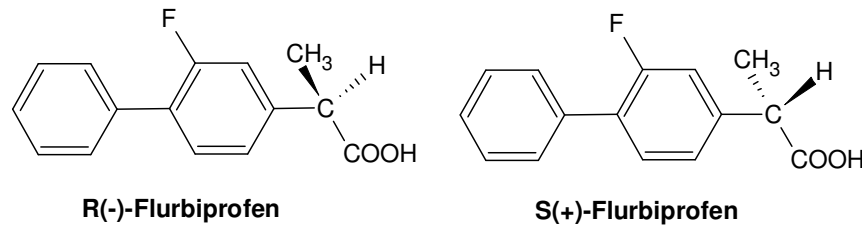
1.1.4.6. NSAII'larla Etkileşim

Bu etkileşimlerin bir kısmı NSAII'ların prostoglandin sentezini inhibe etmeleriyle ilişkilidir. Bazısı da NSAII'ların yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanmasıyla bağlantılıdır. Spesifik etkileşimler uzun süreli kullanımlarla özellikle yaşlılarda görülebilir. Diş hekimliğinde bu ilaçların başlıca endikasyonu postoperatif akut ağrı olduğu için sadece birkaç gün kullanılırlar. NSAII'ların dört gün ve daha kısa süre kullanılmaları antihipertansif

ilaç kullananlarda güvenli kabul edilebilir. Ancak konjestif kalp yetmezliği olanlar ve yaşlılar güvenlik sınırının dışında yer alırlar.

1.1.5. Flurbiprofenin Özellikleri

Flurbiprofen [2-(2-floro-4-fenil-4) fenil] propionik asit) Şekil 1.1'de gösterildiği gibi kiral bir merkez içeren, R ve S olmak üzere iki enantiomeri bulunan bir moleküldür [4]. Siklooksijenaz sisteminin inhibisyonunda S-enantiomer etki gösterirken R- enantiomer biyolojik bir aktivite göstermemekte, tam tersine gastrointestinal toksisite gibi negatif etkilere de sebep olmaktadır [5]. 1990'lı yıllarda analitik ve ayırma biliminde kiral kimya alanındaki bilimsel ve teknik gelişimlere paralel olarak R- flurbiprofenin beklenen biyolojik aktiviteleri keşfedilmiştir. Saf R- enantiomer ile hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda bu enantiomerin anti kanser özelliği gösterdiği belirlenmiştir [6].



Şekil 1.1. R ve S flurbiprofenin kimyasal yapıları

Farmakolojik etkileri, farmokinetik özellikleri diğer propiyonik asit türevlerinden farklı değildir. Oral yoldan kullanıldığında GİK emilimi hızlı ve yüksek orandadır. Alındıktan 1-2 saat içerisinde doruk kan konsantrasyonuna ulaşır. Vücutta dağılımı iyidir. Özellikle sinovyal sıvıda yüksek konsantrasyon oluşturur.

Karaciğerde hidrosilasyon ve konjugasyonla metabolize edilir. Böbrekler aracılığı ile elimine olur. Atılmadan önce enterohepatik sıklusa katılır. Serum yarı ömrü 5-6 saat arasındadır. Tedavide oral ve topikal kullanılır. Oral yoldan romatoid artrit, osteoartrit, ankilozan spondilit, postoperatuvar akut, ağrılarda diğer propiyonik asit türevleri gibi etkili analjezik antiinflamatuvar etki sağlar. Antitrombotik amaçlı olarak da kullanılır.

Topikal uygulamayla oftalmik kullanımı olan bir NSAII'tır. Oftalmik cerrahi sonucu travmaya bağlı prostoglandin saliverilmesi ilerleyici myozis oluşumuna neden olur.

Flurbiprofen prostoglandin sentezini engelleyerek miyozisi azalır. Bu etkisini gösterirken göz iç basıncını etkilemez. Yumuşak doku hasarlanmalarında cilt üzerine yakı şeklindeki uygulamayla da terapötik amaçlı kullanılır.

Flurbiprofenin diş hekimliğinde periodontitise bağlı gelişen alveoler kemik kaybını yavaşlatarak etkili olduğu gösterilmiştir. Diş implantlarının çevresindeki kemik kaybını azaltabildiği ileri sürülmektedir. Flurbiprofen belirtilen endeksiyonlarda erişkinlerde günde 200 mg dozda uygulanır. Maksimum dozu 300 mg'dır. Günde 2 veya 3 kez 50-100 mg'lık tabletler şeklinde oral yoldan kullanılır. Oral yoldan kullanma sonucunda oluşabilen istenmeyen tesirler diğer NSAII'larla oluşanlara benzer. Flurbiprofen kullanan hastaların %15-20'sinde GİK yakınmaları olabilir [1].

1.2. Kapiler Elektroferez

Elektroferez bir elektrik alanda itme veya çekme kuvvetleri ile yüklü türlerin (iyonların) hareketlerindeki farklılık olarak tanımlanır. Bir ayırma tekniği olarak elektroferez ilk olarak 1937'de Tiselius tarafından ortaya atıldı. Tiselius, bir tüp içindeki tampon çözeltiye protein karışımını koyarak ve elektrik alanı uygulayarak protein karışımdaki bileşenlerin hareketlilikleri ve yükleriyle belirlenen bir yönde ve hızda hareket ettiklerini buldu. Ayırma bilimindeki çalışması için Tiselius Nobel Ödülü aldı.

Tiselius'un deneyinde ayırma işleminin verimliliği termal difüzyon ve konveksiyonla sınırlıydı. Bu nedenle elektroferez, poliakrilamid veya agaroz jel gibi anti-konvektif ortamda yapılmaktadır. Nükleik asit ve protein gibi biyolojik makromoleküllerin boyutlarına bağlı ayırmaları için tüp (veya slub) içinde jeller kullanılmaktadır. En çok kullanılan ayırma tekniği olmasına rağmen, slub jel elektroferezde analiz süresinin uzunluğu, düşük verimlilik, otomasyon ve dedeksiyon sorunları bulunmaktadır.

Elektroforetik ayırmayı sağlayabilmek için slub formatına alternatif olarak dar tüp veya kapilerler kullanılmaya başlandı. Çünkü dar kapilerin kendisi anti-konvektif bir yapıdadır, jel ortam ise bu fonksiyonu yerine getirememektedir.

Açık tüp elektroferez ile ilgili ilk çalışmalar 1967'de Hjerten tarafından yapıldı. O zamanlarda sadece milimetrelük bore tüpler kullanılmaktaydı, Hjerten, konveksiyon etkisini

azaltmak için kapillerleri boyamsal ekseninde çevirdi. Later Virtanen ve sonra Mikkers elektroforez işlemini sırasıyla 200 µm iç çaplı cam ve teflon kapillerlerde gerçekleştirdiler. 1980'lerin başlarında Jorgenson ve Lukacs 75 µm iç çaplı fused-silicalar kullanarak tekniği ilerlettiler. Jorgenson ayırma işleminin teorisine de açıklık getirdi ve deneysel parametreler ve ayırma kalitesi arasındaki ilişkileri açıklayarak bir analitik teknik olarak yüksek performanslı kapiler elektroforezin kullanabilme potansiyelini gösterdi [7].

1.2.1. Elektroforez Teorisi

Elektroforez ile ayırma bir elektrik alanda çözünenlerin hızlarının farklılığına dayanır. Bir iyonun hızı aşağıdaki şekilde verilebilir,

$$v = \mu_e \cdot E \quad (1.1)$$

v: iyon hızı, μ_e : elektroforetik mobilite, E: uygulanan elektrik alan.

Basit olarak elektrik alan uygulanan voltajın ve kapillerin uzunluğunun (volt/cm) bir fonksiyonudur. Verilen bir iyon veya ortam için mobilite, o iyon için karakteristik bir sabittir.

Mobilite elektrik kuvvetinin, sürtünme kuvvetine oranı ile bulunur. Elektriksel kuvvet, sürtünme kuvveti ile dengelenir.

$$\mu_e \alpha = \frac{\text{Elektrikkuvvet}, F_E}{\text{Frictionalkuvvet}, F_F} \quad (1.2)$$

Elektrik kuvvet;

$$F_E = q \cdot E \quad (1.3)$$

ve küresel bir iyon için sürtünme kuvveti

$$F_F = -6\pi\eta r v \quad (1.4)$$

q; iyonun yükü, η ; çözünenin viskozitesi, r; iyon yarıçapı, v; iyon hızı

Sürekli bir elektroforez işleminde bu kuvvetler dengelenir ve bir noktada kuvvetler eşit olur fakat yönleri zıttır;

$$qE=6\pi\eta rv \quad (1.5)$$

Eşitlik 1.1 ve 1.5 birleştirilirse fiziksel parametreler bakımından mobilite aşağıdaki şekilde tanımlanır,

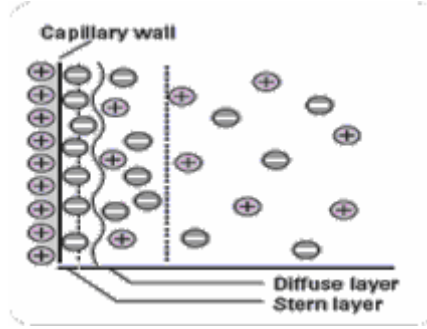
$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1.6)$$

Bu eşitlikten küçük ve yüksek yüklü türlerin mobilitesi yüksek iken, düşük yüklü türlerin mobilitesi düşüktür.

Genellikle standart tablolarda bulunan elektroforetik mobilite fiziksel bir sabittir, tam yüklü durum için bulunur ve sonsuza seyrelmeye ekstrapole edilir. Genellikle bu deneyle bulunandan farklıdır. Bu daha sonra etkin mobilite olarak (effective mobility) adlandırıldı ve bu genellikle pH (çözünenin ise pKa sına) ve tamponun bileşenine bağlıdır [7].

1.2.2. Elektroozmotik Akış

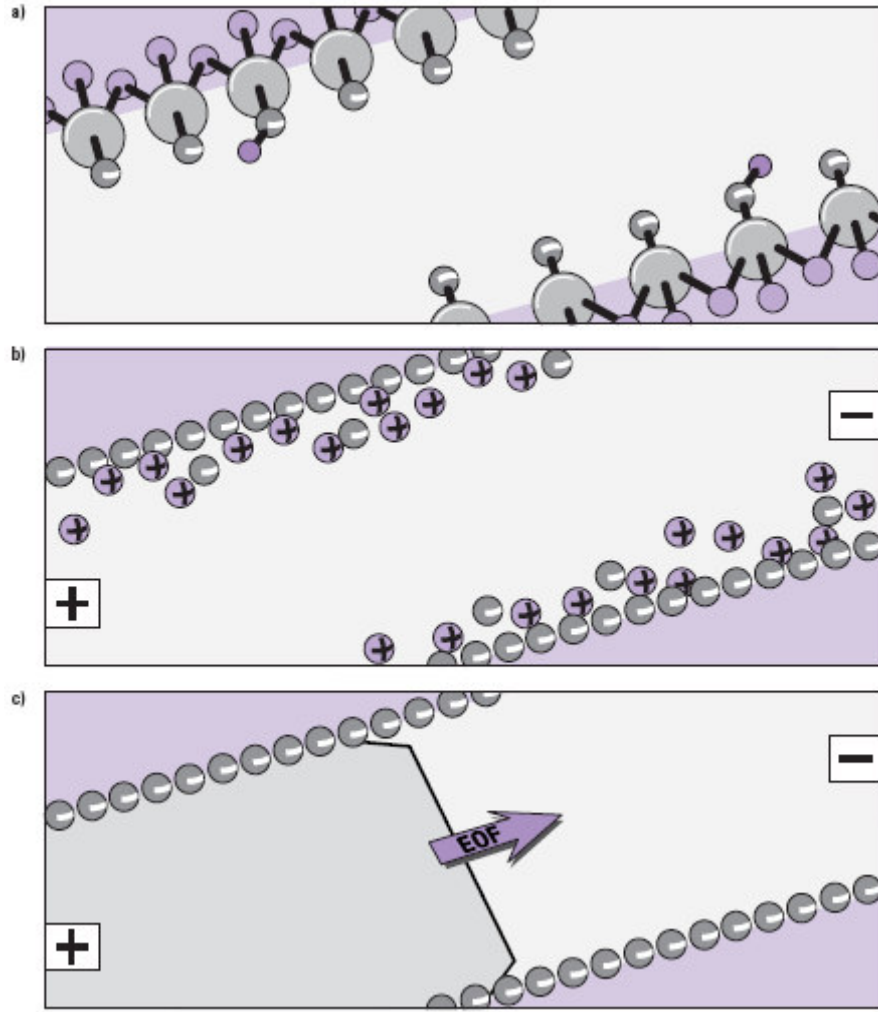
Kapiler elektroforez işleminin temel ögesi elektroosmotik, veya elektroendosmotik, akıştır (EOF). Elektroosmotik akış sıvının kapiler içinde yığın ekinde akışıdır ve kapilerin iç duvarındaki yüzey yükünün bir sonucudur. EOF kapiler duvarındaki çift tabakalı çözelti üzerine uygulanan elektrik alanının etkisinden kaynaklanır (Şekil 1.2). EOF, çözünenin mobilitesi üzerine akışın süperpozisyonlanmasıyla, çözünenin kapiler içinde kalma zamanını kontrol eder. Bu kapiler uzunluğunun değiştirilmesiyle de yapılabilir fakat seçicilik değişmeyecektir.



Şekil 1.2. Kapiler iç duvarındaki çift tabakanın gösterilmesi

Sulu ortamda katı yüzeylerin çoğu fazla negatif yüke sahiptir. Bu yüzeye iyonik türlerin adsorpsiyonundan ve/veya yüzeyin iyonlaşmasından (asit-baz dengesi) kaynaklanabilir. EOF en çok anyonik grup içinde var olabilen pek çok silanol (SiOH) grubu tarafından kontrol edilmesine rağmen, fused silika (SiO^-) için her ikisi de olabilir (Şekil 1.3-a). Fused silikanın pI değerini tam olarak belirlemek çok zor olmasına rağmen, EOF pH:4'ün üzerinde önemli olmaktadır. Tahminen anyonların adsorpsiyonundan kaynaklandığı düşünülmeyle beraber Teflon gibi iyonik olmayan materyallerde de EOF görülebilir.

Karşı iyonlar (genellikle katyonlar), yük dengesini sağlamak için yüzeye yakın dururlar, çift tabaka ve kapiler duvarının çok yakınında potansiyel farkı oluştururlar (Şekil 1.3-b). Bu Zeta Potansiyeli olarak bilinir. Kapilerin bir tarafından diğer tarafına doğru voltaj uygulandığında diffüz çift tabaka oluşturan katyonlar katoda doğru hareket ederler. Onların hareketleri kapiler içindeki yığın çözeltiyi katoda doğru sürükler, çünkü onlar solvatlaşırlar. Bu işlem Şekil 1.3-c'de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Elektroozmotik akışın oluşum süreci

a-Negatif yüklenmiş fused silika yüzeyi (Si-O⁻)

b-Hidratlaşmış kationların yüzey yakınına birikmesi

c-Elektrik alanı uygulandıktan sonra yığın çözeltinin katoda akışı

EOF' nin büyüklüğü hız veya mobilite olarak aşağıdaki gibi ifade edilebilir;

$$v_{EOF} = (\epsilon \zeta / \eta) E \quad (1.7)$$

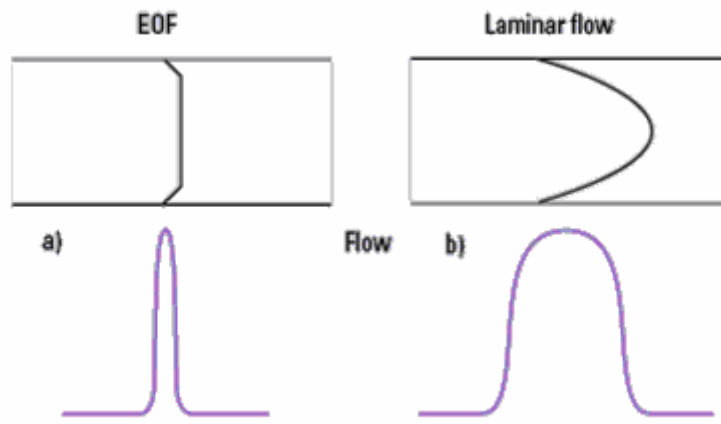
veya

$$\mu_{EOF} = (\epsilon \zeta / \eta) \quad (1.8)$$

burada; v_{EOF} : hız, μ_{EOF} : EOF 'mobility', ζ : Zeta potansiyeli, ϵ :Dielektrik sabiti

Aslında Zeta potansiyeli kapiler duvarı üzerindeki yüzey yüküyle belirlenir. Çünkü bu yük çok kuvvetli bir şekilde pH'a bağlıdır, EOF'nin büyüklüğü ise pH' la değişir. Yüksek pH'da, bu durumda silanol grupları genellikle deprotonlanmış durumdadır, EOF düşük pH'dakinden daha büyüktür, düşük pH'larda ise silanol grupları protonlanmıştır. Özel durumlara bağlı olarak, EOF pH 2-12 arasında birden farklı derecede değişir.

Çift tabaka teorisinde bahsedildiği gibi, zeta potansiyeli tampon çözeltinin iyonik kuvvetine bağlı olarak da değişir. İyonik kuvvetin artması çift tabakayı sıkıştırır, zeta potansiyeli azalır ve EOF düşer.



Şekil 1.4-a ve-b. Akış profili ve bunlara karşılık gelen çözünen zonları

Kapiler içinde EOF'un eşsiz bir özelliği akış profilinin düz olmasıdır (Şekil 1.3-c). Kapiler boyunca yürütücü akış gücü aynı bir şekilde olduğu için, kapiler içinde basınç yoktur ve neredeyse her yerde aynıdır. Bu düz akış profili yararlıdır çünkü bu çözünen zonların dispersiyonuna katkıda bulunmaz. Aksine kapiler duvarında gücün paylaşılmasından dolayı bu parabolik veya laminar akış sağlayan bir dış pompayla oluşturulur (Şekil 1.4). Şekil 1.4-a kapiler duvarında akış hızının hızlı bir şekilde düştüğünü gösterir. Bu hareketsiz çözelti tabakası yüzeydeki akışa karşı sürtünme oluşturur. Bu, nispeten tüm ayırma işleminde önemsizdir. Üstelik genelde akış hızı ve akış profili kapilerin iç çapından bağımsızdır. Bununla birlikte eğer kapilerin iç çapı çok genişse ($\geq 200-300 \mu\text{m}$) akış profili bozulacaktır. Bu durumda kapiler duvarında oluşan hızda sınırının merkezinde yüzey gerilimi sürtünmeyi ani tutmak için yetersiz olur [7].

1.2.3. Kapiler Elektroferez Modları

CE'nin çok yönlü kullanılabilmesi yöntemin farklı kullanım modlarından gelmektedir. Her moda ayırma mekanizması farklıdır ve böylece tamamlayıcı bilgiler verirler. Kapiler elektroferez başlığının kapsadığı temel metotlar; kapiler zon elektroferez (capillary zone electrophoresis-CZE), micel elektrokinetik kromatografi (micellar electrokinetic chromatography-MECK), kapiler jel elektroferez (capillary gel electrophoresis-CGE), kapiler izoelektrik odaklama (capillary isoelectric focusing-CIEF) ve kapiler izotakoforesis (capillary isotachopheresis-CITP) (Tablo 1.1). Bunların çoğunda tampon bileşenlerini değiştirerek birbirine geçilebilir [7].

Tablo 1.1. Kapiler elektroferez modları

Mod	Ayrmanın temeli
Kapiler zon elektroferez	Serbest çözelti mobilitesi
Micel elektrokinetik kromatografi	Miseller ile hidrofobik-iyonik etkileşimler
Kapiler jel elektroferez	Boyut ve yük
Kapiler izoelektrik odaklama	İzoelektrik nokta
Kapiler izotakoforesis	Göç sınırı

1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Kromatografi; mobil faz ile sabit faz arasında bileşenlerin denge dağılım katsayılarının farklı olmasının sonucu olarak bileşenlerinin ayrılmasını sağlayan bir analitik tekniktir. c_s ve c_m bileşenlerin sırasıyla sabit ve hareketli (mobil) fazdaki derişimleri olmak üzere;

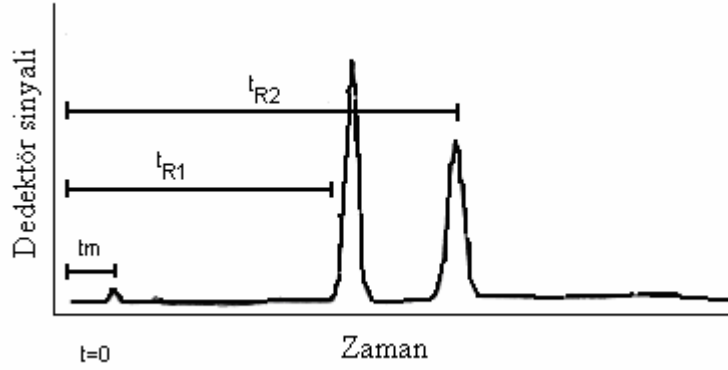
$$K=c_s / c_m \quad (1.9)$$

Bir molekülün hareket etmesi, molekül sadece mobil faz içindeyken mümkündür. Bir molekülün hareket hızı molekülün dağılım katsayısı ile ters orantılıdır, bu yüzden sabit faz üzerinde yüksek dağılım gösteren bileşikler kolon boyunca daha yavaş hareket eder. Böylece sabit faz üzerinde düşük dağılım gösteren bileşenler ayrılmış olacaktır. Göç hızlarındaki bu farklılık olmazsa ayırma yapılamaz.

Sonuç olarak bir molekülün sabit faz üzerinde göç hızı: mobil fazın bileşimi, sabit faz ve sıcaklık gibi dağılmayı etkileyen deneysel parametrelere bağlıdır. Dağılma katsayısına kolon basıncının etkisi, sıvı kromatografisinde kullanılan basınçlarda ihmal edilebilir.

Kolon boyunca kromatografik zonlar mobil fazın hızından daha az bir hızla hareket ederler. Örnek bandının hareket hızının, hareketli fazın hareket hızına oranı gözlenebilme faktörü (retention factor, R) olarak tanımlanır.

Maksimum pik elüsyon zamanı (retention time t_R) denge dağılma katsayısı ile ilgilidir. Şekil 1.5 iki bileşenli karışımın t_{R1} ve t_{R2} gözlenme zamanları ile ayrımını gösterir.



Şekil 1.5. İki bileşenli karışımın ayrılması

Elüsyon zamanı, mobil fazın hızının bir fonksiyonudur ve bir bileşenin kolondan elüe edilmesi için gereken hacim elüsyon hacmidir (retention volume V_R).

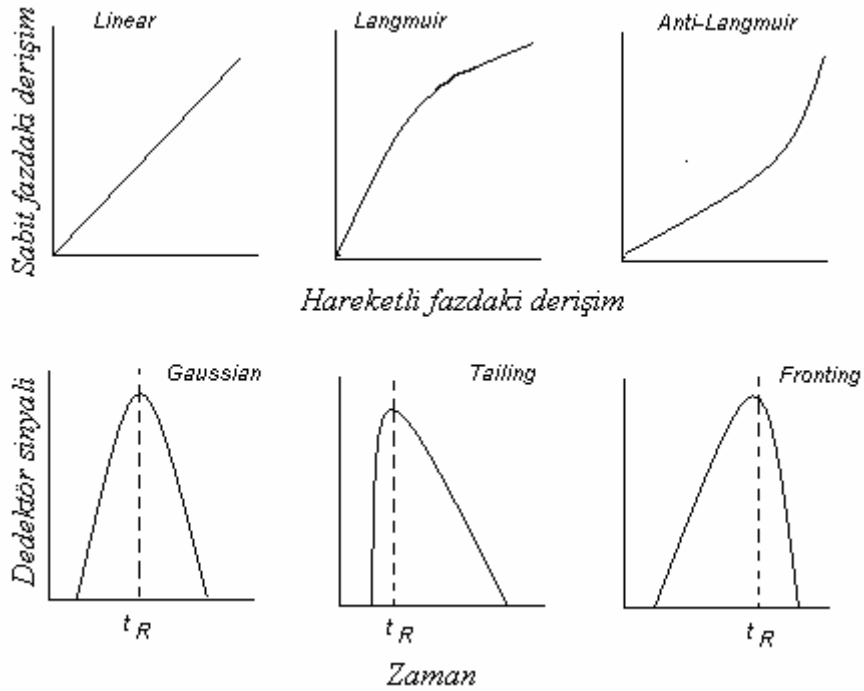
$$V_R = F \cdot t_R \quad F: \text{mobil fazın akış hızı} \quad (1.10)$$

Şekil 1.5 deki ilk pike (retained component, retention time: t_m) neden olan bileşiğin sabit fazdaki dağılma katsayısı sıfırdır bu nedenle bu bileşik ya adsorplanmamıştır ya da çözünmemiştir. Böylece bu bileşen kolondan mobil faz ile aynı hızda geçer. Kolonun hacmi ise aşağıdaki eşitlik ile verilir.

$$V_m = F \cdot t_m \quad (1.11)$$

Mobil faz hacmi veya ölü hacim ayırmaya katkı sağlamaz ve kolonun geometrisine ve dolumuna bağlıdır. İnjesiyon sisteminin de mobil faz hacmine katkısı olacaktır. Böylece katkılar kolon içi ve kolon dışı nedenlerden kaynaklanabilir. Gaz kromatografisinde kolon dışı etkiler ihmal edilebilir fakat sıvı kromatografisinde bunlar göz önüne alınmalıdır. Bu nedenle ölü hacmi minimuma indirmek için injesiyon sistemine ve detektör tasarımına özel bir dikkat verilmelidir.

Sıvı kromatografisinde mobil fazın sıkışmadığı ve mobil faz basıncı ve akış hızının kolon boyunca sabit olduğu kabul edilir. Kromatogramdaki Gaussian eğrisine benzer bir pikin elüsyonu ile sabit ve mobil fazdaki örnek molekülünün konsantrasyonları arasında lineer bir ilişki ortaya çıkar. Bu şartlarda gözlenme zamanı örneğin boyutundan bağımsızdır. Eğri halinde çıkan pikler Şekil 1.6'da gösterildiği gibi lineer olmayan bir dağılımın sonucudur ve bu durumda gözlenme zamanı örnek konsantrasyonuyla değişecektir.



Şekil 1.6. Üç temel izoterm eğrisi ve bunların pik şekline ve gözlenme zamanına etkisi

Eğer örnek yeteri kadar küçük ise lineer olmayan izoterm için bile simetrik Gaussian pikleri elde edilebilir ve gözlenme zamanları da değişmeyecektir.

Dağılma kromatografisi için temel gözlenme eşitliği band genişlemesini ve lineer olmama durumu ihmal edilirse;

$$V_R = V_m + KV_s \quad (1.12)$$

V_R gözlenme hacmi, V_m mobil faz hacmi, V_s sabit fazın hacmi ve K denge dağılma katsayısıdır.

Adsorpsiyon kromatografisinde sabit fazın hacmi adsorbanın yüzey alanı ile yer değiştirir.

$$V_R = V_m + KA_s \quad (1.13)$$

V_m ayırma işleminde çok önemli rol oynamaz ve bir karışımın tüm bileşenleri için sabittir ve genellikle net gözlenme hacmi (V_N) kullanılır;

$$V_N = V_R - V_m \quad \text{veya} \quad V_N = K \cdot V_s \quad (1.14)$$

Adsorpsiyon kromatografisinde net gözlenme hacmi genellikle kolon üzerindeki adsorbanın kütlesi (W_a) için normalize edilebilir, yani;

$$V_N^o = V_N / W_a \quad (1.15)$$

Eğer ayırmaya bağımsız birkaç farklı gözlenme mekanizması katkı yapıyorsa, örneğin iyon kromatografisinde olduğu gibi, net gözlenme hacmi değişik mekanizmalardan gelen gözlenme hacminin toplamı olacaktır.

Temel bir kromatografi parametresi olan kapasite faktörü k' ile gösterilir.

$$k' = n_s / n_m \quad (1.16)$$

n_s ve n_m çözünenin sabit ve mobil fazdaki mol sayılarıdır.

Çözünen molekül mobil faz içinde iken sadece kolondan aşağı doğru hareket edeceğinden gecikme faktörü (reterdation factor R);

$$R = \frac{\text{Çözünenin hareketli fazdaki miktarı}}{\text{Çözünenin hareketli ve sabit fazdaki toplam miktarı}} = \frac{n_m}{n_m + n_s} = \frac{1}{1 + k'} \quad (1.17)$$

Denge dağılım katsayısı K olduğundan;

$$k' = K (V_s/V_m) \quad (1.18)$$

Eşitlik 1.12 ve 1.18'den;

$$V_R = V_m(1 + k') \quad (1.19)$$

$k=0$ alınır;

$$V_R = V_m \quad (1.20)$$

olacaktır ve bu durumda hiçbir ayrılma gözlenmeyecektir.

Eğer kromatografik zonun ortalama lineer hızı v ve L (cm) ise t_R (saniye) zamanında;

$$t_R = L/v_m$$

Benzer şekilde çözücü molekülleri için veya gözlenmeyen bileşik (unretained compound) için kolon boyunca;

$$t_m = L/v_m \quad (1.21)$$

Eşitlik 1.19'dan gözlenme zamanları t_R ve t_m cinsinden;

$$t_R = t_m(1 + k') \quad (1.22)$$

veya yeniden düzenlenirse

$$k' = (t_R - t_m) / t_m \quad (1.23)$$

eşitlik 1.22 ve 1.23 den

$$t_R = (L/v) \cdot (1 + k') \quad (1.24)$$

Böylece gözlenme zamanı t_R kolon uzunluğu ile doğru orantılı ve mobil fazın lineer akış hızı ile ters orantılıdır [8].

Eşitlik 1.23 bir karışımdaki bileşenler için k' değerinin bulunabileceğini gösterir. t_m parametresi birkaç yolla bulunabilir. Eğer bir örnek olarak enjekte edilen molekül daha zayıf çözücü özelliğine sahipse t_R değeri t_m değerine eşit olacaktır (pentan mobil faz olarak hekzan içine enjekte edilirse). İkinci metot sıcaklıkla değişen denge sabitine ve gözlenme zamanlarına bağlıdır. Eğer sıcaklık değiştiğinde t_m değerinde bir değişiklik yoksa molekülün

tutulmadığı kabul edilebilir. Üçüncü metot ise nadiren kullanılan radyoaktif olarak işaretlenmiş çözücü molekülleri ve ışımaya dedektörü kullanmaktır [8].

1.4. İnce Tabaka Kromatografisi

1.4.1. İnce Tabaka Kromatografisinin Mekanizması ve Teorisi

İnce tabaka kromatografisi sıvı kromatografisinin bir alt dalıdır. İTK’da hareketli faz sıvı, sabit faz ise düz bir yüzey üzerine ince bir tabaka halinde yayılmış silika, alumina v.s. gibi maddelerdir. Sabit fazın düzlemsel bir yüzey olmasından dolayı İTK, kağıt kromatografisi gibi düzlemsel sıvı kromatografisi olarak da bilinmektedir.

Hareketli faz; çözünen türlerin kapiler etkilerle durgun faz üzerinde hareket ederek ayrılmasını sağlayan taşıyıcı ortamdır. İTK’da çözünen maddelerin hareketi iki zıt kuvvetin bir sonucu olarak ortaya çıkar; hareketli fazın yürütücü kuvveti ve sorbentten direnci veya geciktirme etkisi. Hareketli fazın yürütücü kuvveti, çözünen maddeleri hareketli fazın akış yönünde orjinden taşıma eğilimindedir. Sorbentten kaynaklanan geciktirici karşı kuvvet ise çözünmüş molekülleri sorbent üzerinden hareketli faza sürükleyerek onların hareketini engeller. İTK’da kromatografik zonlar sabit bir şekilde ileri doğru taşınmasına rağmen, herhangi bir zaman için zon içindeki moleküllerin sadece belli bir fraksiyonu hareket eder. Yürütme işleminin sonucunda, her zon belli bir mesafe kadar göç eder. Partikül boyutu ve tabaka yüzeyindeki heterojenlikten dolayı moleküllerin hareketindeki değişim zonların yayılmasına neden olur. Verilen bir zaman için çözünen her zonun orjinden olan uzaklığı yürütücü ve geciktirici kuvvetlerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Yavaş hareket eden moleküller sabit faz ile daha kuvvetli etkileşim yaparken, hızlı taşınan moleküllerin sabit faz ile etkileşimi daha az ve hareketli faz içindeki çözünürlükleri de daha fazladır.

Bir karışım içindeki bileşenlerin göç hızlarında farklılık sağlamak, kromatografik sistemin kapasitesi, verimliliği ve seçiciliğiyle ilgilidir. Hareketli fazın akış hızı seçici değildir, adsorplanmamış tüm moleküller için aynı etkiyi gösterir. Bununla birlikte kromatografik sistemin bir parçası olarak mobil faz seçicidir çünkü çözünenlerin bağlı sorplanabilirliğinin belirlenmesinde kullanılır. Tabakanın geciktirici etkisi de seçici bir

kuvvettir. Aksi takdirde tüm çözünmüş veya adsorplanmamış bileşenler hareketli faz içerisinde aynı zamanı harcarlardı.

Bir çözünenin sabit faz ile etkileşim derecesi Eşitlik 1.9'daki gibi tanımlanır. Burada K dağılma katsayısı, c_s çözünenin sabit fazdaki denge konsantrasyonu, c_m ise çözünenin hareketli fazdaki denge konsantrasyonudur. Büyük K değerine sahip çözünenler sabit faza büyük bir eğilim gösterir ve tabaka boyunca yavaş hareket edeceklerdir (düşük R_f değeri ile). K değerleri arasındaki fark oldukça büyük olan çözünenler için ayırma çok daha kolaydır [9].

1.4.2. İnce Tabaka Kromatografisinin Sınıflandırılması

Yapısına bağlı olarak tabaka moleküllerin ayırmasını (1) çözünenlerin çözeltilen, tabaka partiküllerinin yüzey aktif gruplarına fiziksel sorpsiyonuyla (adsorpsiyon), (2) tabaka üzerinde tutulan sabit sıvıda moleküllerin çözülmesiyle (dağılma), (3) iyonların tabakanın zıt yüklü kısımlarıyla etkileşmesiyle (iyon değiştirme) veya molekül boyutlarına veya (4) şekillerine bağlı olarak çözünenlerin tutulması (boyut eleme) ile sağlar.

Adsorpsiyon ve dağılma arasındaki sınır oldukça belirsizdir çünkü her ikisi de aynı tip fiziksel kuvvetlere neden olur, yani sürekli dipol-dipol kuvvetleri ve hidrojen bağları. Asıl ayırma işlemi yukarıda belirtilen dört temel mekanizmanın bir kombinasyonu halinde gerçekleşir.

Direk veya normal faz İTK'da (NP-TLC), tabaka (silika veya alumina) hareketli fazdan daha polardır; polar çözünenler orjin yakınında kuvvetli bir şekilde tutulur. Ters faz İTK'da (RP-TLC) tabaka (C2-C18 hidrokarbon emdirilmiş silikajel), hareketli fazdan daha az polardır; apolar çözünenler kuvvetli bir şekilde orjin yakınlarında tutulur. Normal faz İTK'da en güçlü hareketli faz en polar olanlar iken, ters faz İTK'da daha az polar çözünenler daha kuvvetli etki gösterir.

1.4.3. Kromatografik Performans Kriterleri ve Bunların İTK ile İlişkileri

İTK'da dahil olmak üzere tüm kromatografik tekniklerde temel amaç bir karışım içerisindeki bileşenleri ayırmaktır. İki kromatografik zonun çözünürlüğü (resolution, R); zon

merkezleri arasındaki uzaklığın, zon genişliklerinin (W) ortalamasına bölünmesiyle hesaplanabilir.

Bu eşitlik için gerekli değerler tabaka üzerindeki gerçek zon çapının milimetrelık bir cetvelle ölçülmesiyle veya zonların densitometrik taranması ile bulunabilir. Teorik tabaka sayısının (N) hesaplanması için de aynı ölçümlerden faydalanılabilir. Kabul edilebilir bir ayırmanın yapılabilmesi için R değerinin en az 1 olması gerekmektedir.

Verimlilik teorik tabaka sayısının ya da tabaka yüksekliğinin hesaplanmasıyla belirlenir.

$$N = 16 \left(\frac{X}{W} \right)^2 \quad H = \frac{W^2}{16X} \quad (1.25)$$

Burada x verilen zonun merkezinden orjine olan uzaklıktır (mm) ve W ise zonun genişliğidir. Klasik İTK tabakalar yaklaşık olarak 600 teorik tabakaya sahip iken, yüksek performanslı tabakalar 10 cm'lik bir yürütme için 5 000'e kadar çıkmaktadır. Klasik ve yüksek performans ince tabakaların çeşitli özellikleri bakımından karşılaştırılması ile ilgili veriler Tablo 1.2'de verilmiştir. 5 µm partikül boyutlu ve 25 cm×4.6 mm boyutundaki bir YBSK kolonunda teorik tabaka sayısı 10 000-15 000 arasında değişmektedir. Kapiler ve megabor YBSK kolonlarında bu sayı daha da artmaktadır. Bir GC kolonu metre başına 2 500-3 000 teorik tabaka bulundurur. Kapiler GC kolonları metre başına yaklaşık olarak 5 000 teorik tabaka içermektedir. HPTLC'de tipik tabaka yüksekliği 12 µm iken YBSK'da 6-10 µm arasında değişmektedir. Partikül çapının, çözünenin difüzyon katsayısının ve yürütme zamanının artmasıyla ortalama tabaka yüksekliği artar [9].

Tablo 1.2. Klasik ve yüksek performanslı ince tabakaların karşılaştırılması

Parametre	Klasik ince tabaka	Yüksek performanslı tabaka
Partikül boyutu (µm)		
Ortalama	20	5-15
Dağılım	10-60	12
Adsorplayıcı tabakanın kalınlığı(µm)	100-250	200
Tabaka yüksekliği (µm)	30	5-20
Kullanılabilir toplam tabaka sayısı	<600	>5000
Ayrırma sayısı	7-10	10-20
Örnek hacmi (µL)	1-5	0.01-0.2
Başlangıç spot çapı	3-6	1-2
Ayrılmış spotların çapı (mm)	6-15	2-6
Çözücü göç mesafesi (cm)	10-15	3-6
Ayrırma zamanı (dk)	30-200	3-20
Tayin limiti (ng)		
Absorpsiyon	1-5	0.1-0.5
Fluoresans	0.05-0.1	0.005-0.01

Ayrırma sayısı (separation number, SN) veya spot kapasitesi; verilen bir ayırma mesafesi için $R_f = 0$ ile $R_f = 1$ çözünürlüğü en az 1 olan, ayrılabilir maksimum spot sayısıdır. Ayrırma sayısı deneysel olarak aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanır.

$$SN = \frac{Z}{b_0 + b_1 - 1} \quad (1.26)$$

Burada Z net göç uzaklığı, b_0 $R_f=0$ 'daki spot için bant genişliği, b_1 $R_f=1$ 'daki spot için bant genişliğidir. Kapiler kontrolü HPTLC için ayırma sayısı 10-20 aralığında iken, TLC için bu sayı 7-10 aralığına düşmektedir.

Çözünürlüğün hesaplanmasında kullanılabilir bir diğer eşitlik de;

$$R = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) (N)^{1/2} \left(\frac{k'}{1 + k'} \right) \quad (1.27)$$

Bu eşitlik çözünürlüğün üç faktörün bir fonksiyonu olduğunu göstermektedir; seçicilik (α), teorik tabaka sayısı (N) ve kapasite faktörü (k'). Yukarıda da bahsedildiği gibi seçicilik zon merkezlerinin iyi bir şekilde ayrılabilirliği ile ilgilidir, aksine teorik tabaka sayısı ise kromatografik sistem boyunca zon genişlemesini ölçer. YBSK'da kapasite faktörü kolon hacmi göz önüne alınarak ifade edilir ve değer 1-10 aralığındadır. Lineer İTK'da;

$$k' = \frac{1 - R_f}{R_f} \text{ ve } R_f = \frac{1}{1 + k'} \quad (1.28)$$

Genellikle k' , mobil fazın gücü değiştirilerek kontrol edilebilse de sabit faz da değiştirilebilir. Maksimum çözünürlük için α ve N büyük, k' ise optimum aralıklar içinde olmalıdır. Optimum çözünürlük için k' değeri dairesel ve dairesel olmayan İTK'da sırasıyla 1 ve 100'dür. Bunlara karşılık gelen optimum R_f değerleri ise 0.009 ve 0.5'dir. Böylece dairesel yürütme ile düşük R_f değerine sahip iyi ayırmalar yapılabilir.

Bir kromatografi (gaz ve sıvı)kolonu içerisinde verimliliği etkileyen bağımsız üç yayılma mekanizması, Van Deemter eşitliği ile açıklanmaktadır.

$$H = A + \frac{B}{v} + C \quad (1.29)$$

Bu eşitlikte H ; teorik bir tabakanın yükseklik eşdeğeridir, düşük H değerlerinde yüksek verimlilik gözlenmektedir. A terimi, farklı örnek moleküllerinin kolon boyunca eşit olmayan akış hızlarında akmasından kaynaklanan Eddy difüzyonla ilgilidir. B terimi ise boylamsal moleküler difüzyonla ilgilidir. Hareketli ve sabit faz arasındaki kütle transferinden kaynaklanan dengesizlikler ise C terimiyle verilmektedir. Klasik Van Deemter eşitliği, yüksek verimlilik için İTK'da önemli olan bazı deneysel faktörlerin de eklenmesiyle modifiye edilmiştir. Eğer yüksek performans tabakalarda olduğu gibi partiküller daha düzenli ve sıkıştırılmaları da düzenli ise eşitlikteki A değeri daha da düşecektir. Küçük partikül boyutu dengeye varma olasılığını arttıracığından dolayı C değerini de düşürecek. Yüksek performanslı ince tabakalarda normal hareketli faz akış hızlarında kütle transferine karşı olan direnç ihmal edilebilir, fakat klasik ince tabakalarda partikül boyutu daha büyük olduğundan kütle transferine karşı olan direnç ihmal edilemez. Kapiler akış kontrollü şartlar altında boylamsal moleküler difüzyonla bant genişlemesi büyük ölçüde kontrol edilebilir [9].

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Biyolojik örnekler ve tabletler de dahil olmak pek çok örnekte flurbiprofen tayini için genellikle YBSK, KE ve İTK gibi kromatografik teknikler kullanılmaktadır.

Flurbiprofen de içeren profenlerin tayini için, türevlerini oluşturmak suretiyle lazer eşleşmiş kapiler elektroforez kullanılmış ve sonuçlar YBSK'dan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Elektrolit olarak 2.4 mM β -siklodekstrin içeren $\text{NH}_4\text{Ac-HAc}$ tamponu (pH 3.1) kullanılmıştır [10]. Kapiler elektroforez çalışmalarında genellikle silika kapiler kullanılmasına rağmen NSAİ grubu ilaçların analizinde histidin ile yüzeyi modifiye edilmiş kapilerin kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Bu amaçla kapiler kolonun silanol grupları %10'luk (v/v) m-ksilen içerisinde 3-klorotrimetoksisilan ile 110 °C'de aktive edildikten sonra histidin ile modifiye edilmiş ve profen grubu yedi ilaç etken maddesi ayrılmıştır [11]. Flurbiprofen ve/veya ibufren içerdiği bilinen toplam on adet tablet ve kremde CE kullanılarak yapılan analizde tabletlerde iddia edilen ilaç etken madde miktarlarının analiz sonuçları ile uyduğu görülmektedir. Bu çalışmada flurbiprofen için tayin limiti 0.1 mg L⁻¹ ve ibufren için ise 0.5 mg L⁻¹ olarak bulunmuştur [12]. 3 μm partikül çaplı oktadesil silan bağlı silika kapiler kolonlar da YBSK ile profen grubu ilaçların ayrılmasında kullanılmaktadır [13]. CE'de susuz elektrolit kullanarak on üçe yakın NSAİ grubu ilaç etken maddeyi ayırmak da mümkündür. Bu amaçla metanolde hazırlanmış 50 mM amonyum asetat-13.75 mM amonyak karışımı kullanılmış ve 25 °C'de 11, 36 °C'de 13 NSAİ grubu ilaç etken madde birbirinden ayrılmıştır [14].

İnsan plazma ve idrarındaki flurbiprofenin ve onun yükseltgenmiş bir metaboliti olan 4-hidroksiflurbiprofenin analizi için YBSK'nın kullanıldığı bir çalışmada herhangi bir ekstraksiyon metodu kullanılmadan analizler gerçekleştirilmiştir [15]. Hareketli faz olarak metanol-1% (v/v) suda hazırlanmış fosforik asit, 80:20 (v/v) ve YBSK tekniği kullanılarak rat plazmasındaki flurbiprofenin farmokinetiği ve deri üzerindeki birikimi çalışılmıştır [16]. Ters faz kolonun kullanıldığı bir YBSK çalışmasında flurbiprofen için tayin limiti 15 ng mL⁻¹ iken, aynı çalışmada UV ile yapılan deneyler sonucunda tayin limiti 0.34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır [17]. Kromatografik tekniklerle tabletlerde ilaç etken madde analizlerinde genellikle öğütme ve basit bir ekstraksiyon yöntemi yeterli doğruluk ve hassasiyette analiz imkânı sağlamasına rağmen katı faz ekstraksiyonu yönteminin kullanıldığı çalışmalar da

mevcuttur. Katı faz olarak Sep-Pak Silica kartuşlar ve elüent olarak da etil asetat kullanılmış ve 11 adet NSAİ grubu ilaç etken madde başarılı bir şekilde bir birinden ayrılmıştır [18]. Plazma gibi biyolojik örneklerde ise basit ekstraksiyon metotlarının yeterli olmayacağı bilinmektedir. Bu tür biyolojik örneklerde ilaç etken maddelerin analizi için geliştirilen bir yöntemde, örnek içindeki protein gibi makromoleküllerin yarı geçirgen bir membran yardımıyla ayrılması ve böylece analizin daha da kolaylaşması amaçlanmıştır. İlaçların, proteinlere bağlanabileceği de göz önüne alınarak bu etkiyi azaltmak için farklı stratejiler de geliştirilmiştir [19].

Son zamanlarda kromatografik teknikler kütle spektrometrisi ile on-line bağlantılı olarak da kullanılmaktadır. Bu ikili sistemin birlikte kullanıldığı, son yıllarda yapılan bir çalışmada katı faz ekstraksiyon metodu kullanılarak plazmadaki flurbiprofen ekstrakte edilmiş ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (HPLC-MS) ile analiz edilmiştir. Bond Elut Certify katı faz kartuşları ve elüent olarak da %1'lik amonyum hidroksit içeren metanol kullanılmıştır [20]. NSAİ grubu ilaçlardan daha az gastrointestinal toksisite gösterdiği bilinen ve azot monoksit açığa çıkarıcı seçici siklooksijenaz tip-2 inhibitörlerden (NO-NSAIDs) biri olan HCT1026 (NO-flurbiprofen) ve metabolitleri olan HCT1027 ve flurbiprofenin rat plazma ve beyin dokularında analizi amacıyla da HPLC-MS kullanılmıştır [21]. NSAİ grubu ilaçların sadece insanlarda değil hayvanlarda da kullanıldığı ve uzun süreli kullanımlarda toksik etki gösterdiği bilinmektedir. Bu doğrultuda NSAİ grubu 14 ilaç etken madde elektrosprey iyonlaştırıcı kullanılarak HPLC-MS/MS [22] ile, YBSK ile rat plazmasında [23,24] analiz edilmiştir. İlaç etken maddelerin kendileri kadar parçalanma ürünlerinin analizi de son yıllarda önem kazanmaktadır. GC-MS ile fotokimyasal bir reaktör içerisinde flurbiprofenin parçalanma ürünleri de tanımlanmıştır [25].

Kiral bir merkeze sahip olan ve R ve S olmak üzere iki enantiyomeri bulunan flurbiprofenin enantiomerik ayrılması ve tayini ile ilgili çalışmalar da son yıllarda gittikçe önem kazanmaktadır. Bu amaçla aynı bir çalışmada dört farklı yöntem geliştirilmiştir; (1) hareketli faza kiral bir katkı ve ters fazlı YBSK (RP-HPLC) ile analiz, (2) (R)-1-(naphthen-1-yl)ethylamine ile ön kolon türevlendirme yapılarak RP-HPLC analiz, CSP (Chiralpak AD) (3) ve CSP (Chiralpak AD) (4) kiral kolon içeren YBSK ile analiz [26]. CSP (Chiralpak AD) kolonunun kullanıldığı bir diğer çalışmada flurbiprofen ve 4-hidroksi metabolitlerinin analizi plazmada yapılmıştır [27]. R ve S-flurbiprofen glukuronidlerin ayrılması için de TSKgel ODS-80Ts kolonu kullanılarak YBSK ile analizleri yapılmıştır. Hareketli faz olarak 20 mM

amonyum asetat tamponu (pH:5.6)-etanol-asetonitril karışımı kullanılmıştır [28]. R ve S-flurbiprofenin enantiomerik ayrılması [29-36] ve enantiomer miktarlarının tayini için geliştirilmiş analitik yöntemler bulunmaktadır [4,37-39]. Kiral bir selektör ile doldurulmuş kapiler sabit fazlar da NSAİ grubu ilaçların enantiomerik ayrılmasında kullanılmıştır [40]. Kiral selektör olarak vancomycin [41,42], β -siklodekstrin ve türevleri [43,44], makrosiklik antibiotik [45] . Kiral selektörlerin kromatografik tekniklerle birlikte daha yaygın bir kullanım alanı bulunmasına rağmen, potansiyometrik membran elektrot olarak kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur [46,47].

Tablo 2.1. Flurbiprofen tayini ve enantiomerik ayrılması için geliştirilen kromatografik yöntemler

Kullanılan Teknik	Lineer çalışma aralığı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Tayin limiti ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Referans
CE	10-70 ^b	0.24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1.1 μM)	11
CE	1-60	0.1	12
CE	1.6-45 ^a	0.16 ^a	10
YBSK	2.9-50 ^a	0.29 ^a	
YBSK	0.1-10	0.1	16
YBSK	0.05-1	0.015	17
UV	1-20	0.34	
YBSK	0.25-15	0.5 (idrarda) 0.25 (plazmada)	15
YBSK	0.05-10	-	27
YBSK	0.05-10	0.05	18
YBSK	1-15	0.01	19
YBSK	0.05-5	0.05	23
YBSK	-	2.5	24
YBSK	2-18 (S enantiomer)	4.7 ^f	4
CLC	-	3	13
HPLC-MS	10-500 ^c	5 ^c (gözlenebilme limiti)	20
HPLC-MS	25-300	-	22
HPLC-MS	0.13-300 ^d (plazmada) 0.3-30 ^e (beyinde)	0.13 ^d (plazmada) 0.3 ^e (beyinde)	21

^a fmol pmol⁻¹

^b ng mL⁻¹

^c nmol mL⁻¹

^d μM

^e nmol g⁻¹

^f pg

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Reaktifler

Flurbiprofen (Sigma) herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmadan kullanıldı. Deneyler boyunca analitik saflıkta H_2O_2 , HCl ve NaOH (Merck), kromatografik saflıkta kloroform, etil asetat, ksilen, karbon tetra klorür, etanol, metanol (Merck) kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

Flurbiprofen stok çözeltilerinin hazırlanması için gerekli miktarda flurbiprofen tartılarak metanol içerisinde çözüldü. YBSK ve KE çalışmalarında 0.05-0.1-0.25-0.5-1.0 $\mu g mL^{-1}$ derişimlerinde, İTK çalışmalarında ise 50-100-200-300-400-500-600 ng spot⁻¹ derişimlerinde çözeltiler hazırlanarak kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Daha seyreltik flurbiprofen çözeltileri ise metanol ile seyreltilerek hazırlandı. HCl, H_2O_2 ve NaOH çözeltileri gerekli miktarda bazın tartılması ve gerekli hacimlerde derişik asitlerin alınıp saf suyla istenilen hacme tamamlanmasıyla hazırlandı.

3.1.3. Kullanılan Aletler

Kapiler elektroforez ile ilgili çalışmalarda 50 μm iç çaplı, toplam 65 cm uzunluğunda ve dedektöre kadar olan etkin uzunluğu 56.5 cm olan kaplanmamış silika kapiler içeren HP^{3D}CE (Hewlett-Packard) cihazı kullanıldı. Günlük olarak deneysel çalışmalara başlanmadan önce, kapiler 1 dk boyunca metanol, 3 dk boyunca tampon çözelti ve son olarak tekrar 5 dk boyunca metanol ile yıkandı. Çalışmalarda 20 kV'luk elektrik potansiyeli kullanıldı. Çalışma şartlarında kapiler sıcaklığı sabit 25°C'de tutuldu. Çözeltiler, hidrodinamik olarak kapiler girişine 4 sn süre ile 3.4 kPa basınç uygulanarak enjekte edildi. Sonuçların değerlendirilmesi ise ChemStation yazılımı yardımıyla yapıldı.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ilgili çalışmalarda üzerinde ters faz kolon içeren HPLC (Agilent 1100 dedektör, Agilent degasser, Agilent pompa) cihazı kullanıldı.

Günlük çalışmalara başlamadan önce ve her kullanım sonrasında kolon metanol ile yıkandı. Sonuçların değerlendirilmesi ise ChemStation yazılımı yardımıyla yapıldı.

İnce tabaka kromatografisi ile ilgili çalışmalarda Camag marka HPTLC cihazı (Camag Linomat V-100 μL , Camag Scanner III) kullanıldı. Sabit faz tabakalar (Merck) deney öncesinde metanol ile yıkandı ve 50°C de 5 dk süre ile aktive edildi. Standart ve örnek çözeltileri; 6 mm'lik bir bant genişliğinde, tabakanın soldan ve aşağıdan 15 mm'lik kısımlarından başlanarak inert gaz N_2 yardımıyla tabakaya ekildi. Ekimler arasındaki mesafe kullanılan tabakanın boyutuna bağlı olarak otomatik olarak seçildi. Yürütme işlemlerinde (9.5 cm), hareketli faz ile önceden yaklaşık olarak 20 dk süre ile doygun hale gelmiş olan tank (Camag Twin Trough Chamber, 20×10 ve 10×10) kullanıldı. Yürütme işleminden sonra çözücünün uzaklaşması beklenildi ve tarama işlemleri, 6.00×0.45 mm slit aralığında, 1 mm s^{-1} tarama hızında, $100 \mu\text{m s}^{-1}$ çözünürlükte gerçekleştirildi. Işın kaynağı olarak D2&W lambaları kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesi ise winCATS yazılımı yardımıyla yapıldı.

3.1.4. Tabletlerin Analize Hazırlanması

Etken madde olarak flurbiprofen içerdiği bilinen ve eczanelerden temin edilmiş dört farklı markadaki ilaçlardan gruplar halinde onar tablet alınarak ayrı ayrı tartıldı ve dört farklı marka ilaç için ayrı ayrı ortalama tablet ağırlıkları belirlendi. Homojen bir örnekleme sağlamak için onarlık gruplar halindeki tabletler öğütülerek saklama kaplarına alındı. YBSK, KE ve İTK için yaklaşık 0.05 gr aralığında öğütülmüş haldeki ilaç tartılarak üzerine 20 mL metanol eklendi ve 20 dk süre ile bir magnetik karıştırıcı yardımıyla karışması sağlandı. Bu çözeltiden 0.2 mL'lik bir kısım alınarak 20 kat seyreltildi ve 100 μL 'lik bir şırınga yardımıyla 10 μL 'lik hacimler halinde ince tabakaya ekimleri yapıldı. YBSK ve KE için ise 0.2 mL'lik kısım 100 kat seyreltilerek enjekte edildi.

3.2.4. Stres Şartlarının Hazırlanması

Farklı stres şartları altında flurbiprofenin bozunma kinetiğinin incelenmesi amacıyla YBSK ve KE'ye göre daha ekonomik olması, analizlerin daha kısa sürede tamamlanması ve parçalanma ürünlerinin tayininde duyarlı bir analiz tekniği olması bakımından İTK seçildi ve

aşağıdaki belirtilen işlemler standart flurbiprofen çözeltisine uygulandı. Stres şartlarının oluşturulmasında ICH tarafından belirlenen kriterler göz önüne alındı [48-49].

Asidik ortamda flurbiprofenin davranışını incelemek için $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ FBP (Flurbiprofen) çözeltisinden 15 mL alınarak üzerine 5 mL 5 M HCl eklendi ve $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de magnetik karıştırıcı yardımıyla 1 saat karışması sağlandı. Bu süre sonunda $8 \mu\text{L}$ (600 ng spot^{-1} içerecek şekilde) alınarak sabit faza ekimi yapıldı.

Bazik ortamda flurbiprofenin davranışını incelemek için $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ FBP çözeltisinden 15 mL alınarak üzerine 5 mL 5 M NaOH eklendi ve $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de magnetik karıştırıcı yardımıyla 1 saat karışması sağlandı. Bu süre sonunda $8 \mu\text{L}$ (600 ng spot^{-1} içerecek şekilde) alınarak sabit faza ekimi yapıldı.

Yükseltgeyici ortamında flurbiprofenin davranışını incelemek için $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ flurbiprofen çözeltisinden 15 mL alınarak üzerine sırasıyla 5 mL %5'lik ve %15'lik H_2O_2 eklendi ve $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de magnetik karıştırıcı yardımıyla 1 saat karışması sağlandı. Bu süre sonunda $8 \mu\text{L}$ (600 ng spot^{-1} içerecek şekilde) alınarak sabit faza ekimi yapıldı.

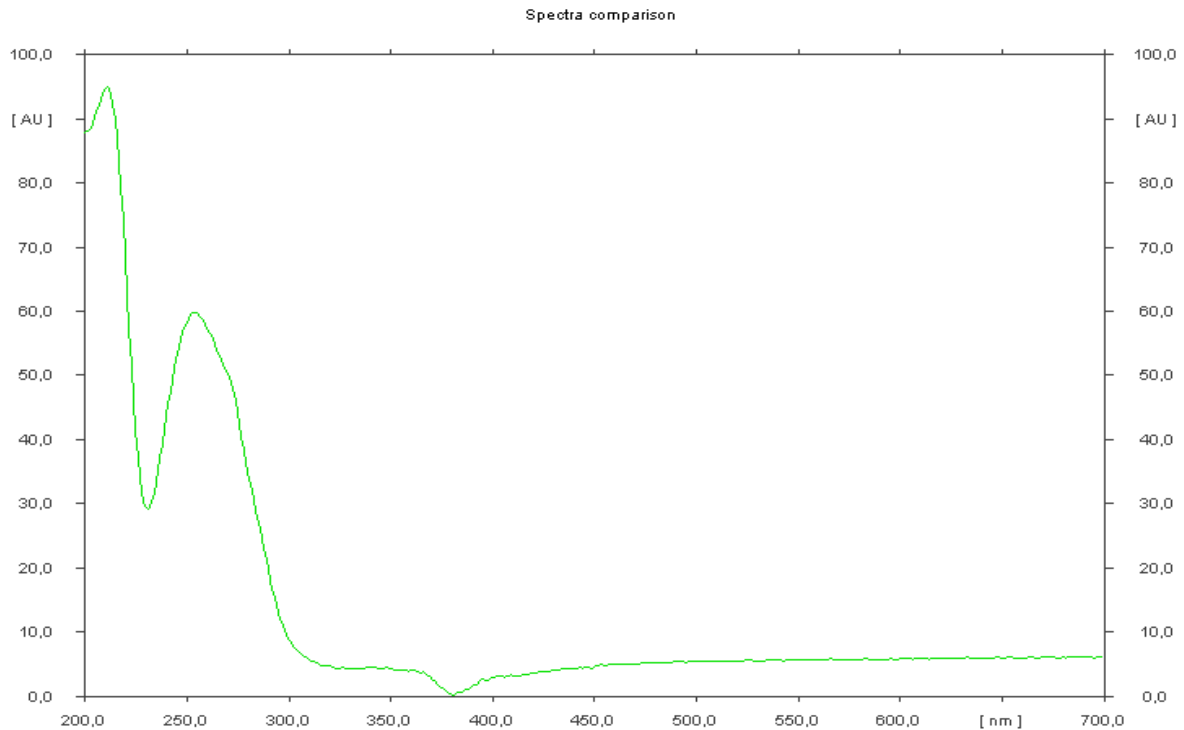
Kuru ısıtma çalışmalarında 0.005 g flurbiprofen tartılarak $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de etüvde 3 saat bekletildikten sonra metanolde çözülerek sabit faza $8 \mu\text{L}$ (600 ng spot^{-1} içerecek şekilde) ekimi yapıldı. Yaş ısıtma çalışmalarında ise $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ flurbiprofen çözeltisinden 15 mL alınarak üzerine 5 mL metanol eklendi ve $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de magnetik karıştırıcı yardımıyla 1 saat karışması sağlandı. Bu süre sonunda $8 \mu\text{L}$ (600 ng spot^{-1} içerecek şekilde) alınarak sabit faza ekimi yapıldı.

Işık etkisiyle flurbiprofende meydana gelecek olası parçalanmaların incelenmesi amacıyla $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimindeki flurbiprofen çözeltisi yaklaşık 24 saat süre ile gün ışığına maruz bırakıldı ve bu süre sonunda çözülden $6 \mu\text{L}$ alınarak (600 ng spot^{-1}) sabit faza ekimi yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Kromatografik Tekniklerle Flurbiprofen Analizi İçin Kalibrasyon Çalışmaları

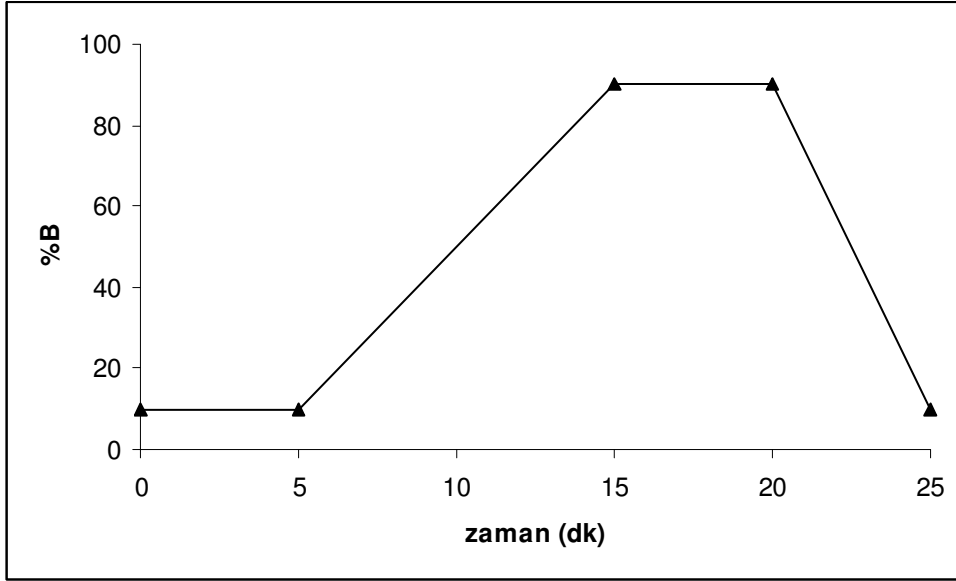
Kromatografik tekniklerle flurbiprofen tayini için geliştirilen farklı yöntemler incelendiğinde çalışmada kullanılan maksimum absorpsiyon dalga boyunda değişiklikler olduğu görülmüştür. Flurbiprofenin UV spektrumu incelendiğinde yaklaşık olarak 220 nm’de karbonil grubundan kaynaklanan bir geçiş ve 250 nm’de aromatik yapıdan kaynaklanan bir geçiş bulunmaktadır. 220 nm’deki geçiş çözücüyle etkileşime bağlı olarak değişeceğinden ve kararsız olduğundan maksimum absorpsiyon dalga boyu olarak 250 nm’nin kullanılması daha uygundur [17]. Literatürde ise maksimum absorpsiyon dalga boyu olarak 254 nm [16], 248 nm [17-12], 247 nm [25,50], 246 nm [4] ve 250 nm [23] gibi farklı dalga boyları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmaları sırasında ise kullanılan her üç kromatografik yöntemde de analiz dalga boyu olarak 250 nm kullanılmıştır. İnce tabaka kromatografisinde sabit faz olarak kullanılan silika tabaka üzerinde standart flurbiprofen çözeltisinden alınan UV spektrumu Şekil 4.1 ’de verilmiştir.



Şekil 4.1. İnce tabaka kromatografisi ile alınmış standart flurbiprofene ait UV spektrumu

4.1.1. YBSK ile Flurbiprofen Kalibrasyon Çalışması

YBSK ile flurbiprofen analizi için farklı hareketli fazlar denendi ve ikili hareketli faz karışımı ile gradient programı uygulandı. Uygulanan gradient programı Şekil 4.2’de verilmiştir. İkili karışım; A:40 mL saf su+9 mL metanol+0.5 mL asetik asit, B: metanol içermektedir.



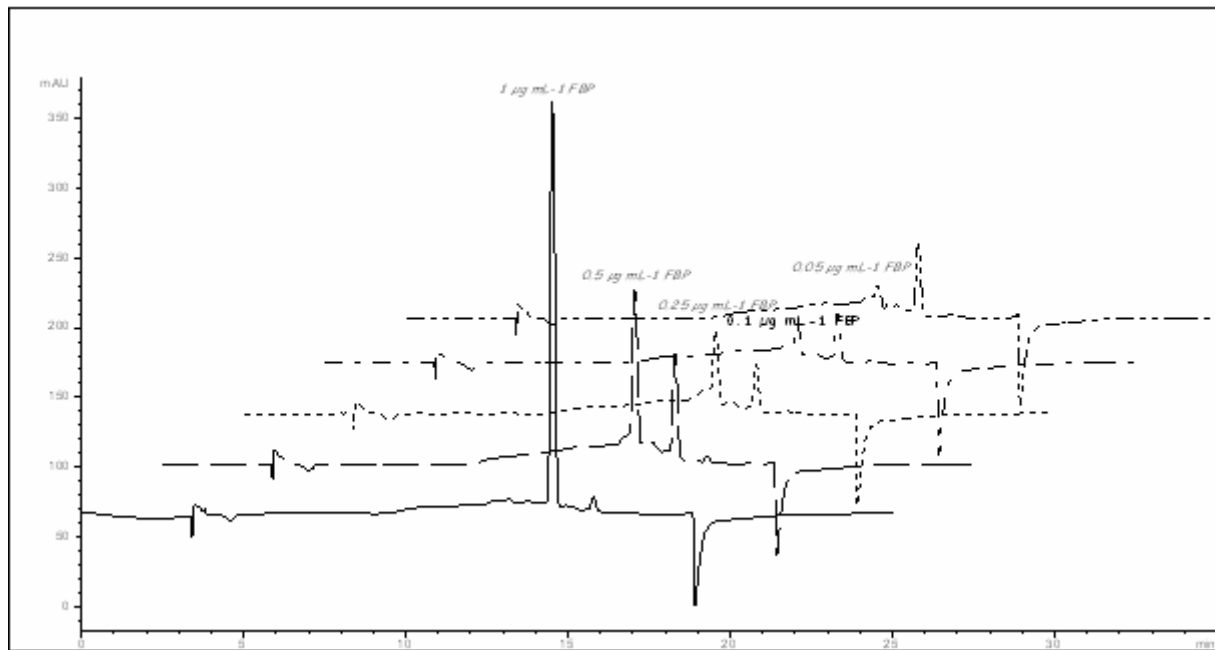
Şekil 4.2. YBSK ile flurbiprofen analizi için kullanılan gradient programı, hareketli faz; A:40 mL saf su+9 mL metanol+0.5 mL asetik asit, B: metanol içermektedir.

YBSK ile flurbiprofenin kalibrasyon çalışmasında yukarıda belirlenen hareketli faz kullanılarak 0.05-0.1-0.25-0.5-1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişimlerinde flurbiprofen çözeltilerinden 50 μL 'lik bir şırınga yardımıyla 20 μL alınarak kolona enjekte edildi. Alınan kromatogramlardan, flurbiprofene ait pikin altında kalan eğrinin alanının, kolona enjekte edilen flurbiprofen derişimine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulan kalibrasyon grafiğine ilişkin sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. YBSK ile flurbiprofen kalibrasyon verileri

	YBSK
Lineer aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	50-1000
Korrelasyon katsayısı	0.9930 \pm 0.0012
Eğim	2587 \pm 32
Kayma	95.5 \pm 2.1

0.05-0.1-0.25-0.5-1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında elde edilen kalibrasyon verilerine ilişkin kromatogram Şekil 4.3.'de verilmiştir. Flurbiprofen için sıvı kromatografisinde alıkonma zamanının 15.8 \pm 0.1 olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.3. 0.05-0.1-0.25-0.5-1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığındaki flurbiprofen çözeltileri için YBSK'dan elde edilen kromatogramlar.

4.1.2. Kapiler Elektroferez ile Flurbiprofen Kalibrasyon Çalışması

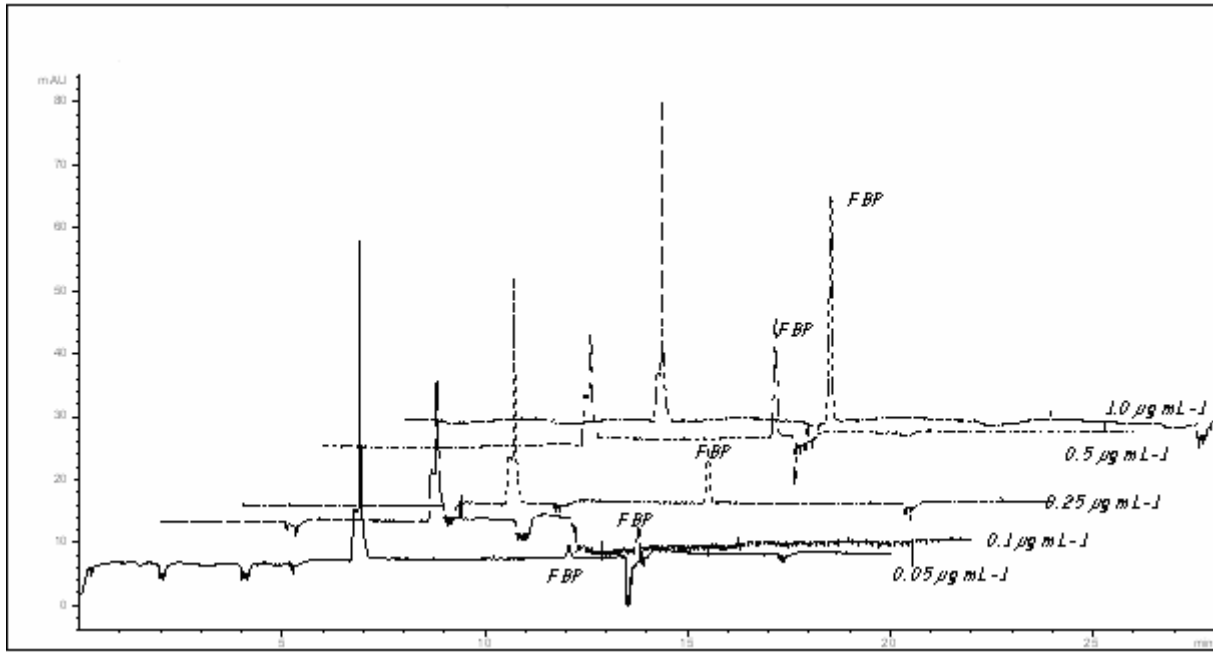
KE ile flurbiprofen analizi için farklı elektrolitler denendi ve pH'sı 5.7'ye ayarlanmış 40 µL asetonitril ile modifiye edilmiş 2 mL pH:4.0 asetat tamponunun kullanılmasına karar verildi.

KE ile flurbiprofenin kalibrasyon değerlerini elde etmek için yukarıda belirlenen hareketli faz kullanılarak 0.05-0.1-0.25-0.5-1.0 µg mL⁻¹ derişimlerinde flurbiprofen çözeltilerinden 50 µL alınarak viallere konuldu. Çalışma şartlarında kapiler sıcaklığı sabit 25°C'de tutuldu. Çözeltiler, hidrodinamik olarak kapiler girişine 4 sn süre ile 3.4 kPa basınç uygulanarak enjekte edildi. Alınan kromatogramlardan, flurbiprofene ait pikin altında kalan eğrinin alanının, enjekte edilen flurbiprofen derişimine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulan kalibrasyon grafiğine ilişkin sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. KE ile flurbiprofen kalibrasyon verileri

	KE
Lineer aralık (µg mL ⁻¹)	50-1000 µg mL ⁻¹
Korrelasyon katsayısı	0.9965±0.0008
Eğim	186.74±2.2
Kayma	2.03±0.02

0.05-0.1-0.25-0.5-1.0 µg mL⁻¹ aralığında elde edilen kalibrasyon verilerine ilişkin kromatogram Şekil 4.4'de verilmiştir. Flurbiprofen için kapiler elektroferezde alıkonma zamanının 11.5±0.1 olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4. 0.05-0.1-0.25-0.5-1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığındaki flurbiprofen çözeltileri için KE'den elde edilen kromatogramlar.

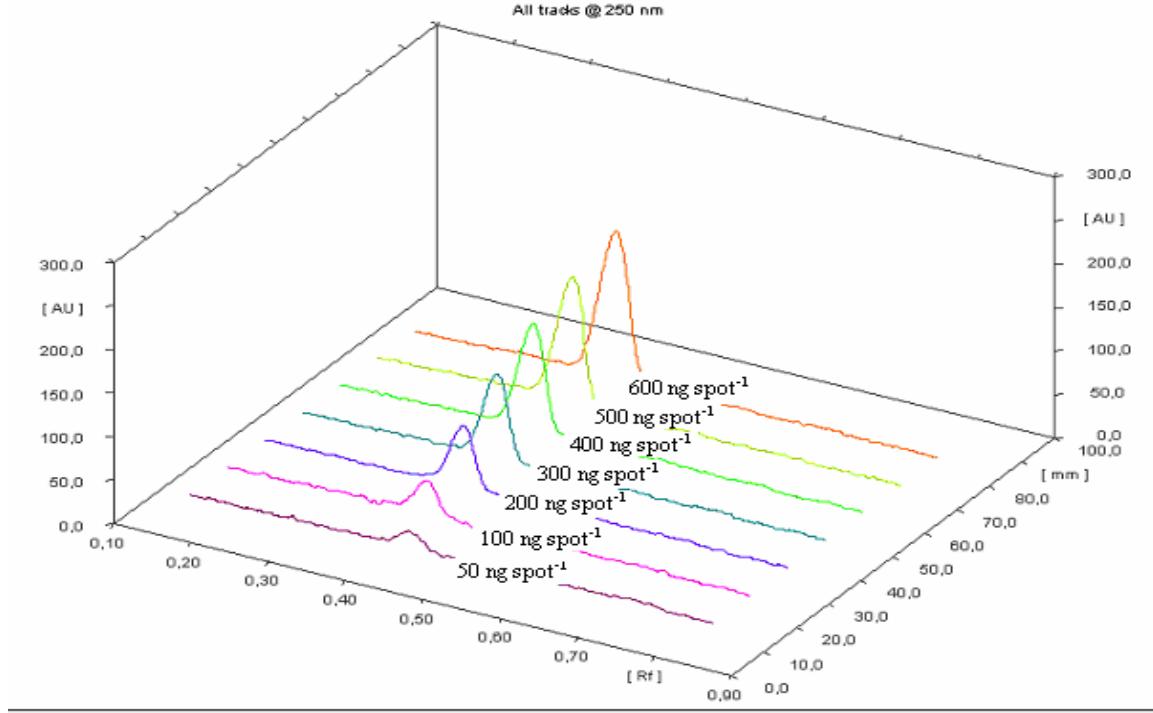
4.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi ile Flurbiprofen Kalibrasyon Çalışması

Yapılan deneysel çalışmalar ile kloroform : aseton : ksilen (5:2:1, v/v/v) karışımının ince tabaka kromatografisi ile flurbiprofen analizi için uygun bir hareketli faz olduğu belirlendi. Alınan kromatogramlardan, flurbiprofene ait pikin altında kalan eğrinin alanının, enjekte edilen flurbiprofen derişimine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulan kalibrasyon grafiğine ilişkin sonuçlar Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.3. İTK ile flurbiprofen kalibrasyon verileri

	ITK
Lineer aralık (ng spot^{-1})	50-600
Korrelasyon katsayısı	0.9993 \pm 0.0004
Eğim	10.29 \pm 0.52
Kayma	176.26 \pm 37.68

25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişimindeki flurbiprofen çözeltilisinden farklı hacimlerin sabit faza ekilmesi ile 50-600 ng spot^{-1} aralığında elde edilen kalibrasyon verilerine ilişkin kromatogram Şekil 4.5.'de verilmiştir. Flurbiprofen için ince tabaka kromatografisinde geciktirme faktörünün 0.39 ± 0.02 olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. 50-600 ng spot^{-1} aralığındaki flurbiprofen derişimleri için İTK'dan elde edilen kromatogramlar.

4.2. Kromatografik Tekniklerle Tabletlerde Flurbiprofen Analizi

Ticari olarak eczanelerde satılan ve etken madde olarak flurbiprofen içerdiği bilinen dört farklı markadaki ilaç temin edilerek Bölüm 3.1.4'de belirtildiği şekilde analize hazırlandı ve kalibrasyon verilerinin elde edildiği şartlar kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Yapılan analizler sonucunda; tabletlerde bulunan flurbiprofen miktarının, üretici firmalar tarafından iddia ettikleri değerlerle uydukları görülmüştür. Analizler ile ilgili sonuçlar Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Kromatografik tekniklerle tabletlerde flurbiprofen analiz sonuçları

Örnek	İddia edilen flurbiprofen miktarı (mg / tablet)	YBSK ^a		KE ^b		İTK ^c	
		Bulunan flurbiprofen miktarı (mg / tablet, n=3)	B.S.S ^d , %	Bulunan flurbiprofen miktarı (mg / tablet, n=3)	B.S.S ^d , %	Bulunan flurbiprofen miktarı (mg / tablet, n=3)	B.S.S ^d , %
Tablet 1	100	102.2±4.3	4.2	101.4±3.8	3.7	102.4±2.6	2.6
Tablet 2	100	103.1±2.3	2.2	99.7±2.3	2.3	97.1±0.7	0.7
Tablet 3	100	98.6±3.6	3.7	100.2±4.0	4.0	99.4±2.7	2.7
Tablet 4	100	-	-	-	-	101.7±2.8	2.8

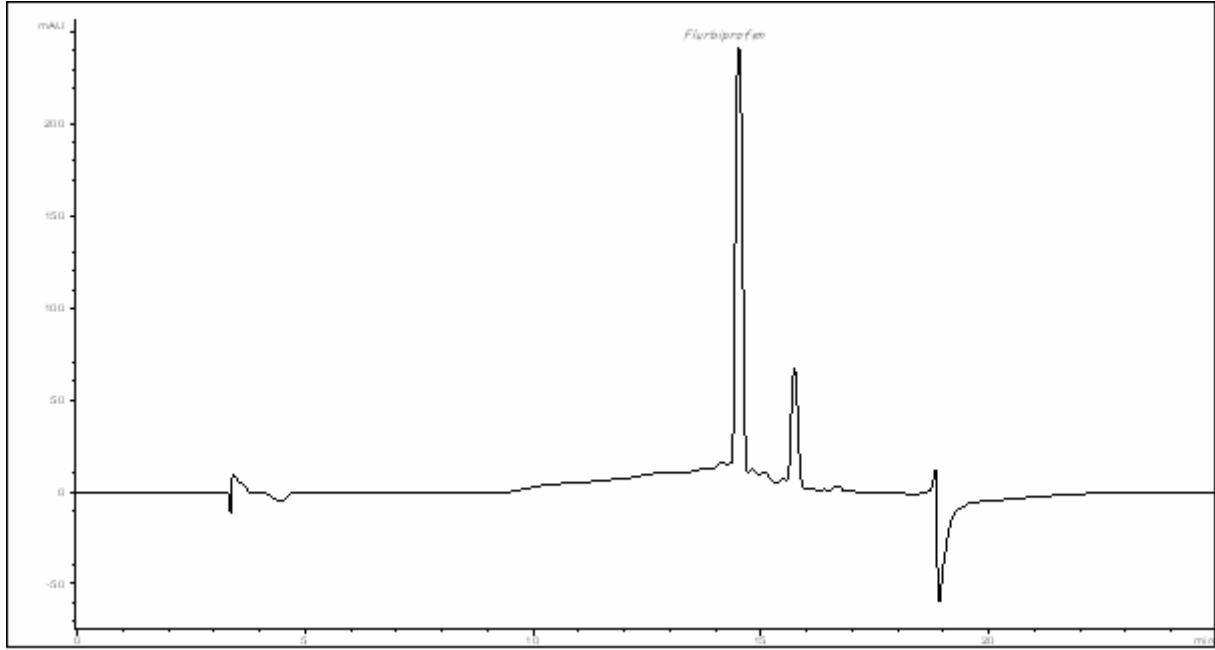
^a Hareketli faz; A:40 mL saf su+9 mL metanol+0.5 mL asetik asit, B:metanol içermektedir-gradient program. Akış hızı: ml dk⁻¹, tayin dalga boyu 250 nm.

^b Elektrolit olarak pH'sı 5.7'ye ayarlanmış 40 µL asetonitril ile modifiye edilmiş 2 mL pH:4.0 asetat tamponu, 20 kV'luk elektrik potansiyeli, kapiler sıcaklığı sabit 25°C, hidrodinamik olarak kapiler girişine 4 sn süre ile 3.4 kPa basınç uygulanarak enjeksiyon, tayin dalga boyu 250 nm.

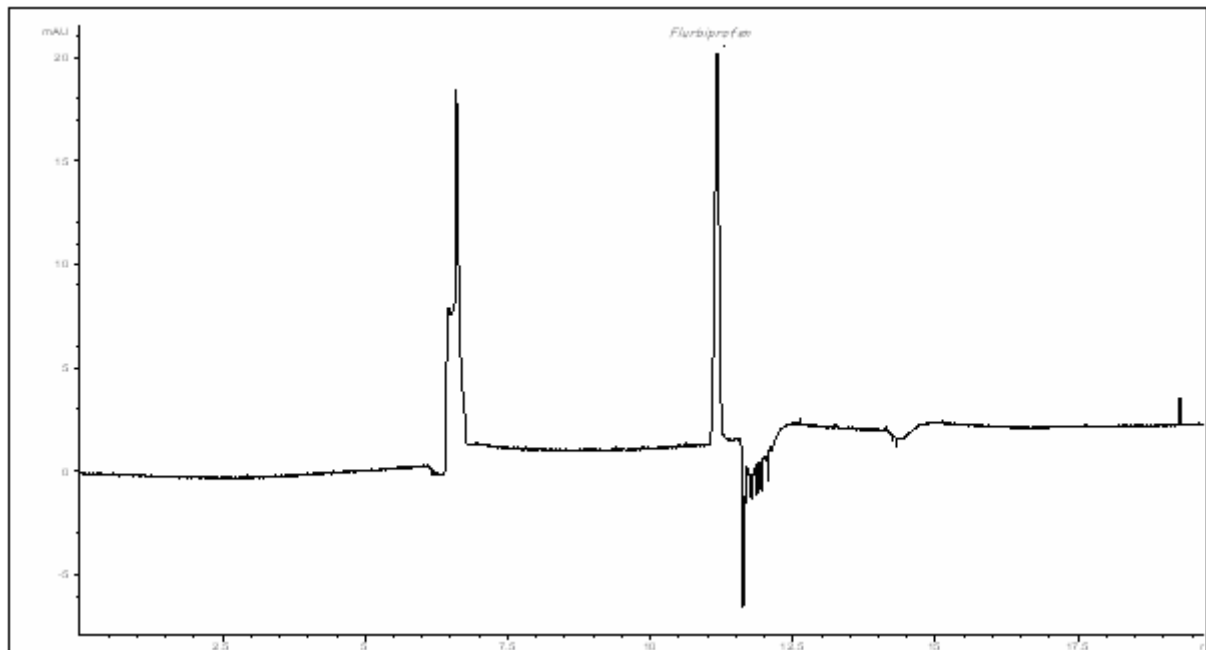
^c Hareketli faz: kloroform : aseton : ksilen (5:2:1, v/v/v), sabit faz olarak klasik TLC tabaka, tayin dalga boyu 250 nm

^d Bağlı standard sapma

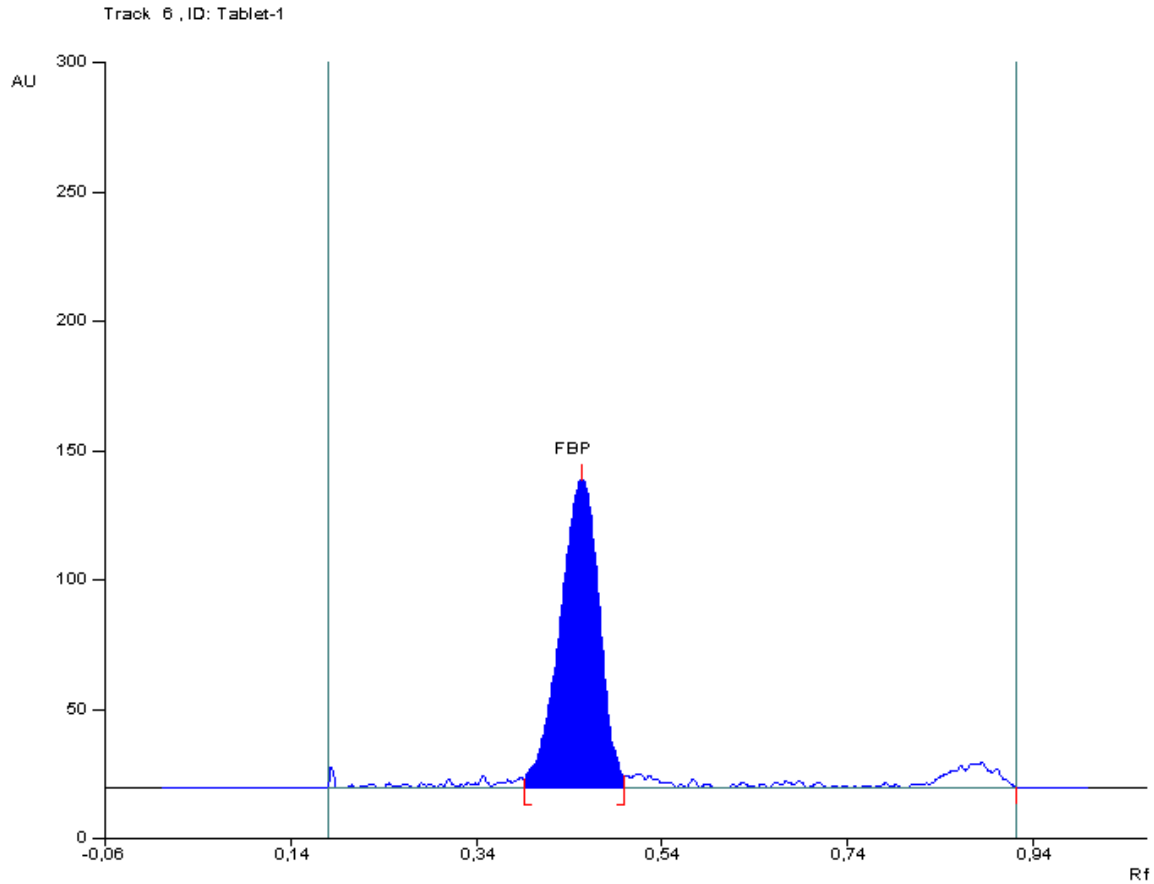
YBSK, KE ve İTK ile ticari tabletlerdeki flurbiprofen miktarlarını belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda 1 nolu tablet için elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.6., 4.7 ve 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.6.YBSK ile 1 nolu tablet örneği için elde edilen kromatogram



Şekil 4.7. KE ile 1 nolu tablet örneği için elde edilen kromatogram

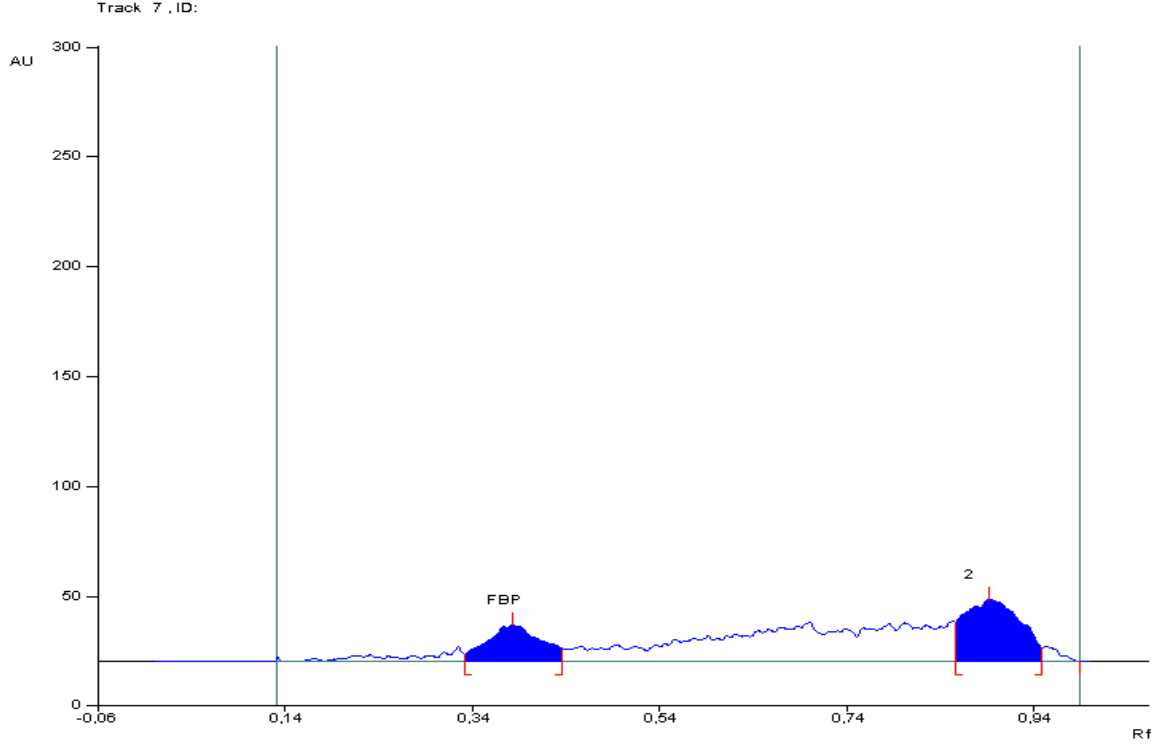


Şekil 4.8. İTK ile 1 nolu tablet örneği için elde edilen kromatogram

4.3. Farklı Stres Şartlarında Flurbiprofenin Bozunma Ürünlerinin incelenmesi

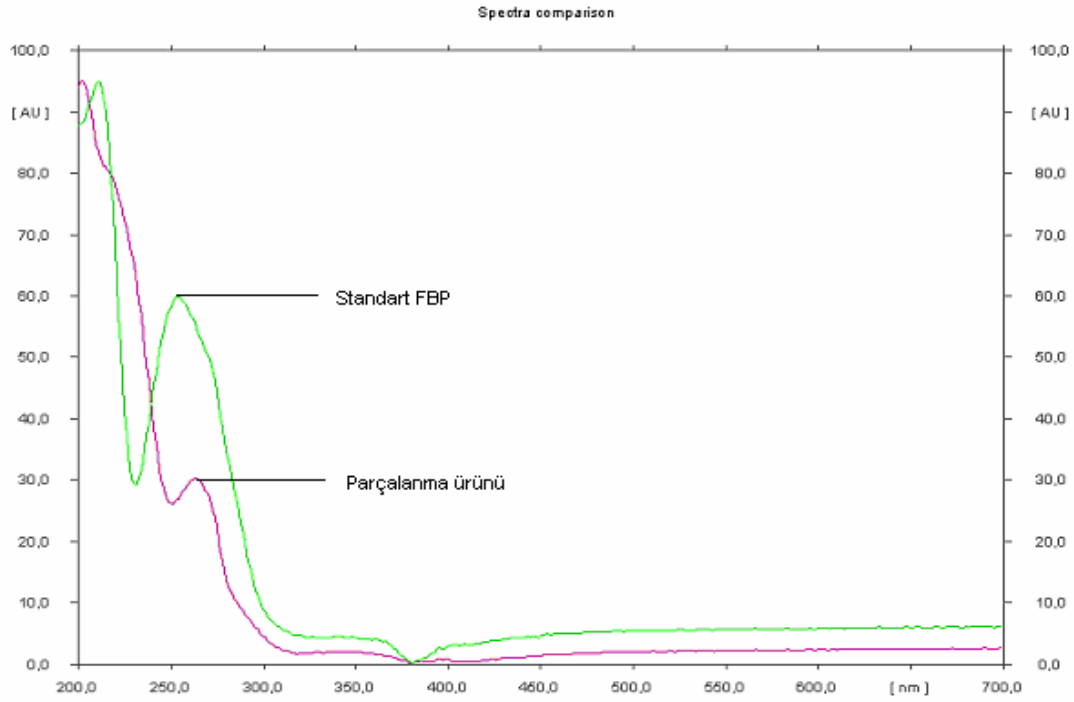
YBSK, KE ve İTK kullanılarak yapılan karşılaştırmalı flurbiprofen analizleri sonucunda farklı stres şartlarında flurbiprofenin parçalanma ürünlerinin belirlenmesi amacıyla İTK'nın kullanılmasına karar verildi. Bölüm 3.2.4.'de belirtildiği gibi asidik, bazik, yükseltgeyici ortamında, kuru ısıtma, yaş ısıtma ve ışık etkisi altında flurbiprofenin parçalanma ürünleri İTK kullanılarak belirlendi.

1M HCl ortamında flurbiprofen çözeltisinin belirtilen süre ve sıcaklık boyunca geri soğutucu altında karıştırılması ve ardından yapılan analiz sonucunda elde edilen kromatogram Şekil 4.9'da verilmiştir.



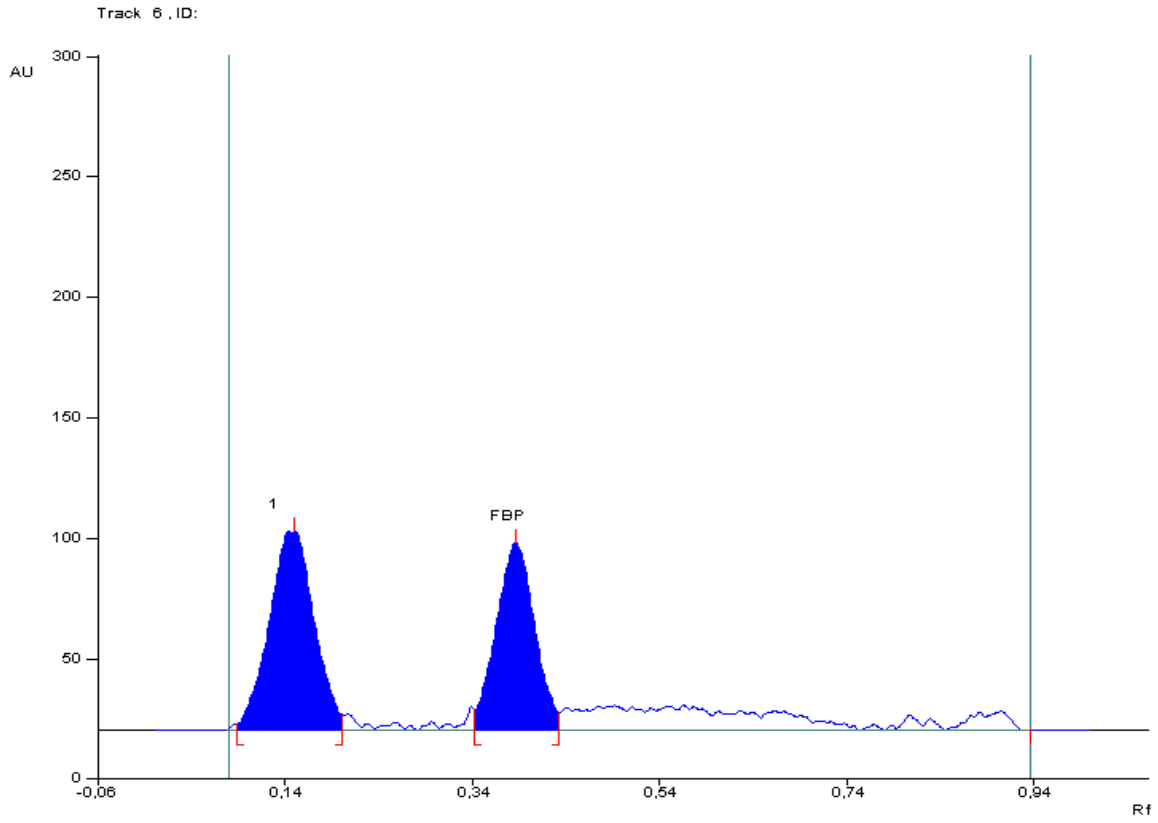
Şekil 4.9. 1M HCl ortamında flurbiprofen bozunmasına ilişkin kromatogram (sıcaklık 70°C, 1 saat geri soğutucu altında karıştırma)

1M HCl ortamında flurbiprofen parçalanmasına ilişkin kromatogramdan $R_f=0.89$ olan bir bozunma ürünü olduğu görülmektedir. Bu bozunma ürününün UV spektrumu Şekil 4.10.'da verilmiştir.



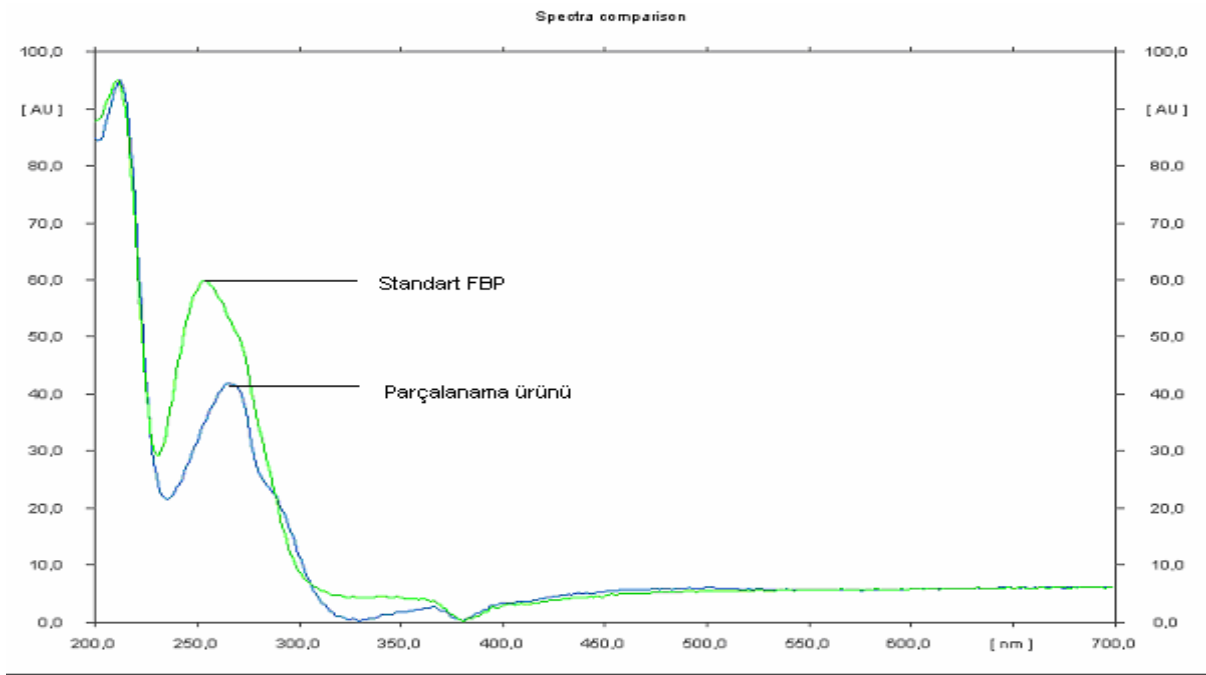
Şekil 4.10. 1M HCl ortamında flurbiprofen bozunma ürününün UV spektrumunun standart flurbiprofen çözeltisinin UV spektrumu ile karşılaştırılması

1M NaOH ortamında flurbiprofen çözeltisinin belirtilen süre ve sıcaklık boyunca geri soğutucu altında karıştırılması ve ardından yapılan analiz sonucunda elde edilen kromatogram Şekil 4.11.'da verilmiştir.



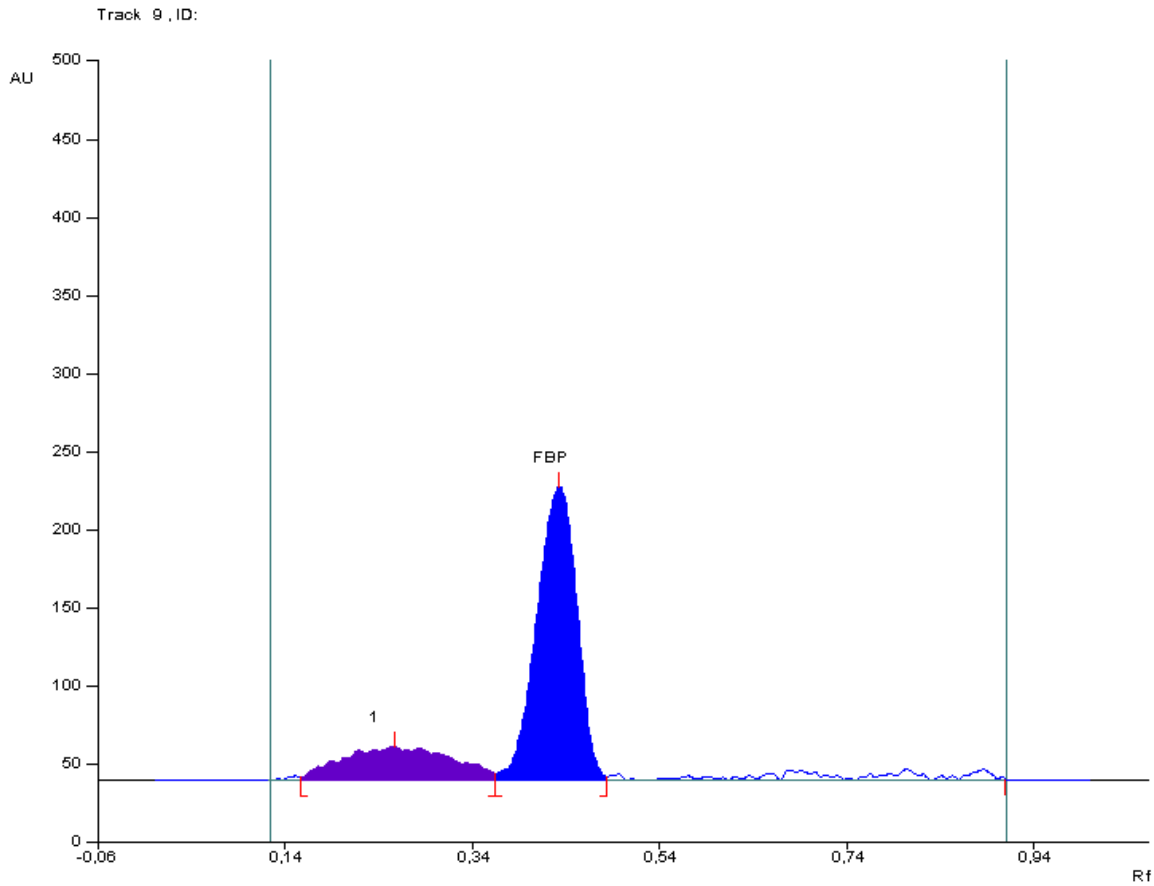
Şekil 4.11. 1M NaOH ortamında flurbiprofen bozunmasına ilişkin kromatogram (sıcaklık 70°C, 1 saat geri soğutucu altında karıştırma)

1M NaOH ortamında flurbiprofen bozunmasına ilişkin kromatogramdan $R_f=0.14$ olan bir parçalanma ürünü olduğu görülmektedir. Bu bozunma ürününün UV spektrumu Şekil 4.12.'da verilmiştir.



Şekil 4.12. 1M NaOH ortamında flurbiprofen bozunma ürününün UV spektrumunun standart flurbiprofen çözeltisinin UV spektrumu ile karşılaştırılması

%5'lik H_2O_2 ortamında flurbiprofen çözeltisinin belirtilen süre ve sıcaklık boyunca geri soğutucu altında karıştırılması ve ardından yapılan analiz sonucunda elde edilen kromatogram Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13. %5'lik H₂O₂ ortamında flurbiprofen bozunmasına ilişkin kromatogram (sıcaklık 70°C, 1 saat geri soğutucu altında karıştırma)

Kuru ısıtma çalışmaları için 70°C'de etüvde 3 saat bekletildikten sonra metanolde çözülerek sabit faza ekimi yapılan, yaş ısıtma çalışmaları için 100 µg mL⁻¹ flurbiprofen çözeltisinden 15 mL alınıp üzerine 5 mL metanol eklenmesi ve 70°C'de geri soğutucu altında 1 saat süre ile karıştırılması sonucunda ekimi yapılan ve toplam olarak 24 saat süre ile gün ışığına maruz bırakılmış 100 µg mL⁻¹ derişimindeki flurbiprofen çözeltilerinden elde edilen kromatogramlarda ise ölçülebilecek düzeyde bozunma ürünü gözlenememiştir.

Farklı stres şartları altında flurbiprofenin bozunmasından elde edilen kromatogramlardan yararlanılarak etkileşim süresi sonunda ortamda bozunmadan kalan flurbiprofen miktarları ve bozunma ürünlerinin Rf değerleri Tablo 4.5'da verilmiştir.

Tablo 4.5. Farklı stres şartlarında flurbiprofenin bozunma ürünleri hakkında bilgi

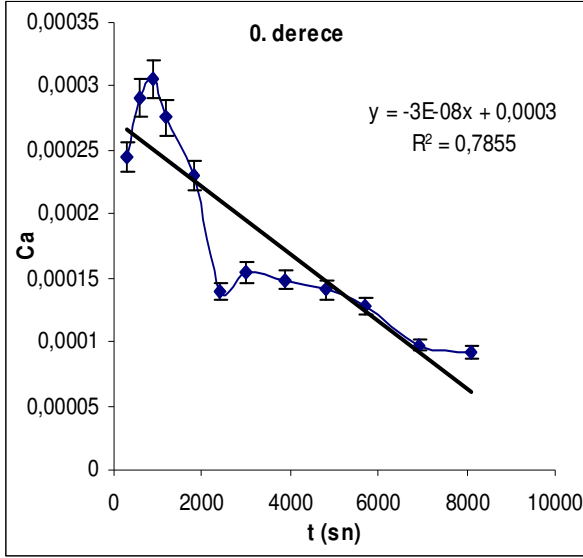
Şartlar	Zaman (saat)	Bozunma ürününün Rf değeri	Kalan FBP miktarı (ng)	Verim ^a , %
1 mol L ⁻¹ HCl ortamında	1	0.89	<60	<10
1 mol L ⁻¹ NaOH ortamında	1	0.14	219	36.5
%5'lik H ₂ O ₂ ortamında	1	0.26	464	77.3
Kuru ısıtma	3	-	595	99
Yaş ısıtma	1	-	598	99
Gün ışığı altında	24	-	595	99

^a Ortamda bozunmadan kalan flurbiprofen miktarının başlangıç miktarına oranı

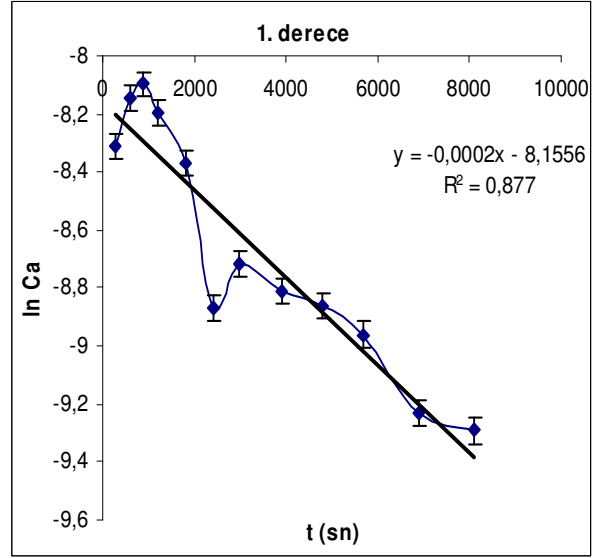
4.4. Flurbiprofenin Bozunma Kinetiğinin İncelenmesi

Flurbiprofenin farklı stres şartlarında bozunmasıyla ilgili yapılan çalışmalar sonucunda bozunmanın en fazla asidik ortamda gerçekleştiği görülmüştür. Bu amaçla kinetik çalışmaların asidik ortamda yapılmasına karar verilmiştir.

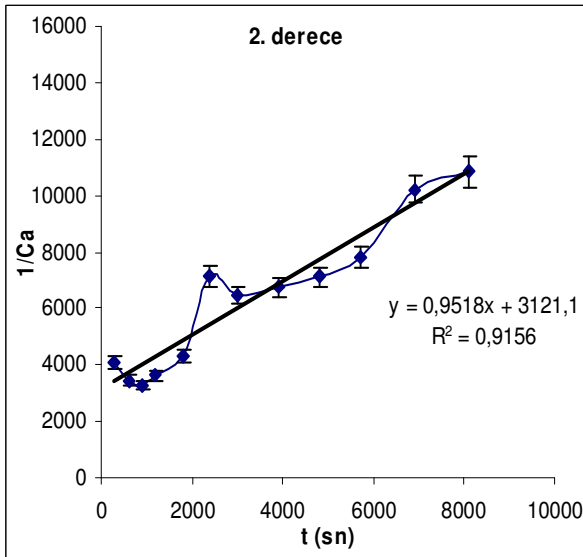
100 µg mL⁻¹ FBP çözeltisinden 15 mL alınarak üzerine 5 mL 1 M HCl eklendikten sonra 60-70-80 ve 90 °C'lerde magnetik karıştırıcı yardımıyla 1 saat karışması sağlanmıştır. Karışma işlemi başladıktan 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 65, 80, 95, 115 ve 135 dakika sonra ortamdan yaklaşık 50 µL çözelti alınarak viallere konulmuş ve 135 dakika sonunda elde edilen 12 adet çözelti bekletilmeden İTK kullanılarak analiz edilmiştir. İTK analizlerinde bu örneklerden 8 µL alınarak sabit faza ekimi yapıldıktan sonra elde edilen sonuçlar 0., 1., 2. ve 3. derece kinetik modellere uygulanmıştır. 60 °C'de alınan sonuçların farklı dereceden kinetik modellere uygulanmasıyla çizilen grafikler Şekil 4.14'de, 70 °C için Şekil 4.15'de, 80 °C için Şekil 4.16'da ve 90 °C için Şekil 4.17'de verilmiştir.



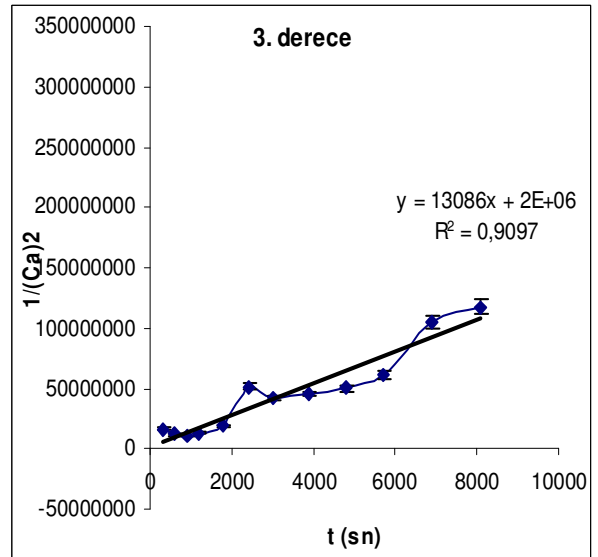
(a)



(b)

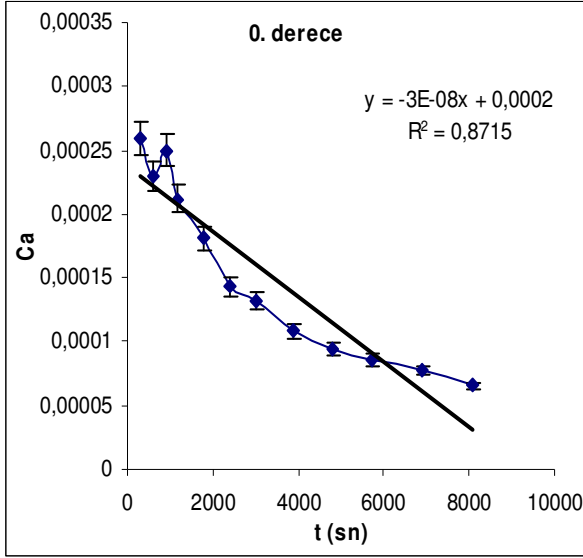


(c)

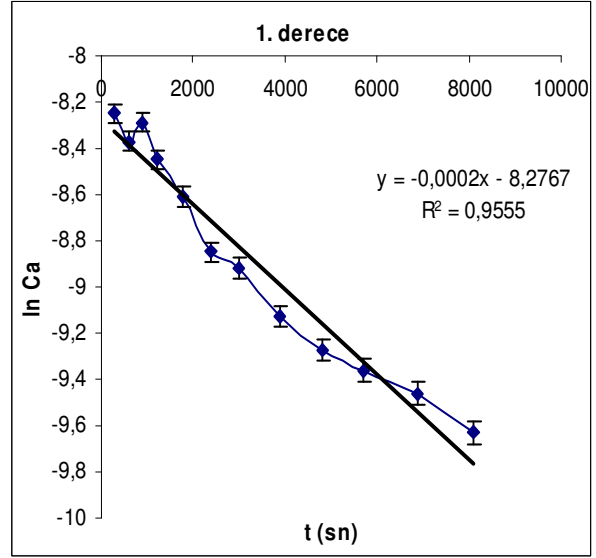


(d)

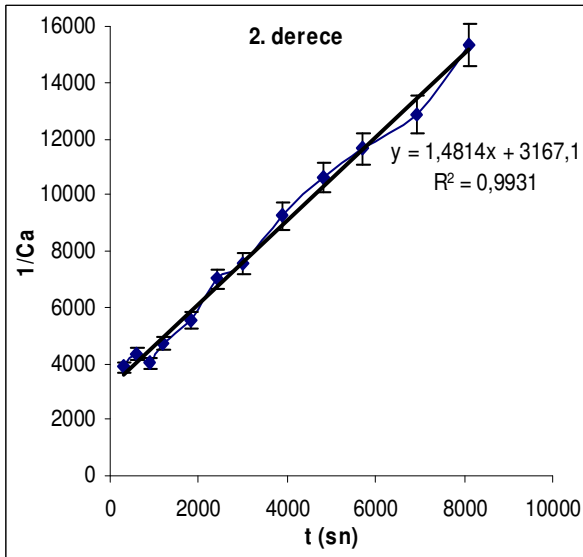
Şekil 4.14. 60 °C'de alınan sonuçların 0. (a), 1. (b), 2. (c) ve 3. (d) derece kinetik modellere uygulanması



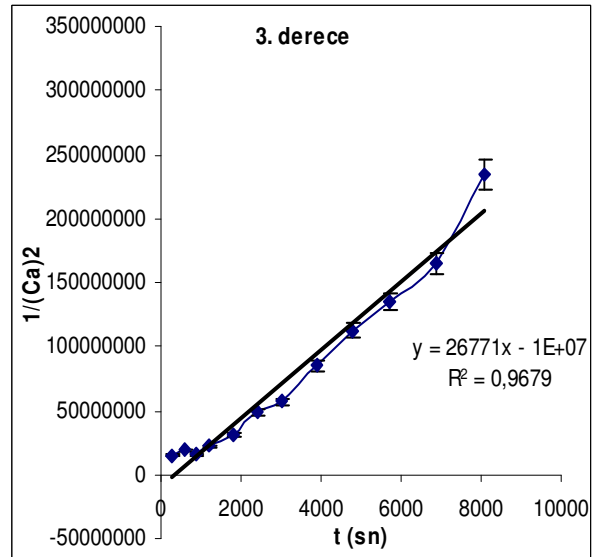
(a)



(b)

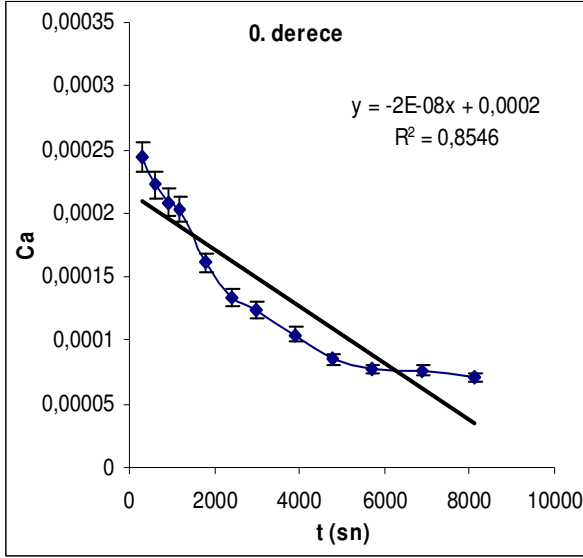


(c)

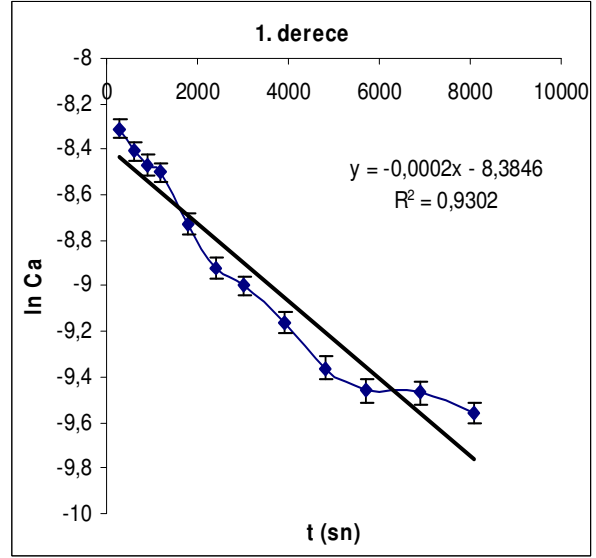


(d)

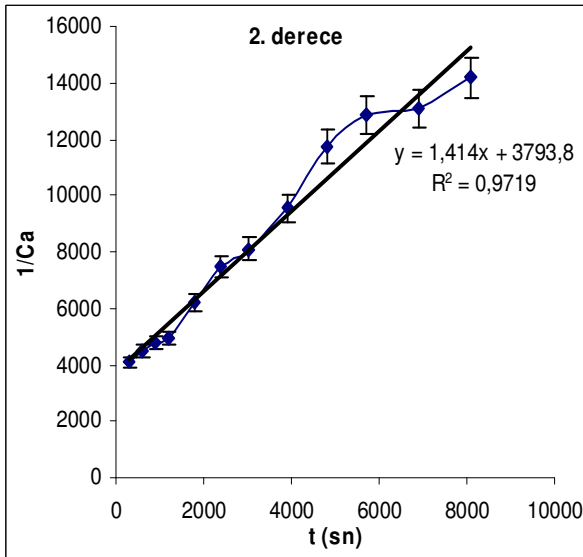
Şekil 4.15. 70 °C'de alınan sonuçların 0. (a), 1. (b), 2. (c) ve 3. (d) derece kinetik modellere uygulanması



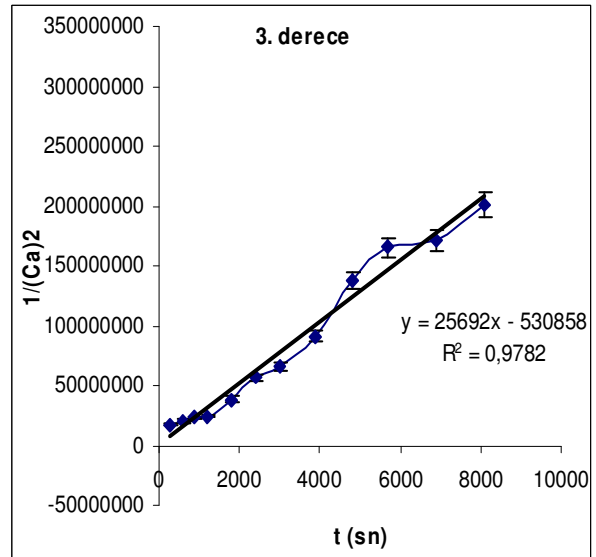
(a)



(b)

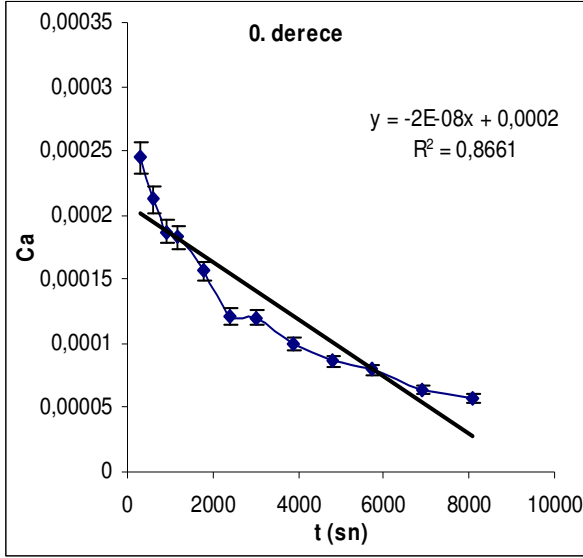


(c)

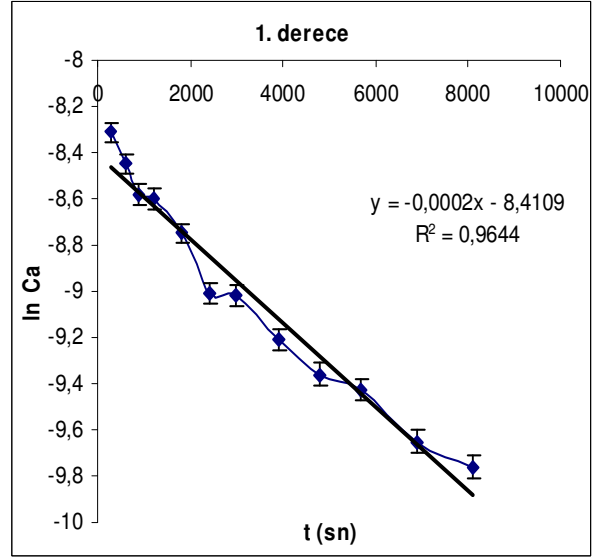


(d)

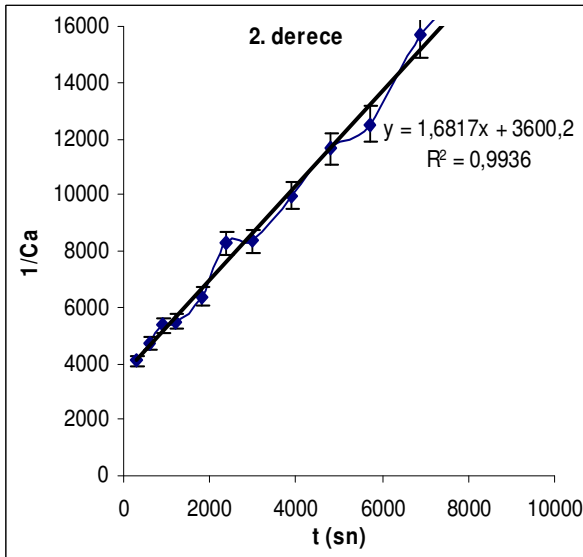
Şekil 4.16. 80 °C'de alınan sonuçların 0. (a), 1. (b), 2. (c) ve 3. (d) derece kinetik modellere uygulanması



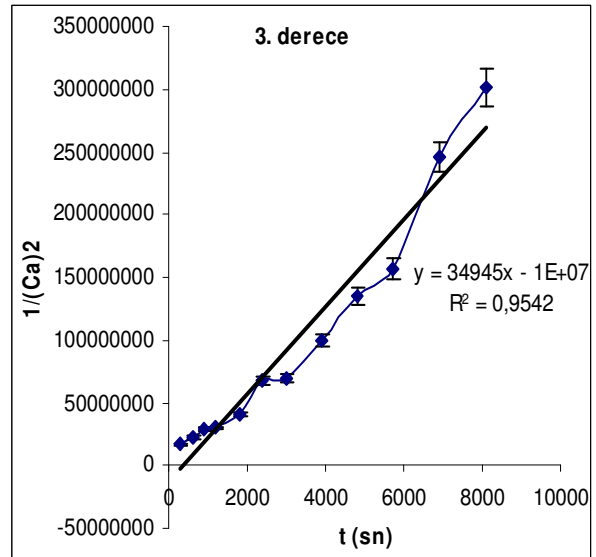
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.17. 90 °C'de alınan sonuçların 0. (a), 1. (b), 2. (c) ve 3. (d) derece kinetik modellere uygulanması

Flurbiprofenin, 1 M HCl ortamında 60, 70, 80, ve 90 °C sıcaklıklarda farklı sürelerde geri soğutucu altında karıştırılması sonucunda ortamda parçalanmadan kalan flurbiprofen miktarlarının İTK ile hesaplanması ve sonuçların farklı dereceden kinetik modellere uygulanması ile flurbiprofenin asidik ortamda parçalanmasının 2. derece kinetik modele daha çok uyduğu görülmüştür. Şekil 4.14., 4.15., 4.16., ve 4.17.'dan görüleceği gibi en iyi korelasyon katsayısı değerleri 2. derece kinetik modelde elde edilmiştir.

Farklı sıcaklıklarda 2. dereceden tepkime için çizilen grafiklerdeki düz çizgilerin eğiminden bozunma hız sabiti (K), yarılanma süresi ($t_{1/2}$), t_{90} (çalışılan bileşiğin %90'nın parçalanmadan kalması için geçen zaman) ve korelasyon katsayıları hesaplanarak Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.6. 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda 1 M HCl ortamında flurbiprofenin bozunma reaksiyonu ile ilgili K, $t_{1/2}$, t_{90} ve R^2 değerleri

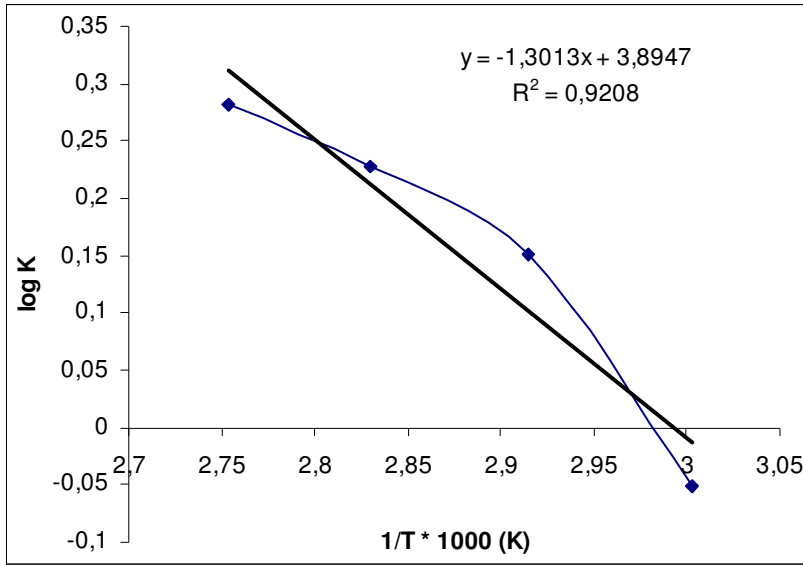
Sıcaklık (°C)	K (L mol ⁻¹ sn ⁻¹)	$t_{1/2}$ (sn)	t_{90} (sn)	R^2
60	0,89	3720	413	0,9156
70	1,42	2333	259	0,9931
80	1,69	1957	217	0,9719
90	1,92	1134	126	0,9936

Farklı sıcaklıklarda bulunan parçalanma hız sabiti değerleri Arrhenius eşitliğinde (4.1) kullanarak 25 °C sıcaklıkta parçalanma hız sabiti, frekans faktörü, aktivasyon enerjisini hesaplamak mümkündür.

$$\log K = \log A - \frac{E_a}{2,303RT} \quad (4.1)$$

eşitlikte; K: hız sabiti, A: frekans faktörü, E_a : aktivasyon enerjisi (cal mol⁻¹), R: gaz sabiti (1,987 cal K⁻¹ mol⁻¹) ve T: mutlak sıcaklıktır (K).

Farklı sıcaklıklarda bulunan parçalanma denge sabitleri yardımıyla Arrhenius çizimi (Şekil 4.18.). ($\log K$ 'ya karşı $1/T$) yapılmış ve eğim çizgisinin 25 °C için ekstrapole edilmesiyle alınan sonuçlardan bu sıcaklıktaki kinetik ve termodinamik sabitler hesaplanmıştır (Tablo 4.7.)



Şekil 4.18. Farklı sıcaklıklarda flurbiprofenin bozunma kinetik verilerinden yararlanarak çizilen Arrhenius grafiği

Tablo 4.7. 25 °C’de flurbiprofenin parçalanma kinetiği verileri

Parametre	Değeri
E_a (kcal mol ⁻¹)	$5,95.10^3$
K_{25} (L mol ⁻¹ sn ⁻¹)	0,3379
$t_{1/2}$ (sn)	9799
t_{90} (sn)	1088
A (sn ⁻¹)	$7,84.10^{-3}$

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada YBSK, KE ve İTK teknikleri kullanılarak NSAİ grubu bir ilaç etken maddesi olan flurbiprofenin eczanelerde satılan dört farklı ticari tabletlede analizi yapılmıştır. Bu amaçla belirtilen her üç kromatografik teknik için uygun hareketli fazlar belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda üretici firmalar tarafından ilaç içerisinde bulunduğu iddia edilen etken madde miktarlarının analiz sonuçlarıyla uyduğu gözlemlenmiştir. Tekrar analizlerinden %5'in altında Bağlı Standart Sapma (B.S.S.) değerleri elde edilmiştir.

YBSK, KE ve İTK kullanılarak yapılan karşılaştırmalı flurbiprofen analizleri sonucunda farklı stres şartlarında flurbiprofenin bozunmasının incelenmesi amacıyla İTK'nın kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla ICH tarafından belirtilen kriterler gereği asidik, bazik, yükseltgeyici ortamında, kuru ısıtma, yaş ısıtma ve ışık etkisi altında flurbiprofenin bozunması incelenmiş ve olası bozunma ürünleri İTK kullanılarak belirlenmiştir.

Asidik ortamda yapılan bozunma çalışmaları sonucunda standart flurbiprofene ait pikin haricinde $R_f=0.89$ olan ikinci bir bileşene ait pik görülmüştür. Bu pike ait UV spektrumu alındığında standart flurbiprofenin UV spektrumuna benzer bir spektrum elde edilmiştir. Asidik şartlarda; flurbiprofenin %10'ndan daha az bir kısmının bozunmadan ortamda kaldığı belirlenmiştir. Bazik ortamda yapılan bozunma çalışmaları sonucunda ise $R_f=0.14$ olan ve yine UV spektrumu standart flurbiprofeninkine benzeyen bir bileşene ait pik görülmüştür. Bazik şartlarda; flurbiprofenin %36.5'inin bozunmadan ortamda kaldığı belirlenmiştir. Yükseltgeyici ortamda yapılan çalışmalar sonucunda R_f değeri 0.14-0.34 arasında değişen geniş bir pik belirlenmiştir. Bu pike ait UV spektrumu da standart flurbiprofene ait UV spektrumuna benzerdir. Yükseltgeyici şartlarında; flurbiprofenin %77.3'ünün bozunmadan ortamda kaldığı belirlenmiştir. Kuru ısıtma, yaş ısıtma ve gün ışığı altında bozunması incelenen flurbiprofen çözeltilerinden elde edilen kromatogramlarda ise ölçülebilecek düzeyde bozunma ürünü gözlenememiştir.

Standart flurbiprofen çözeltileri ile yapılan bozunma çalışmaları sonucunda bozunmanın en fazla asidik ortamda gerçekleştiği belirlendiğinden dolayı kinetik çalışmaların asidik ortamda yapılmasına karar verilmiştir.

Bu amaçla belirli derişimdeki flurbiprofen çözeltilerinin asidik ortamda 60, 70, 80 ve 90 °C'lerde magnetik karıştırıcı yardımıyla 1 saat boyunca karışması sağlanmış ve karışma işlemleri başladıktan 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 65, 80, 95, 115 ve 135 dakika sonra ortamdan yaklaşık 50 µL çözeltiler alınarak viallere konulmuş ve 135 dakika sonunda elde edilen 12 adet çözeltiler bekletilmeden İTK kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen analiz sonuçları 0., 1., 2. ve 3. derece kinetik modellere uygulanmıştır. Sonuçların farklı dereceden kinetik modellere uygulanması ile çizilen grafiklerin korrelasyon katsayıları göz önüne alındığında asidik ortamdaki bozunmanın çalışılan her dört sıcaklıkta da 2. dereceden kinetik modele daha çok uyduğu belirlenmiştir. 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda 1 M HCl ortamında flurbiprofenin bozunma reaksiyonu ile alınan sonuçların 2. dereceden kinetik modele uygulanması ile elde edilen korrelasyon katsayısı değerleri sırasıyla; 0.9156, 0.9931, 0.9719 ve 0.9936 olarak bulunmuştur. Farklı sıcaklıklarda 2. dereceden tepkime için çizilen grafiklerdeki düz çizgilerin eğiminden parçalanma hız sabiti (K), yarılanma süresi ($t_{1/2}$), t_{90} (çalışılan bileşimin %90'nın parçalanmadan kalması için geçen zaman) değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde sıcaklık artışı ile bozunma hız sabiti K'nın sayısal değeri artarken, yarılanma süresi ($t_{1/2}$) ve t_{90} değerlerinde azalma olduğu belirlenmiştir. Asidik ortamda flurbiprofenin bozunmasına ilişkin sayısal veriler göz önüne alındığında bozunmanın sıcaklıkla arttığı söylenebilir.

Farklı sıcaklıklarda bulunan parçalanma denge sabitleri yardımıyla Arrhenius çizimi ($\log K$ 'ya karşı $1/T$) yapılmış ve eğim çizgisinin 25 °C için ekstrapole edilmesiyle alınan sonuçlardan bu sıcaklıktaki kinetik ve termodinamik sabitler hesaplanmıştır. Aktivasyon enerjisi $5,95 \cdot 10^3 \text{ kcal mol}^{-1}$, 25 °C'deki denge sabiti $0,3379 \text{ L mol}^{-1} \text{ sn}^{-1}$, yarılanma zamanı 9799 sn, flurbiprofenin %90'nın parçalanmadan ortamda kalması için geçen zaman 1088 sn, ve Arrhenius frekans faktörü $7,84 \cdot 10^{-3} \text{ sn}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

6. KAYNAKLAR

- [1] DURAL, E.A.Ö., 2002. Farmakoloji. Nobel Tıp Kitabevleri. İSTANBUL.
- [2] ÖZÜNER, Z., 1995. Temel ve Klinik Farmakoloji. Barış Kitabevi. İSTANBUL.
- [3] KOŞAY, S., 1996. Farmakoloji. Nobel Tıp Kitabevleri. İSTANBUL.
- [4] SANTORO, M.I.R., SINGH, A.K., KEDOR-HACKMANN, E.R.M., 2003. Direct Separation and Quantitative Determination of Flurbiprofen Enantiomers in Pharmaceutical Formulations, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 26 (4), 517-523
- [5] BAE, H., LEE, K., LEE, Y., 2006. Enantioselective Properties of Extracellular Lipas from *Serratia Marcescens* ES-2 for Kinetic Resolution of (S)-flurbiprofen, J. Of Molecular Cat. B: Enzymatic. 40, 24-29
- [6] WECHTER, W.J., LEIPOLD, D.D., QUIGGLE, D.D., McCracken, J.D., MURRAY, E.D., LOUGHMAN, B.E., 2000. (R)-Flurbiprofen (E-7869), a Chemopreventive and Treatment of Cancer, Inflammopharmacology. 8 (2), 189-206
- [7] HEIGER, D., 2000. Introduction to High Performance Capillary Electrophoresis. Agilent Technologies. GERMANY
- [8] HAMILTON, R.J., SEWELL, P.A., 1977. Introduction to High Performance Liquid Chromatography. John Wiley&Sons. NEW YORK
- [9] FRIED, B., SHERMA, J., 1999, Thin Layer Chromatography. Marcel Dekker. NEW YORK
- [10] HUANG, C.Z., SANTA, T., OKABE, K., IMAI, K., 2003. Capillary Electrophoresis with Laser Induced-Fluorescence Detections of Profens Derivatized with the Water-soluble Fluorogenic Reagent 4-N-(4-N'-aminoethyl)piperazino-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole, J. of Chrom. B. 1011, 193-201
- [11] PAI, Y., LIU, C., 2002. Capillary Electrochromatographic Separation of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs with a Histidine Bonded Phase, J. of Chrom. A. 982, 293-301
- [12] HAMOUDOVA, R., POSPISILOVA, M., 2006. Determination of Ibuprofen and Flurbiprofen in Pharmaceutical by Capillary Zone Electrophoresis, J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41, 1463-1467
- [13] FANALI, S., D'ORAZIO, G., QUAGLIA, M.G., 2004. Separation of Aryl Propionic Acids by Capillary Liquid Chromatography, Chromatographia. 60, 239-243

- [14] FILLET, M., BECHET, I., PIETTE, V., CROMMEN, J., 1999. Separation of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs by Capillary Electrophoresis Using Nonaqueous Electrolytes, Electrophoresis. **20**, 1907-1915
- [15] HUTZLER, J.M., FRYE, R.F., TRACY, T.S., 2000. Sensitive and Specific High-performance Liquid Chromatographic Assay for 4'-hydroxyflurbiprofen and flurbiprofen in human urine and plasma, J. of Chrom. B. **749**, 119-125
- [16] CHAROO, N.A., SHAMSHER, A.A.A., KOHLI, K., PILLAI, K.K., RAHMAN, Z., 2005. Simple and Sensitive High-performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Transdermally Applied Flurbiprofen in Rat Plasma and Excised Skin Samples, Chromatographia. **62**, 493-497
- [17] SAJEEV, C., JADHAV, P.R., RAVISHANKAR, D., SAHA, R.N., 2002. Determination of Flurbiprofen in pharmaceutical Formulations by UV Spectrophotometry and Liquid Chromatography. Analytica Chimica Acta. **463**, 207-217
- [18] HIRAI, T., MATSUMOTO, S., KISHI, I., 1997. Simultaneous Analysis of Several Non-steroidal Anti-inflammatory in Human Urine by High-performance Liquid Chromatography with Normal Solid-phase Extraction. J. of Chrom. B. **692**, 375-388
- [19] HERRAEZ-HERNANDEZ, R., MERBEL, N.C., BRINKMAN, U.A.T., 1995. Determination of the Total Concentration of Highly Protein-bound Drugs in Plasma by on-line Dialysis and Column Liquid Chromatography: Application to Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. J. of Chrom. B. Biomedical Applications. **666**, 127-137
- [20] KUMAR, A., MANN, H.J., REMMEL, R.P., 2007. Simultaneous Analysis of Cytochrome P450 Probes—dextromethorphan, Flurbiprofen and Midazolam and Their Major Metabolites by HPLC-mass-spectrometry/fluorescence after Single-step Extraction from Plasma. J. of Chrom. B. **853**, 287-293
- [21] ALDINI, G., CARINI, M., ORIOLI, M., FACINO, R.M., WENK, G.L., 2002. Metabolic Profile of NO-flurbiprofen (HCT1026) in Rat Brain and Plasma: a LC-MS Study. Life Sciences. **71**, 1487-1500
- [22] VINCI, F., FABBROCINO, S., FIORI, M., SERPE, L., GALLO, P., 2006. Determination of Fourteen Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Animal Serum and Plasma by Liquid Chromatography/mass Spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. **20**, 3412-3420
- [23] PARK, K., GAO, Z., KIM, C., 1997. Assay of Flurbiprofen in Rat Plasma Using HPLC with Fluorescence Detection. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. **20(12)**, 1849-1855

- [24] MATHY, F., PREAT, V., VERBEECK, R.K., 2001. Validation of Subcutaneous Microdialysis Sampling for Pharmacokinetic Studies of Flurbiprofen in the Rat. J. of Pharmaceutical Sciences. 90(11), 1897-1906
- [25] CHEO, S., HO, H., CHEN, F., LIN, P., YU, Y., WU, A., 2007. Identification of Flurbiprofen and Its Photoproducts in Methanol by Gas chromatography–mass Spectrometry. Biomed. Chromatogr. 21, 527–533
- [26] PATEL, B.K., VALENTOVA, J., HUTT, A.J., 2002. Chromatographic Separation and Enantiomeric Resolution of Flurbiprofen and its Major Metabolites. Chromatographia. 55, 135-142
- [27] PATEL, B.K., VALENTOVA, J., HUTT, A.J., 2003. Stereospecific Analysis of Flurbiprofen and its Major Metabolites in Plasma and Urine by Chiral-Phase Liquid Chromatography. Chromatographia. 57, 7-18
- [28] MANO, N., NIKAIDO, A., NARUI, T., YAMASAKI, D., GOTO, J., 2002. Rapid and Simple Quantitative Assay Method for Diastereomeric Flurbiprofen Glucuronides in the Incubation Mixture. J. of Chrom. B. 776, 125-131
- [29] GHANEM, A., ABOUL-ENEIN, H.Y., 2005. Comparison, Applications, Advantages, and Limitations of Immobilized and Coated Amylose Tris-(3,5-Dimethylphenylcarbamate) Chiral Stationary Phases in HPLC. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 28. 2863–2874
- [30] ABOUL-ENEIN, H.Y., 2003. Chiral Separation of Some Non-steroidal Antiinflammatory Drugs on Tartardiamide DMB Chiral Stationary Phase by HPLC. J. Sep. Sci. 26, 521–524
- [31] BRUSHAN, R., THIONGO, G.T., 1999. Direct Enantiomeric Resolution of Some 2-Arylpropionic Acids Using (-)-brucine-impregnated Thin-layer Chromatography. Biomed. Chromatogr. 13, 276–278
- [32] SMET, E., STAELENS, L., HEYDEN, Y.V., BAEYENS, W.R.G., ABOUL-ENEIN, H.Y., WEKEN, G.V., GARCIA-CAMPANA, A.M., 2001. Optimization of the Chiral Separation of Some 2-Arylpropionic Acids on an Avidin Column by Modeling a Combined Response. Chirality. 13, 556-567
- [33] ABOUL-ENEIN, H.Y., EL-AWADY, M.I., HEARD, C.M., 2003. Thin Layer Chromatographic Separation of Some 2-arylpropionic Acid Enantiomers Using L(-)-serine, L(-)-threonine and a Mixture of L(-)-serine and L(-)-threonine-impregnated Silca Gel as Stationary Phases. Biomed. Chromatogr. 17, 325-334

- [34] PEHOURCQ, F., JARRY, C., BANNWARTH, B., 2001. Chiral Resolution of Flurbiprofen and Ketoprofen Enantiomers by HPLC on a Glycopeptide-type Column Chiral Stationary Phase. Biomed. Chromatogr. **15**, 217-222
- [35] CHILMONCZYK, Z., KSYCINSKA H., ABOUL-ENEIN, H.Y, LEE, W., 2001. Enantiomeric Separation of Some Clinically Used Racemic Drugs on Pirkle-1J Chiral Stationary Phases. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. **24(16)**, 2505-2512
- [36] OLIVEROS, L., SENSO, A., FRANCO, P., MINGUILLON, C., 1998. Carbamates of Cellulose Bonded on Silica Gel: Chiral Discrimination Ability as HPLC Chiral Stationary Phases. Chirality. **10**, 283-288
- [37] LA, S., KIM, J., KIM, J.H., GOTO, J., KIM, K., 2003. Simultaneous Chiral Discrimination of Multiple Profens by Cyclodextrin-modified Capillary Electrophoresis in Normal and Reversed Polarity Modes. Electrophoresis. **24**, 2642–2649
- [38] NATISHAN, T.K., 2005. Recent Progress in the Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. **28**, 115-1160
- [39] PEHOURCQ, F., MATOGA, M., JARRY, C., BANNWARTH, B., 2004. HPLC Microdetermination of Flurbiprofen Enantiomers in Plasma with a Glycopeptide-type Chiral Stationary Phase Column. Biomed. Chromatogr. **18**, 330–334
- [40] KAFKOVA, B., BOSAKOVA, Z., TESAROVA, E., COUFAL, P., 2005. Chiral Separation of Beta-adrenergic Antagonists, Profen Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and Chlorophenoxypropionic Acid Herbicides Using Teicoplanin as the Chiral Selector in capillary Liquid Chromatography. J. of Chromatography A, **1088**, 82–93
- [41] BOSAKOVA, Z., CURINOVA, E., TESAROVA, E., 2005. Comparison of Vancomycin-Based Stationary Phases with Different Chiral Selector Coverage for Enantioselective separation of Selected Drugs in High-performance Liquid Chromatography. J. of Chromatography A. **1088** (2005) 94–103
- [42] KAFKOVA, B., BOSAKOVA, Z., TESAROVA, E., COUFAL, P., MESSINA, A., SINIBALDI, M., 2006. Vancomycin as Chiral Selector for Enantioselective Separation of Selected Profen Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Capillary Liquid Chromatography. Chirality. **18**, 531–538
- [43] ZHU, X., LIN, B., EPPERLEIN, U., KOPPENHOEFER, B., 1999. Enantiomeric Resolution of Some Nonsteroidal Antiinflammatory and Anticoagulant Drugs Using β -Cyclodextrins by Capillary Electrophoresis. Chirality. **11**, 56-62

- [44] FANALI, S., CARTONI, C., DESIDERIO, C., 2001. Chiral Separation of Newly Synthesized Arylpropionic Acids by Capillary Electrophoresis Using Cyclodextrins or a Glycopeptide Antibiotic as Chiral Selectors. Chromatographia. 54, 87-92
- [45] SHARP, V.S., RISLEY, D.S., McCARTHY, S., HUFF, B.E., STREGE, M.A., 1997. Evaluation of a New Macrocyclic Antibiotic as a Chiral Selector for Use in Capillary Electrophoresis. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 20 (6), 887-898
- [46] STADEN, R.S., BOKRETSION, R.G., OZOEMENA, K.I., STADEN, J.F., ABOUL-ENEIN, H.Y., 2006. Enantioselective, Potentiometric Membrane Electrodes Based on Different Cyclodextrins as Chiral Selectors for the Assay of S-Flurbiprofen. Electroanalysis 18 (17), 1718 – 1721
- [47] STADEN, R.S., BOKRETSION, R.G., OZOEMENA, K.I., 2006. Utilization of Maltodextrin-Based Enantioselective, Potentiometric Membrane Electrodes for the Enantioselective Assay of S-Flurbiprofen. Analytical Letters. 39, 1065–1073
- [48] ICH-Q1A (R2). February 2003. Stability Testing of New Drug Substances and Products, International Conference of Harmonization. Genova. [http://www.ich.org/cache/compo363-272-1.html#Q1A\(R2\)](http://www.ich.org/cache/compo363-272-1.html#Q1A(R2))
- [49] ICH-Q2A (R1). November 2005. Validation of Analytical Procedure : Text and Methodology. International Conference of Harmonization, Genova. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>
- [50] DHAVSE, V.V., PARMAR, D.V., DEVARAJAN, P.D., 1997. High Performance Thin Layer Chromatographic Determination of Flurbiprofen in Human Plasma. J. of Chromatography B. 694, 449-453

7. TABLO LİSTESİ

1. Tablo 1.1. Kapiler elektroforez modları
2. Tablo 1.2. Klasik ve yüksek performanslı ince tabakaların karşılaştırılması
3. Tablo 2.1. Flurbiprofen tayini ve enantiomerik ayrılması için geliştirilen kromatografik yöntemler
4. Tablo 4.1. YBSK ile flurbiprofen kalibrasyon verileri
5. Tablo 4.2. KE ile flurbiprofen kalibrasyon verileri
6. Tablo 4.3. İTK ile flurbiprofen kalibrasyon verileri
7. Tablo 4.4. Kromatografik tekniklerle tabletlerde flurbiprofen analiz sonuçları
8. Tablo 4.5. Farklı stres şartlarında flurbiprofenin parçalanma ürünleri hakkında bilgi
9. Tablo 4.6. 60, 70, 80, ve 90 °C sıcaklıklarda 1 M HCl ortamında flurbiprofenin parçalanması reaksiyonu ile ilgili K, $t_{1/2}$, t_{90} ve R^2 değerleri
11. Tablo 4.7. 25 °C'de flurbiprofenin parçalanma kinetiği verileri

8. ŞEKİL LİSTESİ

1. Şekil 1.1. R ve S flurbiprofenin kimyasal yapıları
2. Şekil 1.2. Kapiler iç duvarındaki çift tabakanın gösterilmesi
3. Şekil 1.3. Elektrozmotik akışın oluşum süreci
4. Şekil 1.4-a ve-b. Akış profili ve bunlara karşılık gelen çözünen zonları
5. Şekil 1.5. İki bileşenli karışımın ayrılması
6. Şekil 1.6. Üç temel izoterm eğrisi ve bunların pik şekline ve gözlenme zamanına etkisi
7. Şekil 4.1. İnce tabaka kromatografisi yardımıyla alınmış sabit faz üzerindeki standart flurbiprofene ait UV spektrumu
8. Şekil 4.2. YBSK ile flurbiprofen analizi için kullanılan gradient programı, hareketli faz; A:40 mL saf su+9 mL metanol+0.5 mL asetik asit, B: metanol içermektedir.
9. Şekil 4.3. 0.05-0.1-0.25-0.5-1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığındaki flurbiprofen çözeltileri için YBSK'dan elde edilen kromatogramlar.
10. Şekil 4.4. 0.05-0.1-0.25-0.5-1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığındaki flurbiprofen çözeltileri için KE'den elde edilen kromatogramlar.
11. Şekil 4.5. 50-600 ng spot⁻¹ aralığındaki flurbiprofen derişimleri için İTK'dan elde edilen kromatogramlar.
12. Şekil 4.6. YBSK ile 1 nolu tablet örneği için elde edilen kromatogram (280507-6)
13. Şekil 4.7. KE ile 1 nolu tablet örneği için elde edilen kromatogram (240507-4)
14. Şekil 4.8. İTK ile 1 nolu tablet örneği için elde edilen kromatogram
15. Şekil 4.9. 1M HCl ortamında flurbiprofen parçalanmasına ilişkin kromatogram (sıcaklık 70°C, 1 saat geri soğutucu altında karıştırma)
16. Şekil 4.10. 1M HCl ortamında flurbiprofen parçalanma ürününün UV spektrumunun standart flurbiprofen çözeltisinin UV spektrumu ile karşılaştırılması
17. Şekil 4.11. 1M NaOH ortamında flurbiprofen parçalanmasına ilişkin kromatogram (sıcaklık 70°C, 1 saat geri soğutucu altında karıştırma)
18. Şekil 4.12. 1M NaOH ortamında flurbiprofen parçalanma ürününün UV spektrumunun standart flurbiprofen çözeltisinin UV spektrumu ile karşılaştırılması
19. Şekil 4.13. %5'lik H₂O₂ ortamında flurbiprofen parçalanmasına ilişkin kromatogram (sıcaklık 70°C, 1 saat geri soğutucu altında karıştırma)
20. Şekil 4.14. 60 °C'de alınan sonuçların 0. (a), 1. (b), 2. (c) ve 3. (d) derece kinetik modellere uygulanması

21. Şekil 4.15. 70 °C'de alınan sonuçların 0. (a), 1. (b), 2. (c) ve 3. (d) derece kinetik modellere uygulanması

22. Şekil 4.16. 80 °C'de alınan sonuçların 0. (a), 1. (b), 2. (c) ve 3. (d) derece kinetik modellere uygulanması

23. Şekil 4.17. 90 °C'de alınan sonuçların 0. (a), 1. (b), 2. (c) ve 3. (d) derece kinetik modellere uygulanması

24. Şekil 4.18. Farklı sıcaklıklarda flurbiprofenin bozunma kinetik verilerinden yararlanarak çizilen Arrhenius grafiği

9. ÖZGEÇMİŞ

1983 Elazığ doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 2005 yılında Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden mezun oldum. Aynı yıl Dicle Üniversitesinde Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünde araştırma görevlisi olarak göreve başladım, halen aynı üniversitede görev yapmaktayım.