ETOFENAMATE ETKİN MADDESİNİN BİYOANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Merve YILDIZ KINIK

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Yüksek Lisans Tezi – 2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETOFENAMATE ETKİN MADDESİNİN BİYOANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Merve YILDIZ KINIK

Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

ERZURUM
2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

ETOFENAMATE ETKİN MADDESİNİN BİYOANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Merve YILDIZ KINIK

Tez Savunma Tarihi : 25.07.2019

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Yücel KADIOĞLU(Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Onur ŞENOL (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi M.Fatih POLAT (Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **V**

ÖZET ..... **VI**

ABSTRACT ..... **VII**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **VIII**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **IX**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **XI**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1. İnflamasyon 4

2.2. Non-Steroid Antiinflamatuar İlaçlar 7

2.2.1. NSAİİ: Etki Mekanizması 9

2.2.2. Farmakokinetik 10

2.2.3. İlaç Etkileşimleri 11

2.2.4. NSAİD'lerin Yan Etkileri 11

2.3. Etofenamate 12

2.3.1. Etofenamat Etki Mekanizması 13

2.3.2. Etofenamat İle İlgili Yapılan Çalışmalar 14

2.3.3. Etofenamat İlacının Yan Etkileri 17

2.3.4. Enjeksiyon Formu İçin Endikasyonlar 19

2.3.5. Kontrendikasyonlar 19

2.3.6. Farmakodinamik ve Farmakokinetik Etkiler 20

2.3.7. İlaç Etkileşimi 21

2.4. Kromotografi 22

2.4.1. Kromotografi Türleri 23

2.4.1.1. Adsorpsiyon Kromatografisi 23
2.4.1.2. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi 24
2.4.1.3. Boyutlandırma (Eleme) Kromatografisi 24
2.4.1.4. İyon Değiştirme Kromatografisi 25
2.4.1.5. Afinite Kromatografisi 26
2.4.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) 26
2.4.2.1. Çözücü Rezervuarları 27
2.4.2.2. Pompalar 28
2.4.2.3. Numune Enjeksiyon Sistemi 28
2.4.2.4. Dedektörler 28
2.4.2.5. Kolon 30
2.4.3. HPLC'de KullanılanTemel Parametreler 31
2.4.3.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü 31
2.4.3.2. Seçicilik 32
2.4.3.3. Kolon Etkinliği 32
2.4.3.4. Kolonun Ayırma Gücü 32
2.5. Spektroskopik Yöntemler 33
2.5.1. Işının Absorplanması 34
2.5.1.1. Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi 35
2.5.1.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi 36
2.5.2. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar 36
2.5.3. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometreleri 37
2.5.3.1. Tek Işınlı Spektrofotometreler 39
2.5.3.2. Çift Işınlı Spektrofotometreler 39
2.5.4. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometrenin Kullanım Amaçları ... 40

2.5.4.1. Kalitatif Analiz ve Molekül Yapısını Aydınlatma 40
2.5.4.2. Kantitatif Analiz 41
2.5.5. Türev Spektrofotometrisi Yöntemi 42
2.6. Validasyon (Yöntem Geçerlilik Testleri) 43
2.6.1. Doğrusallık 43
2.6.2. Seçicilik (Belirleyicilik) 43
2.6.3. Doğruluk/Kesinlik 43
2.6.4. Duyarlılık 44
2.6.5. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite) 44
2.6.6. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) 44
2.6.7. Geri Kazanım/Analitik Geri Kazanım 45
3. MATERYAL VE METOT 46
3.1. Kullanılan Materyaller 46
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler 46
3.1.2. Kullanılan Cihazlar 46
3.2. Yöntemler 46
3.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Yöntem Şartları 46
3.2.2. Jel Çözeltisinin Hazırlanması 47
3.2.3. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yöntem Şartları 47
4. BULGULAR 48
4.1. HPLC Yöntemi 48
4.1.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması 48
4.1.2. HPLC Yöntem Geliştirme 48
4.1.3. HPLC Yöntem Validasyonu (Geçerlilik Testleri) 48
4.1.3.1. Seçicilik (Belirleyicilik) 48

4.1.3.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı 49
4.1.3.3. Doğruluk/Kesinlik 50
4.1.3.4. Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD) 51
4.1.3.5. Analitik Geri Kazanım 51
4.1.4. HPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması 52
4.2. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yöntemi 53
4.2.1. Standart Çalışma Çözeltilerin Hazırlanması 53
4.2.2. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yöntemi İle Analiz 53
4.2.3. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yönteminin Validasyonu (Geçerlilik Testleri) 53
4.2.3.1. Seçicilik (Belirleyicilik) 54
4.2.3.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı 55
4.2.3.3. Doğruluk/Kesinlik 56
4.2.3.4. Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD) 57
4.2.3.5. Analitik Geri Kazanım 57
4.2.4. UV–Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması 58
4.3. Birinci Derece Türev Spektroskopi Yöntemi 58
5. TARTIŞMA 63
6. SONUÇ 68
KAYNAKLAR 69
EKLER 74
EK-1. ÖZGEÇMİŞ 74
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU 75
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU 76

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimin ürünü olarak yaptığım bu tezin hazırlanmasında katkıları olan; değerli bilgilerini benimle paylaşan ilgisini, fikirlerini, yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na,

Kendilerine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanlarını ayırıp faydalı olabilmek adına ellerinden geleni yapan her sorun yaşadığımda yanlarına çekinmeden gidebildiğim değerli hocalarım; Sayın Doç. Dr. Alptuğ ATİLA' ya, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Onur ŞENOL'a ve Sayın Arş. Gör. Dr. M. Emrah YAMAN'a, yine çalışmamda bana sürekli yardımda bulunan Sayın Arş. Gör. Ç. Tuğrul AKMAN'a, her zaman beni destekleyen, sevgi ve ilgisini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili eşim Ahmet KINIK'a, ayrıca hiçbir zaman fedakarlıktan kaçınmayıp, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Merve YILDIZ KINIK

ÖZET

Etofenamat'ın Biyoanalitik Yöntem Validasyonu

Amaç: Etofenamat etken maddesinin farmasötik preparatlarda miktar tayinine yönelik UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi, Birinci Derece Türev Spektroskopi ve HPLC yöntemlerini geliştirmek, valide (geçerlilik testlerini) etmek ve uygulanabilir olduğunu göstermek için etofenamate etken maddesini içeren farmasötik preparatlarda etofenamate miktar tayininin yapılması amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot: UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi ve Birinci Derece Türev Spektroskopi yöntemlerinde, metanolde etofenamatın spektrumları alındı ve en iyi absorbans değerleri sırasıyla 286 nm ve 298 nm dalga boyları belirlendi ve çalışmada kullanıldı. HPLC yönteminde ise metanol:asetonitril:su (45:35:25, h/h/h) hareketli fazı, C18 ters faz kolonu, 1 mL/dk akış hızı, 10 µL enjeksiyon hacmi, iç standart (IS) cilostazol ve 286 nm dalga boyundan oluşan çalışma parametreleri kullanıldı. Her üç yöntemin çalışma parametreleri belirlendikten sonra doğrusallık, analitik geri kazanım, güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik gibi parametreleri içeren geçerlilik testleri yapıldı.

Bulgular: 0.5-45 µg/mL derişim aralığında HPLC yönteminin, 1-50 µg/mL derişim aralığında UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi ve Birinci Derece Türev Spektroskopi yöntemlerinin doğrusal olduğu tespit edildi. Güniçi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerlerinin her üç yöntem için sırasıyla %7.92 ve %3.11'den daha iyi, analitik geri kazanım değeri ise her üç yöntem için ortalama olarak % 98.50 olarak belirlendi.

Sonuç: Etofenamate için geliştirilen ve validasyonu yapılan HPLC, UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi ve Birinci Derece Türev Spektroskopi yöntemlerinin hassas, duyarlı, seçici, doğru ve kesin olduğu validasyon çalışmalarıyla gösterildiğinden dolayı yöntemlerin farmasötik preparatlarda kalite kontrol amaçlı çalışmalarda başarıyla uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Birinci Derece Türev Spektroskopi Yöntemi, Etofenamate, Farmasötik Preparat , HPLC, UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yöntemi.

ABSTRACT

Bioanalytical Method Validation of Etofenamate

Aim: It is aimed to determine the quantity of etofenamate in pharmaceutical formulations involving etofenamate agent in order to develop UV-Visible Absorption Spectroscopy, First-Order Derivative Spectroscopy and HPLC methods, validate (validity test) and show the applicability of methods developed for the determination of the quantity etofenamate agent in pharmaceutical formulations.

Material and Method: In the UV-Visible Absorption Spectroscopy and First-Order Derivative Spectroscopy methods, the spectrum of etofenamate was taken in methanol and optimum absorbance values were obtained in the wavelengths of 286nm and 298nm . In HPLC method, mobile phase (methanol:acetonitrile:water (45:35:25, v/v/v)), reverse phase column (C18), flow rate (1 mL/min), injection volume (10 µL), cilostazol as internal standard (IS) and wavelength (286 nm) were used as working parameters.After the determination of the working parameters of all three methods, validity tests including linearity, analytical recovery, intraday and inter-day accuracy and precision were performed.

Results: It was found that HPLC and UV-Visible Absorption Spectroscopy and First-Order Derivative Spectroscopy methods were linear in the concentration ranges of 0.5-45 µg/mL and 1-50 µg/mL respectively. The intra- and inter-day accuracy and precision rates for both methods were beteer than %7.92 and %3.11 respectively and the analytic recovery values for both methods were found to be 98.5% on the average.

Conclusion: It was concluded that the developed and validated HPLC and UV-Visible Absorption Spectroscopy methods for etofenamate could successfully be applied on pharmaceutical preparation since HPLC, UV-Visible Absorption Spectroscopy and First-Order Derivative Spectroscopy methods developed and validated for etofenamate were shown to be sensitive, selective, accurate and precise.

Keywords: First Order Derivate Spectroscopy method, Etofenamate, Pharmaceutical Preparation, HPLC, UV-Visible Absorption Spectroscopy method.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BH : Bağıl Hata

BSS : Bağıl Standart Sapma

GK : Geri Kazanım

HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

IS : İç Standart

LOD : Gözlenebilme Sınırı

LOQ : Miktar Tayin Alt Sınırı

ng : Nano Gram

nm : Nanometre

UV : Ultraviole

µg : Mikro Gram

µL : Mikro Litre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 2.1. NSAİİ'ler aracılığı ile COX enziminin inhibisyonu 7

Şekil 2.2. NSAİİ'ler ve araşidonik asit bağlantısı 9

Şekil 2.3. Etofenamatın sentez yolu..... 12

Şekil 2.4. Etofenamatın kimyasal yapısı..... 13

Şekil 2.5. Etofenamatın üç boyutlu görünümü 13

Şekil 2.6. Adsorpsiyon kromatografisinin temsili gösterilmesi..... 24

Şekil 2.7. Dağılma kromatografisinin temsili gösterilmesi 24

Şekil 2.8. Boyutlandırma kromatografisinin temsili gösterilmesi 25

Şekil 2.9. İyon değiştirme kromatografisinin temsili gösterilmesi..... 26

Şekil 2.10. HPLC sistemi..... 27

Şekil 2.11. HPLC kromatogramı 31

Şekil 2.12. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması..... 34

Şekil 2.13. Bir ışının b genişliğindeki bir küvet içinden geçerken lambert- beer soğrulmasının gösterimi 35

Şekil 2.14. Spektrofotometrenin temel bileşenleri 38

Şekil 2.15. Tek ışınlı spektrofotometrenin şematik yapısı..... 39

Şekil 2.16. Çift ışınlı spektrofotometrenin şematik yapısı..... 40

Şekil 4.1. 5 µg/mL derişiminde standart etofenamate çözeltisinin HPLC kromatogramı 49

Şekil 4.2. Artan derişime bağlı etofenamate standart çalışma çözeltilerinin HPLC kromatogramı (1,5,7.5,10,20,35 ve 40 µg/mL) 49

Şekil 4.3. HPLC yönteminin ortalama kalibrasyon eğrisi 50

Şekil 4.4. Etofenamate kalite kontrol çözeltilerine ait HPLC kromatogramı..... 51

Şekil 4.5. 2.5 µg/mL derişimde ılaç çözeltisine üç farklı derişimde olan etofenamate çözeltilerinin eklenmesi sonrası elde edilen çözeltilerin (5, 22.5, 37.5 µg/mL) HPLC kromatogramı 52

Şekil 4.6. 1.0 µg/mL derişimde standart etofenamate çözeltisinin spektrumu 54

Şekil 4.7. 1, 5, 10, 15, 25, 35, 45 ve 50 µg/mL derişimlerde etofenamate standart çalışma çözeltilerinin spektrumu 54

Şekil 4.8. UV-görünür bölge absorpsiyon spektroskopi yönteminde elde edilen ortalama kalibrasyon eğrisi..... 55

Şekil 4.9. 2,27 ve 47 µg/mL derişimlerde etofenamate kalite kontrol çözeltilerine ait UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumları 56

Şekil 4.10. 10 µg/mL derişimde ılaç çözeltisine eklenen üç farklı derişimde (3, 14 ve 36 µg/mL) etofenamate çözeltilerinin eklenmesi ile elde edilen çözeltilerin spektrumu 58

Şekil 4.11. 1.0 µg/mL derişimlerde etofenamate standart çalışma çözeltisinin birinci derece türev spektrumu..... 59

Şekil 4.12. 1,5,10,15,25,35,45 ve 50 µg/mL derişimlerde etofenamate standart çalışma çözeltilerinin birinci derece türev spektrumu 60

Şekil 4.13. Birinci derece türev spektroskopi yönteminde 298 nm dalga boyunda elde edilen kalibrasyon eğrileri 60

Şekil 4.14. 2,27 ve 47 µg/mL derişimlerde kalite kontrol çözeltilerine ait birinci derece türev spektrumu..... 61

Şekil 4.15. 10 µg/mL derişimde ılaç çözeltisine eklenen üç farklı derişimde (3, 14 , 36 µg/mL) etofenamate standart çalışma çözeltilerinin eklenmesi ile elde edilen çözeltilerin birinci derece türev spektrumu 62

TABLOLAR DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Tablo 2.1. Akut ve kronik inflamasyon arasındaki farkların karşılaştırılması 6

Tablo 2.2. NSAİİ'ların kimyasal yapısına göre sınıflandırması..... 8

Tablo 2.3. Etofenamat kimyasal ve fiziksel özellikleri..... 14

Tablo 2.4. Etofenamat yan etkileri..... 19

Tablo 2.5. Kolonun özellikleri..... 30

Tablo 3.1. HPLC yöntem şartları..... 47

Tablo 3.2. UV-görünür bölge absorpsiyon spektroskopi yöntem şartları..... 47

Tablo 4.1. HPLC yönteminin kalibrasyon eğrisinin istatiksel analiz değerleri 50

Tablo 4.2. HPLC yönteminin güniçi ve günler arası doğruluk- kesinlik değerleri..... 51

Tablo 4.3. Farmasötik preparatlarda yöntemin analitik geri kazanım değerleri (n=6) 52

Tablo 4.4. UV-görünür bölge absorpsiyon spektroskopi yöntemi ile edinilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonucu..... 55

Tablo 4.5. UV-görünür bölge absorpsiyon spektroskopi yönteminin günler arası ve güniçi kesinlik ve doğruluk değerleri(n=6) 57

Tablo 4.6. Farmasötik preparatlarda yöntemin analitik geri kazanım değerleri (286 nm)..... 58

Tablo 4.7. Birinci derece türev spektroskopi yönteminden elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonucu 61

Tablo 4.8. Farmasötik preparatlarda birinci derece türev spektroskopi yönteminin analitik geri kazanım değerleri (298nm) 61

1. GİRİŞ

Steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİİ'ler), ağrıyı azaltan, ateşi düşüren, kanın pıhtılaşmasını engelleyen ve yüksek dozlarda iltihabı azaltma gibi etkileri bulunan bir ilaç grubuna girer.Bu ilaçları steroidlerden ayırt etmek amacıyla Nonsteroidal terimi ilk defa 1960 yılında kullanılmıştır. Analjezik, antipiretik ve antiinflamatuar etkileri bulunan non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar farmakolojik etkileri ve aynı zamanda steroid yapıda olmamaları nedeniyle bu şekilde adlandırılırlar.[1-5] Günümüzde antibiyotiklerden sonra NSAİİ'lar en fazla kullanılan ilaçlardandır. Bunların semptomatik etkilerinin yanı sıra tedavi edici özellikleride vardır. Asetilsalisilik asit (aspirin) NSAİİ'ların prototipidir. Günümüzde ağrı ve inflamasyonun farmasötik tedavisinin de önemli bir parçası haline gelen NSAİİ'lar sıklıkla reçete edilen ilaçlardır. Spesifik ilaca bağlı olan yan etkilerle beraber genellikle gastrointestinal ülser kanama riski, kalp krizi ve böbrek hastalığı gibi riskler de taşımaktadır . NSAİİ'lar yarı ömürlerine göre uzun ve kısa etkili olmak üzere iki sınıfa ayrılırken kimyasal yapılarına göre ise koksib, nonasidik ve asidik olmak üzere üç farklı sınıfa ayrılırlar.[1-4]

Zedelenme, zararlı kimyasal maddeler ve mikrobiyolojik patojenlere karşı meydana gelen programlanmış nonspesifik immun yanıta inflamasyon denir. İnflamasyon mikroorganizmalar, yaralanmış hücreler, kimyasal ve fiziksel uyarıcılar gibi zararlılara karşı koymak için konakçının vermiş olduğu koruyucu bir cevaptır. Dokudaki vasküler yapı, immün sistem ve farklı hücrelerin katıldığı bir seri biyokimyasal olaylar inflamasyonun başlayıp gelişmesine sebep olur. İnflamasyon akut veya kronik olmak üzere iki farklı şekilde görülebilir. Akut inflamasyon zararlı uyaranlara karşı oluşturulan ilk cevaptır, plazma ve lökositlerin dokuya artmış göçü ile ilgilidir.[1] Akut inflamasyonda ağrı, ateş, kızarıklık, şişlik ve fonksiyon kaybı gibi klasik

bulgular görülmektedir. İnflamasyonun süresinde bir uzama olduğu zaman bu tablo yerini kronik inflamasyona bırakır. Ayrıca inflamatuar süreç bu bölgedeki hücrelerin progresif değişimi ile eşzamanlı olarak dokuda yıkımı takiben iyileşme süreci ile ilgilidir. İnflamasyonun iyileşme, fibrozis veya kronik bir tabloya doğru gitmesine dokunun ve yaralayıcı etkenin özellikleri etki etmektedir. Bu süreçteki inflamasyon bazen kronik inflamatuvar hastalıklarda dokuların yıkımına sebep olabilmektedir. [1]

2 - {[3- (trifloromethil) fenil] amino} benzoik asit 2- (2-hidroksietoksi) etil ester olan ve bir analjezik, antirhematik, antipiretik ve anti-enflamatuar olarak kullanılan etofenamat kimyasal olarak viskoz bir sıvıdır. . Etofenamat asidik, nonasidik ve koksib olmak üzere üç gruba ayrılan NSAİİ'ların asidik grubuna dahil olan karboksilik asit derivelerinden fumarik asit olarak bilinir.[2] Vücutta siklooksijenaz (COX) olarak bilinen bir enzimi engelleyerek çalışır. Enjeksiyon ve topikal jel şeklinde pazarlanan etofenamat artrit, kas romatizması, kas ağrısı, omzun periartriti, eklem ağrısı, bel ağrısı (lumbago), siyatik (iskiyalji), tendonit, spor yaralanmaları ve buna benzer çeşitli durumlarda tedavi için kullanılmaktadır. [2]

Etofenamat non-steroidal anti-inflamatuar bir ajandır. Antienflamatuar etkilerin yanı sıra analjezik, antipiretik ve trombosit inhibitör etkilerine de sahiptirler. Bunlar, prostaglandinlerin öncüleri olan araşidonik asidi, siklik endoperoksitlere dönüştüren siklooksijenazı baskılayarak prostaglandinlerin sentezini engelleyen bir etki gösterirler. Prostaglandin sentezinin inhibisyonu, analjezik, antipiretik ve trombosit inhibitör etkilerini açıklar; diğer mekanizmalar, anti-enflamatuar etkilerine katkıda bulunabilir. [3] Antifilojistik etkisi olan etofenamat inflamatuar süreçte birçok noktada etki göstermektedir. Prostaglandin sentez inhibisyonuna ilaveten, histamin ve hiyaluronidaz salıverilmesinin engellenmesi, serotonini ve bradikinin antagonize edici etkisi, kompleman aktivitesinin engellenmesi etkileri arasında yer almaktadır.Proteolitik

enzimlerin salıverilmesine membran stabilize edici özellikleri engel olur. Sonuç olarak, eksüdatif ve proliferatif inflamatuvar süreçleri engelleyerek anafilaktik reaksiyonlar ve yabancı madde reaksiyonları azalır.[1-3]

Birçok ticari isimde farmasötik müstahzarı bulunan etofenamat kas romatizması, kas spazmı ile birlikte görülen ağrılı omuz tutulması, lumbago siyatalji bursit omurga, perkütanöz ve eklemlerin mekanik dejeneratif harabiyetlerine bağlı olarak görülen yumuşak doku hastalıklarının tedavisinde kullanılan bir ilaçdır. Bu çalışmanın amacı etofenamat etkin maddesini içeren farmasötik preparatlarda etofenamat miktar tayinine yönelik basit, hızlı, seçici ve tekrarlanabilir UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi, Birinci Derece Türev Spektroskopi ve HPLC yöntemlerini optimum analiz koşullarını belirlemek, validasyonlarını yapmak ve geliştirilip valide edilmiş yöntemlerin uygulanabilir olduğunu göstermek için etofenamat etkin maddesini içeren farmasötik preparatlarda etofenamat miktar analizlerini gerçekleştirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

Antiinflamatuvar (antiflojistik) ilaçlar sağlık alanında yaygın bir kullanıma sahiptirler. Etkinliği en güçlü olarak antiinflamatuvar glukokortikoidler (steroid yapılı ilaçlar) bilinir. Steroid yapıdakilerin dışında non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar da (NSAİİ) çeşitli düzeylerde antiinflamatuvar etki gücüne sahiptirler ve steroid yapıdaki glukokortikoidlere kıyasla daha az yan etkileri vardır.[1-4] NSAİİ'lerin analjezik etkileri, opioid analjeziklerden daha düşük derecededir ve bağımlılık yapmazlar. NSAİİ'lerin bir kısmı aynı zamanda antipiretik etkiye sahiptir. Günümüzde kullanılmakta olan antiinflamatuvar ilaçlar arasında; yan etkilerinin diğer ilaçlara kıyasla daha az olması, aynı zamanda analjezik ve antipiretik etkileri de bulunması nedeniyle NSAİİ'ler akla ilk sırada gelmektedir. İnflamasyon ve ağrının eşlik ettiği hastalıkların farmasötik tedavisinde NSAİİ'ler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. [4]

2.1. İnflamasyon

İnflamasyon terimi tarihte ilk olarak Celsus tarafından M.Ö. 3000'li yıllarda eski Mısır papirüslerinde rubor (eritem), tumor (ödem) calor (ısı artışı) ve dolor (ağrı) şeklinde tanımlanmıştır. Bu bulgular tipik olarak akut enflamasyonda daha belirgin görülür. Beşinci bulgu ise fonksiyon kaybı olarak Rudolf Virchow tarafından 19 yüzyılda eklenmiştir. 1793 de İskoç cerrah John Hunter, inflamasyonun bir hastalık değil, spesifik dışı bir yanıt olduğunu öne sürmüştür.[1-8] Derideki inflamasyon üzerinde çalışan Thomas Lewis ise histaminin inflamasyondaki vasküler değişikliklere aracılık eden bir madde olduğunu öne sürmüştür. Bu kavramlar bütünüyle değerlendirildiğinde inflamasyonda kimyasal mediatörlerin önemine dikkat çekmiş ve antiinflamatuvar ajanların bu alanlarda kullanılması gerekliliğinin bir parçası olmuştur. Akut enflamasyon süreci, ilgili dokuda zaten mevcut olan yerleşik bağışıklık hücreleri, özellikle yerleşik makrofajlar, dendritik hücreler, histiyositler, kupffer hücreleri ve mast

hücreleri tarafından başlatılır. Akut inflamasyon, yaralanmaya karşı ilk savunma hattı olarak kabul edilebilir. Akut enflamatuar cevap, sürekli uyarılmayı gerektirir. Enflamatuar mediatörler kısa ömürlüdür ve dokuda hızla bozunur. Bu nedenle, uyarıcı faktör ortadan kalktıktan sonra akut inflamasyon kesilmeye başlar. Akut inflamasyonun üç önemli bileşeni vardır:[1-8]

1) Vasküler çap artışı nedeniyle kan akımında artış
2) Plazma proteinleri ve lökositlerin dolaşım sisteminden ayrılmasına neden olan mikrovasküler alanda yapısal değişiklikler
3) Lökositlerin mikrodolaşımdan ayrılıp yaralanma bölgesinde toplanması ve ajanı yok etmek için aktivasyonları.

Enfeksiyonlar; Toll benzeri reseptörler (TLR) ve belirli sitoplazmik reseptörler aracılığı ile bazı mediatörlerin salınımını indüklerler ve böylece inflamatuvar yanıt başlamış olur. İskemi, travma, fiziksel ve kimyasal zedelenme sonucunda meydana gelen doku nekrozu, ürik asit ve ATP aracılığı ile inflamatuar reaksiyonu başlatır. Ayrıca ortama salınan DNA, hipoksi, yabancı cisimler (kıymık, kir, sütur artıkları) ve immun reaksiyonlar da inflamasyonu tetikleyebilmektedir. İmmünolojik reaksiyon kişinin kendi dokularına yönelik olduğunda otoimmun hastalıklar ortaya çıkabilmekte, normal bir şekilde ve korumaya yönelik olarak gelişen bu immun reaksiyonlar kişinin kendi dokularına da zarar verebilmektedir.[1-8] Hipersensitivite reaksiyonları, çevresel uyaranlara karşı aşırı yanıt seklinde kendini gösterebilir. İnflamasyona neden olan uyaranın tipi, şiddeti, etkilenen dokunun özelliği ve kişinin verdiği yanıta bağlı olarak akut inflamasyon ya tamamen geriler, ya bağ dokusu rejenerasyonu ile iyileşir ya da kronik inflamasyona ilerler (Tablo 2.1). [4]

Tablo 2.1. Akut ve kronik inflamasyon arasındaki farkların karşılaştırılması [1]

	Akut	**Kronik**
Sebep olan ajan	Bakteriyel patojenler, yaralı dokular	Parçalanabilir olmayan patojenler, viral enfeksiyon, kalıcı yabancı cisimler veya otoimmün reaksiyonlar nedeniyle kalıcı akut inflamasyon
İlgili ana hücreler	nötrofiller (temel olarak), bazofiller (enflamatuar yanıt) ve eozinofiller (helmint solucanlarına ve parazitlere cevap), mononükleer hücreler (monositler, makrofajlar)	Mononükleer hücreler (monositler, makrofajlar, lenfositler, plazma hücreleri), fibroblastlar bulunur.
Birincil aracılar	Vazoaktif aminler, eikosanoidler	IFN-γ ve diğer sitokinler, büyüme faktörleri, reaktif oksijen türleri, hidrolitik enzimler
Başlangıç	Anında	Gecikmeli
Süre	Birkaç gün	Birkaç ay veya yıllar içerisinde
Sonuçlar	Çözünürlük, apse oluşumu, kronik inflamasyon	Doku yıkımı, fibroz, nekroz

Akut inflamasyonda, eğer zararlı ajan devam ederse, kronik inflamasyon meydana gelir. Günlerce, aylarca veya hatta yıllarca süren inflamasyonla işaretlenen bu işlem kronik bir yara oluşumuna yol açabilir.[1] Kronik inflamasyon, yaralanan dokudaki baskın makrofajların varlığı ile karakterizedir. Bu hücreler vücudun güçlü savunma ajanlarıdır, ancak salınan toksinler (reaktif oksijen türleri dahil) organizmanın kendi dokularına ve istilacı ajanlara zarar vermektedir. Sonuç olarak, kronik inflamasyona hemen hemen her zaman doku yıkımı eşlik eder. Akut inflamasyon vasküler değişiklikler, ödem ve nötrofilik infiltrasyonla karakterize iken kronik inflamasyonda makrofaj, lenfosit ve plazma hücrelerince zengin mononükleer hücre infiltrasyonu izlenir. Ayrıca doku yıkımı ve ardından bağ dokusu rejenerasyonu ile onarımı görülür. [1]

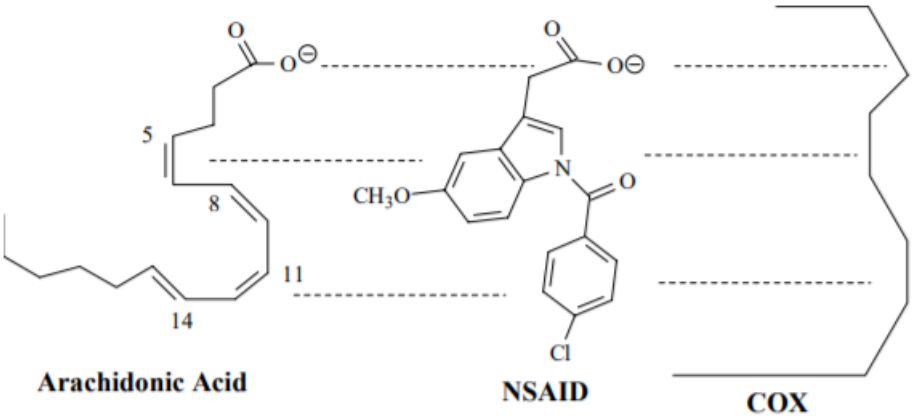
İnflamasyonun sistemik etkileri arasında kızarıklık, sıcaklık artışı, şişme, ağrı ve fonksiyon kaybı görülebilmektedir. Bu sistemik bulguların nedeni inflamatuvar uyarılarla artan sitokinler olabilmektedir. Akut faz yanıtı ateş, CRP, fibrinojen, serum amiloid A proteini gibi akut faz proteinlerinde artış ve lökositoz gibi bazı klinik patolojik değişiklikleri içermektedir. [1]

2.2. Non-Steroid Antiinflamatuar İlaçlar

NSAİİ'lerin terapötik etkilerini ortaya çıkardığı ana mekanizma (antipiretik, analjezik ve anti-enflamatuar aktiviteler) prostaglandin (PG) sentezinin inhibisyonudur. Spesifik olarak NSAİİ'ler rekabetçi bir şekilde, prostaglandinler oluşturmak üzere araşidonik asitten siklik endoperoksitlerin sentezini katalize eden enzimler olan siklooksijenazları (COX'ler) inhibe eder (Şekil 2.1). [5]

İki COX izoenzimi tanımlanmıştır: COX-1 ve COX-2. Yapısal olarak ifade edilen COX-1 sürekli olarak sentezlenir ve tüm dokularda ve hücre tiplerinde, özellikle de trombositlerde, endotel hücrelerinde, gastrointestinal (GI) kanalında, böbrek mikrovaskülatüründe, glomerülde ve toplama kanallarında bulunur. Bu nedenle, COX-1, trombosit agregasyonu, böbrek ve midede kan akışının düzenlenmesi ve mide asidi salgısının düzenlenmesi gibi homeostatik bakım prostaglandinlerinin üretimi için önemlidir. [5]

COX-2, böbrek, beyin, kemik, dişi üreme sistemi, neoplaziler ve GI kanalında bazı yapıcı ekspresyonlar olmasına rağmen, uyarılabilir bir izoenzim olarak kabul edilir. COX-2 izoenzimi ağrı ve enflamatuar süreçlerde önemli bir rol oynar. [5]



Şekil 2.1. NSAİİ'ler aracılığı ile COX enziminin inhibisyonu[5]

Eikozanoidlerin bir kaynağı olan araşidonik asit, hücre zarında bulunan fosfolipidlerden fosfolipaz A2 enziminin yardımı ile koparılır. NSAİİ'lar ise, COX

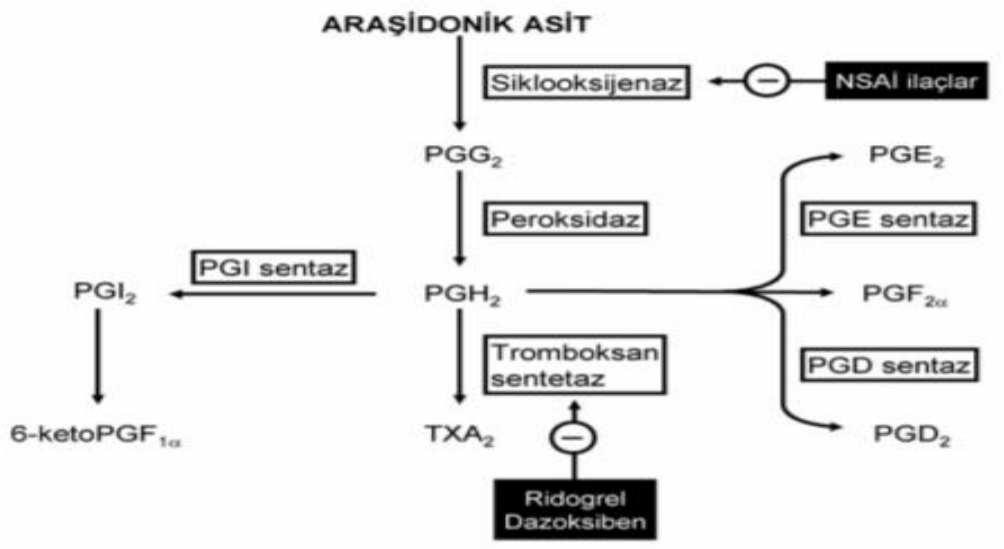
enzimini inhibe eder ve böylelikle inflamasyona aracılık eden COX ürünlerinin sentezini azaltırlar. NSAİİ'ların anti-inflamatuar etki güçleri ile COX enzimini inhibe etme potensleri arasında güçlü korelasyon vardır.[5-7] Kimyasal yapılarıyla belirlenen altı ana sınıftan, dünya çapında kullanım için mevcut olan 20'den fazla farklı nonsteroid antiinflamatuvar ilaç vardır. Bu ilaçlar dozlarında, ilaç etkileşimlerinde ve bazı yan etkilerinde farklılık gösterir. NSAİİ'lerin çoğu tamamen emilir, serum proteinlerine sıkıca bağlanır ve küçük hacimli dağılımlara sahiptir. NSAİD'ler çeşitli yollarla hepatik transformasyona uğrarlar.[6,7] NSAİD'lerin yarı ömürleri değişkendir, ancak genel olarak "kısa etkili" (ibuprofen, diklofenak, ketoprofen ve indometasin dahil altı saatten az) ve altı saatten fazla olan "uzun etkili" (naproksen, selekoksib, meloksikam, nabumeton ve piroksikam) formda bulunular. Diğer ilaçlar gibi, yarı ömrü daha uzun olan NSAİD'ler aktif metabolitlerin enterohepatik dolaşımını arttırma eğilimindedir (Tablo 2.2). [6,7]

Tablo 2.2. NSAİİ'ların kimyasal yapısına göre sınıflandırması

I.Asidik yapıdaki deriveler	
1. Karboksilik asit deriveleri	
1. Salisil ik asit ve esterler	Aspirin, Diflunisal, Kolin salisilat, Metil salisilat, Magnezyum Salisilat, Salisil salisilat (salsalat)
2. Fenamik asitler	Flufenamik asit, Metafenamik asit, Etofenamat, Meklofenamik asit, Niflumik asit
3. Propronik asitler	Ibuprofen, Naproksen, Flurbiprofen, Fenbufen, Benaksopropen, Fenoprofen, Ketoprofen, Indıprofen, Tiaprofenik asit, Soprofen, Karprofen, Oksaprozin, Pirprofen
4. Asetik asitler	Diklofenak, İndometazin, Etodolak, Sulindak, Tolmetin
2. Enolik Asitler	
1. Pirazolonlar	Fenilbutazon, Oksifenbutazon, Azopropazon, Piroksikam,
2. Oksikamlar	Pesoksikam, Sudoksikam, Tenoksikam, İsoksikam
II. Asit olmayan deriveler	Nabumeton
III. Koksible	Rofekoksib, Selekoksib, Valdekoksib, Parekoksib, Etorikoksib, Lumirakoksib

2.2.1. NSAİİ: Etki Mekanizması

Anti-piretik etki: Prostaglandin sentezi (PGE_2) esas olarak COX enzimi ekspresyonuna ve COX-1 veya COX-2 potent inhibitörlerine bağlıdır . Beyin COX'unun inhibisyonu ile çeşitli ilaçların anti-piretik potensleri arasında direkt doğrusal bir korelasyon vardır.[6,7] Asetaminofen periferik dokudaki zayıf bir COX inhibitörüdür ve önemli bir anti-enflamatuar aktiviteye sahip değildir; bununla birlikte, asetaminofen, sitokrom p450 sistemi tarafından beyinde oksitlenir ve okside olmuş form, insanlarda COX enzimini inhibe ederek ateşi düşürmede etkindir. NSAİİ'ler gibi naproksen veya ibuprofen ayrıca çok iyi bir anti-piretiktir. Bununla birlikte, PGE_2'nin normal termo regülasyonda bir rolü yoktur, aspirin veya NSAİİ'lerin artritte kronik kullanımı, normal vücut ısısını düşürmez. [6,7]



Şekil 2.2. NSAİİ'ler ve araşidonik asit bağlantısı [6]

Siklooksijenaz inhibisyonu: NSAİİ'lerin birincil etkisi, siklooksijenazın (COX; prostaglandin sentaz) inhibe edilmesi ve böylece araşidonik asidin prostaglandinler, prostasiklin ve tromboksanlara nihai dönüşümü bozmasıdır (Şekil 2.2). [6,7]

Siklooksijenaz enzimleri: COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki COX enzimi izoformu tarif edilmiştir. COX-1 ve COX-2 izoformları, araşidonik asidin katalizinde

görünüşte korunmuş olan amino asit dizilerinde yüzde 60 benzerliğe sahiptir. Belirli bir NSAİİ'in bir COX izoformunu inhibe etmesindeki farklılıklar, hem aktivitesini hem de toksisitesini değiştirebilir. Geleneksel NSAİİ'lerin çoğu, hem COX-1 hem de COX-2'nin seçici olmayan inhibitörleridir. NSAİİ'lerin gastrointestinal sistem üzerindeki toksisitesi , büyük ölçüde COX-1'in inhibisyonu ile ilgili olduğu için, COX-1'in terapötik dozlarda inhibe etmeyen yüksek oranda seçici COX-2 inhibitörleri geliştirilmiştir. [6,7]

İki izoform arasındaki en önemli fark, enzimlerin farklı dokulardaki düzenlenmesi ve ekspresyonudur. COX-1 çoğu dokuda ifade edilir ancak değişkendir. Normal hücresel süreçleri (örneğin gastrik sitoproteksiyon, vasküler homeostaz, trombosit agregasyonu ve böbrek fonksiyonu gibi) düzenleyen "temizlik" enzimi olarak tanımlanır ve hormonlar veya büyüme faktörleri tarafından uyarılır. COX-2 çoğu dokuda genellikle tespit edilemez; ekspresyonu, iltihaplanma durumlarında veya mitojenik uyaranlara cevap olarak deneysel olarak arttırılır. COX-2 temel olarak beyinde, böbrekte, kemikte ve muhtemelen kadın üreme sisteminde ifade edilir; COX-2'nin ayırt edici bir özelliği ekspresyonunun glukokortikoidler tarafından inhibe edilmesidir. [6,7]

2.2.2. Farmakokinetik

Nonsteroidal antienflamatuar ilaçların çoğu, pKa değeri 3-5 olan zayıf asitlerdir. Mide ve ince bağırsak mukozasından iyi derecede emilirler. Plazmada (tipik olarak>% 95), yüksek oranda proteine bağlı bulunurlar, bu protein genellikle albümindir. NSAİİ'lerin çoğu karaciğerde oksidasyona uğrar ve idrarla tipik olarak atılan aktif olmayan metabolitlere konjüge edilerek metabolize edilir, bazı ilaçlar ise safrayla atılır. Metabolizmanın anormal olduğu bazı hastalık durumlarında, normal ilaç dozajlarında

bile birikim görülebilir. İbuprofen ve diklofenakın yarı ömrü kısadır (2-3 saat). Bazı NSAİİ'lerin (tipik olarak oxicam'lar) çok uzun yarı ömürleri vardır (örn. 20-60 saat). [8,9]

2.2.3. İlaç Etkileşimleri

NSAİİ'ler böbrek kan akışını azaltır ve böylece diüretiklerin etkinliğini azaltır ve lityum ve metotreksatın ortadan kaldırılmasını önler. NSAİİ'ler, warfarin gibi kan pıhtılaşmasını azaltan diğer ilaçlarla birleştirildiğinde etkisi ciddi olabilen hipokoagülanlığa neden olur. NSAİİ'ler, hipertansiyonu şiddetlendirebilir ve böylece ACE İnhibitörleri gibi antihipertansif ilaçların etkisini hafifletebilir. Anandamid bozundurucu membran enzimi yağ asidi amid hidrolazı (FAAH) bloke ederek endokannabinoid sinyalini arttırırlar. NSAİİ'ler ayrıca bazı antidepresanları etkileyebilir ve etkilerini azaltabilir. Örneğin diüretikler diürezin azalmasına ve beta blokerin antihipertansif etkisinin azalmasına neden olabilir.[8,9]

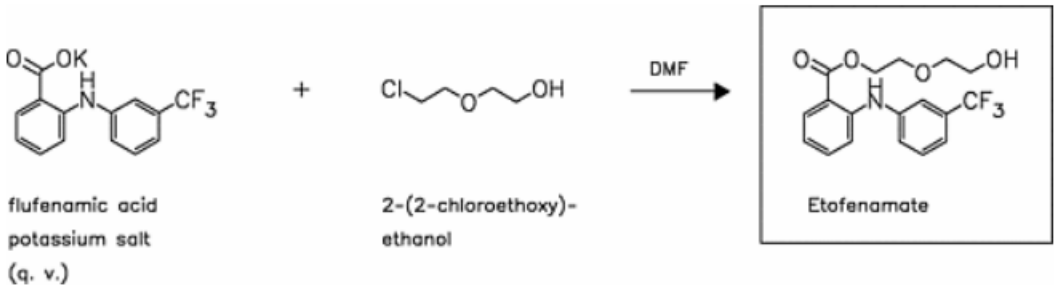
2.2.4. NSAİD'lerin Yan Etkileri

Dispepsi, bulantı ve mide ekşimesi, çoğunlukla üst gastrointestinal kanalda ortaya çıkan, NSAID'lerin en sık görülen yan etkileri olarak bildirilmektedir. Hastalar bu yan etkileri fark eder ve klinikte kolayca teşhis edilebilir. Yan etkileri kontrol etmek için çeşitli etkili gastroduodenal koruyucu yaklaşımlar bildirilmiştir. Daha ciddi gastrointestinal semptomlar, gastrointestinal sistemin distal segmentinde, örneğin diyafram hastalığı (NSAİİ'lerin uzun süreli kullanımı ile ilişkili nadir bir durum) ortaya çıkar.[8-10] Tüm NSAİİ'lerin bu etkilere neden olduğu bilinmektedir. COX-2 inhibitörlerinin istenmeyen gastrointestinal yan etkiler ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. NSAİİ'ler böbreklerde ters ilaç reaksiyonlarının oldukça yüksek oranda görülmesi ile ilişkilidir ve zamanla kronik böbrek hastalığına neden olabilir. Kardiyak etkiler arasında kan basıncında artış, sodyum ve su tutma, konjestif kalp yetmezliği ve atriyal fibrilasyon görülebilmektedir.[8-10]

2.3. Etofenamate

Etofenamate kimyasal olarak viskoz bir sıvı halinde bulunan ve bir analjezik, antihematik, antipiretik ve anti-enflamatuar olarak kullanılan 2 - {[3- (triflorometil) fenil] amino} benzoik asit 2- (2-hidroksietoksi) etil esterdir. Etofenamat, kas-iskelet sistemi rahatsızlıklarının, yumuşak doku travmasının ve bazı enflamatuar cilt hastalıklarının tedavisinde anti-enflamatuar özellikleri için kullanılan bir antranilik asit türevidir. Genellikle ağrı, şişlik ve bazen de morarmanın eşlik ettiği spor veya günlük aktiviteler sonucunda gerçekleşen burkulmalar gibi künt travmaların dış semptomatik tedavisinde kullanılır. Romatizma ve burkulma için topikal preparatlar halinde pazarlanmaktadır. [11]

Etofenamat kimyasal ismi flufenamik asit potasyum tuzu olan benzoik asit, 2 - [[3- (triflorometil) fenil] amino] -, monopotasyum tuzu ile kimyasal ismi 2- (2-hidroksietoksi) etil klorür olan Etanol, 2- (2-kloroetoksi) referans maddelerinden sentez edilir (Şekil 2.3). [12]



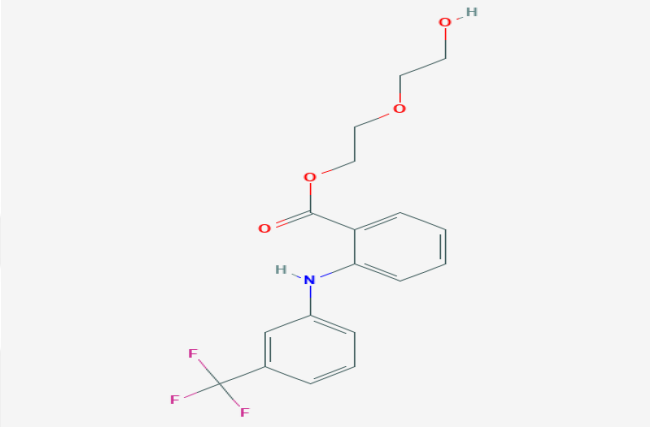
Şekil 2.3. Etofenamatın sentez yolu [12]

Etofenamat, enflamatuar sürecin çeşitli noktalarına etki eder: prostaglandin sentezinin inhibisyonu, histamin salımının inhibisyonu ve hiyalüronidaz salımının inhibisyonu belirtilmiştir. [13]

Soluk sarı viskoz bir sıvıdır, metanolde serbestçe çözünür ve pratikte suda çözünmez. Etofenamat pK_a değeri 6.0 ve 7.0'dır. Zorunlu bozunma çalışmaları tarafından etofenamatın stabilitesi için ince tabaka yüksek performanslı kromatografik

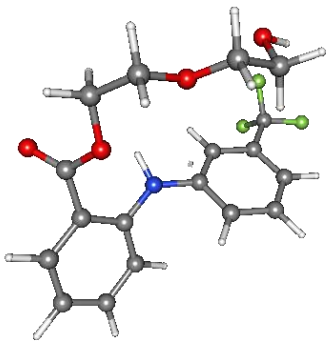
(HPTLC) yöntem ve stabilite gösteren HPLC yöntem bildirilmiştir. Biyolojik numunelerdeki etofenamatın kantitatif analizi için sıvı kromatografi ve kütle spektrofotometrik (LC-MS) yöntemleri rapor edilmiştir. [13]

Etofenamat etkin maddesi piyasa preperatları Doline, Efamat Jel, Fleximat, Flexo, Restafen, Rheumon, Paınex isimlerinde topikal jel, krem, sprey ve enjekte tablet formlarında bulunmaktadır. [14]



Şekil 2.4. Etofenamatın kimyasal yapısı [3]

Etofenamatın kimyasal ismi; 2 - [[3- (triflorometil) fenil] amino] benzoik asit -2-(2-hidroksietoksi) etil ester şeklinde okunur. Moleküler formül: $C_{18}H_{18}F_3NO_4$ (Şekil 2.4. ve Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Etofenamatın üç boyutlu görünümü [3]

2.3.1. Etofenamat Etki Mekanizması

Etofenamat, enflamatuar sürecin çeşitli noktalarına etki eder: prostaglandin sentezinin inhibe edilmesine ek olarak, histamin salımının inhibisyonu ve hiyalüronidaz

salımının inhibisyonu da belirtilmektedir. Vücutta siklooksijenaz (COX) olarak bilinen bir enzimi bloke ederek çalışır. Prostaglandin sentezi (PGE2) esas olarak COX enzimi ekspresyonuna ve COX-1 veya COX-2 potent inhibitörlerine bağlıdır. PGE2 reseptör blokajı özelliği olan Etofenamat, artrit, kas romatizması, kas ağrısı, omzun periartriti, eklem ağrısı, bel ağrısı (lumbago), siyatik (iskiyalji), tendonit, spor yaralanmaları ve benzeri çeşitli durumların tedavisi için enjeksiyon ve topikal jel şeklinde pazarlanmaktadır.[14] Etofenamatın kimyasal ve fiziksel özellikleri Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Etofenamat kimyasal ve fiziksel özellikleri [3]

Özellik Adı	**Değeri**
Moleküler ağırlık	369.34 g/mol
XLogP3	4.7
Hidrojen Bağı verici Sayısı	2
Hidrojen Bağı Alıcısı Sayısı	8
Kimyasal isimler	Bayrogel, Rheumon, Rheumon jeli
Moleküler formülü	$C_{18}H_{18}F_3NO_4$
Erime noktası	130– 135°C
Topolojik Polar Yüzey Alanı	67.8 A^2
Ağır Atom Sayısı	26
İzotop Atom Sayısı	0
Tanımlanmış Atom Stereocenter Sayısı	0
Tanımsız Atom Stereocenter Sayısı	0
Tanımlanmış Bond Stereocenter Sayısı	0
Tanımsız Bond Stereocenter Sayısı	0
Kovalent Bağlanmış Birim Sayım	1
Bileşik Kanonikleştirildi	Evet

2.3.2. Etofenamat İle İlgili Yapılan Çalışmalar

AB klinik araştırma kayıtlarında etofenamat ile ilgili kayıtlarda literatüre geçen 2014 yılında tamamlanan faz 2 çalışması bulunmaktadır. Akut komplikasyonsuz tek taraflı ayak bileği burkulması tedavisinde etofenamat %5'lik bir kutanöz yamanın

plaseboya karşı etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek için yapılan randomize, kontrollü, çift kör, çok merkezli bu çalışmanın akut komplikasyonsuz tek taraflı ayak bileği burkulması olan hastalarda 7 gün boyunca günde iki kez uygulanan bir etofenamat % 5 (EFM) deri yamasının etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek için yapıldığı belirtilmektedir. [15]

Fare ve sıçanlarda subkutan uygulanan etofenamatın doza bağlı oakut toksisite etkileri yapılan toksisite testlerinde sınıflandırılmıştır; bunlar kanda normositik anemi, davranışlarda uyuşukluk ve gastrointestinal diğer belirtilerdir. [15]

Tek doz 1 g etofenamat kullanılarak gerçekleştirilen klinik bir araştırma sonucunda, etofenamatın akut ağrının tedavisinde etkili olduğunu kanısına varılmıştır. Etofenamat uygulanması, faydalanıcıların ve acil durum personelinin memnuniyetini sağlayarak bu ilacın tıbbi hizmetlerde ve birinci basamak acil durumlarında alternatif bir tedavi olabileceği düşüncesi savunulmuştur. [15]

Etofenamat tayinine ait ilk çalışmalar Dell ve ark.[16] yaptıkları 1977 yılından itibaren yayımlanmış araştırmalar dizinidir. Dell ve ark.'larının biyolojik örnekte etofenamat tayini çalışmasına göre; insan idrarında etofenamat miktar tayini gaz-sıvı kromatografisi yöntemiyle belirlenmiştir. Etofenamat TLC (İnce Tabaka Kromotografi), türevlendirme, UV ve floresans spektroskopisi yöntemleriyle tanımlanabilir ve metabolitlerinden ayırt edilebilir olduğu belirtilmiştir. Etofenamatın iltihaplı dokudaki fenamatların ana bileşeni olduğu gösterilmiştir.[16,17]

Dannhardt ve ark.[18] yaptıkları biyolojik materyalden etofenamat tayini yaptıkları çalışmada HPLC yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada; C_{18} kolon, 2 mL enjeksiyon hacmi, dakikada 1 mL/dk akış hızı ve çözücü olarak asetonitril/metanol kullanılarak 286 nm dalga boyu paramatreleri kullanılmış ve sıçanlardan izole edilen sinovyal sıvı örneğinde çalışma yapılmıştır. Sonucunda; dokuda etofenamate tespit edilememiş fakat

metaboliti olan flufenamik asit tayini yapılmış, ve büyük derişimlerde ölçülm işlemleri yapılmıştır.[18]

Peraman ve ark.[19] RP-HPLC yönteminini geliştirip valide etmişlerdir. Bu çalışmada, C18 kolon, fosfat tamponu (ortofosforik asit ile pH 6.0'a ayarlanmış) ve metanol (20:80 h/h) den oluşan hareketli faz, 1.0 mL/dk akış hızı ve 286 nm'de ayarlanan bir fotodiyot dizi detektör çalışma parametrelerini kullanmışlardır. Yöntem özgüllük, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, tespit limiti, nicelik limiti ve sağlamlık parametreleri ile valide edilmiştir.

Peraman ve ark.[20] yaptıkları bir başka çalışmada da dozaj formundaki etofenamatın rutin analizi için ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminini geliştirip valide etmişlerdir. Metanol ve %0.2 trietilamin (85:15 h/h, pH 6.5'e ayarlanmış) hareketli faz, 1.2 mL/dk akış hızı çalışma parametrelerini kullanmışlardır. Etofenamat alıkonma süresi 5.3 dk ve yöntemin doğrusallık aralığı 5–110 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca yöntemin LOD değeri 0.472 µg/mL, LOQ değeri 1.416 µg/mL ve doğruluk % 99.6 – 101.3 olarak tespit edilmiştir.

İntramüsküler etofenamat ve intramüsküler diklofenakın akut renal kolik rölyefteki etkinliğini ve yan etkilerinin karşılaştırıldığı randomize, tek kör, karşılaştırmalı bir çalışmada hafif ila orta dereceli yan etkiler, etofenamat alan hastaların %3.4'ünde ve diklofenak alan hastaların % 5.0'ında bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda diklofenak ve etofenamatın, benzer şekilde etkili olduğu ve akut böbrek kolik rölyefinde tolere edildiği bildirilmiştir. [21]

Etofenamat tedavisi nedeniyle ortaya çıkan ilk toksik epidermal nekroliz vakası literatüre göre 2010 yılında yayımlanan bir olgu raporunda bildirilmiştir. Toksik epidermal nekroliz (Lyell sendromu), ilaçlar tarafından en sık tetiklenen nadir, akut ve potansiyel olarak yaşamı tehdit edici bir mukokutanöz hastalıktır. [22]

2.3.3. Etofenamat İlacının Yan Etkileri

Alerjik kontakt dermatit en sık bildirilen kutanöz reaksiyondur. Etofenamat içeren topikal ajanların sık kullanımı ve güneşe maruz kalma kontakt fotoalerjiye yatkınlığa neden olabilir. [14]

Aşırı duyarlılık reaksiyonları: spesifik olmayan alerjik reaksiyonlar ve anafilaksi; astım, bronkospazm veya dispneyi içeren solunum yolu reaktivitesi; veya çeşitli tiplerde döküntü, pruritus, ürtiker, purpura, anjiyoödem ve daha nadiren pul pul ve büllöz dermatozlar (epidermal nekroliz ve eritema multiforme) dahil olmak üzere çeşitli cilt hastalıkları. [23]

Yaygın yan etkiler: mide bulantısı, kusma, ishal gibi şikayetleri ve istisnai vakalarda kansızlığa neden olabilen hafif mide-barsak sisteminde görülebilecek kan kaybı. [23]

Yaygın olmayan yan etkiler: baş ağrısı, eksitasyon, asabiyet, yorgunluk, sersemlik ve baş dönmesi. Hazım bozuklukları, midede gaz toplanması, karında kramp, iştah kaybı, mide ve oniki parmak barsağı ülserleri (bazen kanama ve perforasyonla birlikte olan). Ciltte döküntü ve kaşıntı gibi aşırı duyarlılık reaksiyonları. Kanda karaciğer enzimlerinde (serum transaminazlar) yükselme. [23]

Seyrek yan etkiler: Kan yapımı bozuklukları (anemi, lökopeni, agrenülositoz, trombositopeni). Başlangıç semptomları ateş, boğaz ağrısı, ağızda yüzeysel lezyonlar, grip benzeri belirtiler, ciddi yorgunluk, burun kanaması ve ciltte kanamaları içerir. Uzun süreli tedavi alan hastaların kan tablosu düzenli aralıklarla izlenmelidir. Kusmuk, dışkı veya ishalde kan görülmesi. Ürtiker ve/veya saç dökülmesi. Karaciğer hasarı (sarılıkla beraber olan veya olmayan hepatit, çok nadir vakalarda fulminan gidişli, nadiren prodromal semptomlar da olmadan). Bu nedenle, hastanın karaciğer değerleri düzenli

olarak takip edilmelidir. Özellikle kan basıncı yüksek olan (hipertansif) hastalar ya da böbrek fonksiyonları bozulmuş hastalarda ödem (periferal ödem) gelişebilir. [23]

Çok seyrek yan etkiler: Çarpıntı, göğüs ağrısı, yüksek kan basıncı ve dolaşım kollapsı, kalp yetmezliği, hemolitik anemi, duyularda bozukluk, tat alma duyusu bozuklukları, kulaklarda çınlama ve duymada geçici bozukluk, hafızda zayıflama, oryantasyon bozukluğu, havaleler, endişe hali, gece kabusları, titreme, depresyon ve diğer psikotik reaksiyonlardır. Ağız mukozasında, dilde enflamasyonlar, yemek borusunda lezyonlar, alt karın bölgesinde şikayetler ve kabızlık, görme bozuklukları (bulanık görme ve/veya çift görme), deride içi sıvı dolu kabarcıklı döküntü, egzama, kızarıklık, ışığa duyarlılık, kabarıklık (ayrıca alerjik purpura) görülebilmektedir. [23]

Tek tük vakada: Akut böbrek yetmezliğinin eşlik edebileceği böbrek hasarı (interstisyel nefrit, papiller nekroz), idrarda protein (proteinüri) ve/veya idrarda kan (hematüri) da görülebilmektedir. [23]

İzole vakalarda nefritik sendrom gelişebilir. Bu nedenle böbrek fonksiyonu düzenli olarak kontrol edilmelidir. [23]

İzole vakalarda pankreas enflamasyonu bildirilmiştir. İzole vakalarda, kan damarlarında ve akciğerlerde alerjiye bağlı enflamasyon gözlenmiştir. [23]

İzole vakalarda, steroid olmayan anti-enflamatuvar ilaçların uygulandığı anda enfeksiyona bağlı enflamasyon (nekrozitan fasiitis gelişimi) kötüleşebilir. Bu muhtemelen steroid olmayan anti-enflamatuvar ilaçların etki mekanizması ile bağlantılıdır. Kas içi uygulama sonrası, yaygın olmayarak enjeksiyon yerinde lokal yan etkiler (yanma hissi) veya doku hasarı (steril apse oluşumu, yağlı doku veya deri nekrozu gibi) görülebilir. Etofenamatın yan etkileri toplu olarak Tablo 2.4'de verilmiştir. [23]

Tablo 2.4. Etofenamat yan etkileri

Sistem/ organ	Sıklık	Yan etki
Deri ve Subkutan Dokularda Bozukluk	Seyrek	Eritem, Ciltte yanma hissi
	Çok nadir	Dermatit (örneğin yoğun kaşıntı, deri döküntüleri, şişmesi, büllü püskürmesi)
	Bilinmiyor	Fotosensitivite
İmmün Sistem Bozuklukları	Bilinmiyor	Aşırı duyarlılık

2.3.4. Enjeksiyon Formu İçin Endikasyonlar

- Dejeneratif eklem hastalığı, eklem kireçlenmesi (osteoartrit)
- Eklem iltihabı ile görülen romatizmal hastalık (romatoid artrit)
- Özellikle omurga eklemlerinde birleşme ve hareket kaybı ile görülen romatizmal bir hastalık (ankilozan spondilit)
- Zaman zaman ani şekilde ortaya çıkan, sıklıkla ayak baş parmağındaki iltihapla kendini gösteren, eklemler üzerinde ileri derecede ağrıya, duyarlılığa, kızarıklığa ve şişkinliğe neden olan eklem iltihabı (akut gut artriti)
- Akut kas iskelet sistemi ağrıları
- Ameliyat sonrası görülebilen inflamasyon, şişkinlik ve yumuşak doku hasarı (postoperatif ağrı)
- Adet ağrısı (dismenore)

Enjeksiyonluk çözelti, sadece etofenamatın lokal uygulamasının yararlı olmadığı veya uygun olmadığı durumlarda kullanılır. Kural olarak, tedavi tek bir enjeksiyonla sınırlandırılmalıdır. [24]

2.3.5. Kontrendikasyonlar

- Etofenamat, flufenamik asit, diğer steroidal olmayan antienflamatuvarlara karşı aşırı duyarlılık[24]

- Açık yaralanmalarda, iltihaplanmalarda veya cilt enfeksiyonlarında, aynı zamanda mukoza zarları veya cilt egzamasında[24]
- Çocuklar ve gençlerde, klinik deneyim sınırlı olduğundan, kontraendikedir.[24]

Gebelikte: Gebe kadınlarda etofenamat kullanımından yeterli veri yoktur. Prostaglandin sentezi inhibisyonunun gebelik üzerindeki etkisi henüz tam olarak keşfedilmediğinden, risk / fayda oranını dikkatlice tarttıktan sonra sadece gebeliğin ilk ve ikinci trimesterinde kullanılmalıdır.[24] Maksimum günlük doz aşılmamalıdır. Hamileliğin son üç ayında, bu tıbbi ürünlerin etki mekanizması, işgücü aktivitesinin baskılanmasına, hamileliğin uzamasına ve uzun bir doğum sürecine yol açabilir. Ayrıca, çocukta kardiyovasküler ve renal toksisiteye, annede çocukta kanama eğiliminin artmasına ve artmış kanama eğilimine neden olabilir.[24]

Emzirmede: Etofenamat anne sütüne az miktarda geçtiğinden, emziren anneler tarafından uzun süre kullanımından kaçınılmalıdır. Önerilen günlük doz aşılmamalıdır. Bebek tarafından emilmesini önlemek için, emziren anneler bu tıbbi ürünleri göğüs bölgelerinde kullanmamalıdır. [24]

2.3.6. Farmakodinamik ve Farmakokinetik Etkiler

Etofenamat, enflamatuar sürecin çeşitli noktalarına etki eder: prostaglandin sentezinin inhibe edilmesine ek olarak, histamin salımının inhibisyonu ve hiyalüronidaz salımının inhibisyonu da belirlenmiştir. Diğer NSAİİ'ler gibi, etofenamatın plazma proteinlerine (%98) yüksek derecede bağlı olduğunu ve aynı çalışmada, aktif metabolit flufenamik asidin plazma protein bağlanmasının % 99 olduğunu göstermiştir.[24]

Etofenamat karaciğerde oksidasyon ve konjugasyon yoluyla metabolize edilir. Bu madde 5-OH-, 4'-OH- ve 5,4 'dihidroksietofenamat ve flufenamik aside (aktif metabolit olarak), 5-OH, 4'-OH ve 5,4'-dihidroksiflufenamik aside indirgenir.

Etofenamat, çok sayıda metabolit (hidroksilasyon, eter ve ester ayrılması) ve bunların konjugatları, renal olarak (%55) ve dışkı formunda atılır. Topikal uygulamadan sonra 3.3 saatlik bir eliminasyon yarı ömrü bulunur. [24]

Yaklaşık 58000 hastayı kapsayan klinik çalışmalarda, farklı topikal etofenamat formülasyonları, kontüzyonlar, burkulmalar, muskestinler ve aşırı zorlanma yaralanmalarının (örneğin, tendovaginit veya bursit) yanı sıra spondilartrit, epikondilit, periartrit humerodcapularis, lumbago ve gonartrit gibi belirli romatizmal hastalıkların künt travmaların iyileştirilmesinde etkinlik göstermiştir. Yaklaşık 3.100 hastada randomize plasebo veya aktif kontrollü klinik çalışmalarda topikal etofenamat formülasyonları, plasebo tedavisine karşı üstünlük ve aktif topikal karşılaştırıcı ürünlere karşı karşılaştırılabilir etkinlik göstermiştir. [24]

2.3.7. İlaç Etkileşimi

Aspirin ve diğer NSAİ ilaçlarla birlikte kullanılmamalıdır. Aşağıdaki ilaçlarla dikkatle kullanılmalıdır.

- Anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri (yüksek kan basıncı tedavisinde kullanılırlar)
- Furasemid ve diüretik (idrar söktürücü) ilaçlar
- Antihipertansifler (yüksek kan basıncını düşüren ilaçlar)
- Lityum (mani ve depresyon tedavisinde kullanılır)
- Metotreksat (romatoid artrit ve bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılır)
- Kanın pıhtılaşmasını engelleyen veya kanın sulandıran varfarin ve benzeri ilaçlar
- Digoksin (kalp yetmezliği tedavisinde kullanılır)
- Fenitoin (epilepsi tedavisinde kullanılır)

- Kortikosteroidler (inflamasyon, alerji veya organ transplantasyonu gibi oldukça geniş yelpazede kullanılan bir ilaç grubu)
- Potasyum tutucu idrar söktürücüler
- Seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) (depresyon tedavisinde kullanılırlar)
- Probenesid veya sülfinpirazon (kandaki artmış ürik asit düzeylerini düşürmek için kullanılırlar)
- Alkol
- Siklosporin (doku reddini önlemek için kullanılır)
- Antidiyabetik ilaçlar (kan şekerini düşürmek için kullanılırlar) [23,24]

2.4. Kromotografi

Kromatografinin ilk uygulamaları Rus botanikçi Mikhail Tsvet tarafından, 1903'de gerçekleştirildi. Bitki yapraklarına renk veren pigmentlerin (klorofil) ayrımı için kullanılmıştır. Kromatografi terimi, Yunanca chróma(renk) ve grafí(yazı) sözcüklerinden türemiş renkli yazılım demektir.

Kromatografi; ilk olarak bir ayırma tekniği olarak ortaya çıkmıştır ve günümüzde de bir örnek karışımında bulunan bileşenlerin veya istenilen bir bileşenin diğer bileşenlerden ayrılmasında çok kullanılmaktadır. Ayırımda temel kural bileşenlerin sabit bir faz üzerinden hareketli faz yardımıyla yürütülmesi esnasında bileşenlerin farklı yürüme hızlarından yararlanarak bileşenlerin ayrılmasıdır. Hareketli (mobil) faz; ince tabaka yüzeyi veya kolondan geçerken numunedeki bileşenlerin sabit faz ile etkileşip farklı yürüme hızlarında hareket edip birbirlerinden ayrılmasını sağlar. Hareketli faz gaz veya sıvı olabilmektedir. Eğer hareketli faz gaz ise bu kromatografi Gaz Kromatografisi (GC) olarak eğer sıvı ise bu seferde Sıvı Kromatografisi (LC) olarak adlandırılmaktadır.[25]

Sabit faz sabit düz bir yüzey üzerine kaplanmış veya bir kolon içerisine doldurulmuş halde bulunur. Sabit bir yüzeye kaplanmış haldeki kromatografi türlerine İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), sabir faz kolon içerisinde bulunan kromatografi türleri, Kolon Kromatografisi, Gaz Kromatografisi veya Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi olarak sınıflandırılabilir.[25]

2.4.1. Kromotografi Türleri

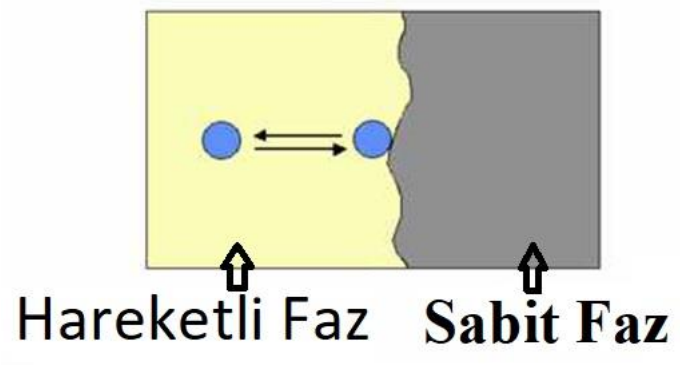
Ayrılma mekanizmalarına göre kromatografi beşe ayrılır. Bunlar:[25]

- Adsorpsiyon Kromatografisi
- Dağılma (Partisyon) Kromatografisi
- Boyutlandırma (Eleme:Jel Filtrasyon ve Jel Geçirgenlik) Kromatografisi
- İyon Değiştirme Kromatografisi
- Afinite Kromatografisi

2.4.1.1. Adsorpsiyon Kromatografisi

Bileşenler katı olan sabit bir üzerinden geçerken katı yüzeyinde farklı güçlerde tutunması yani katı yüzeyinde adsorbe olmaları esasına göre bileşenlerin ayrılmasında kullanılan bir kromatografi tekniğidir (Şekil 2.6). Hareketli fazın özelliğine göre adsorpsiyon kromatografisi sıvı-katı kromatografi ve gaz-katı kromatografisi olarak sınıflandırılır.

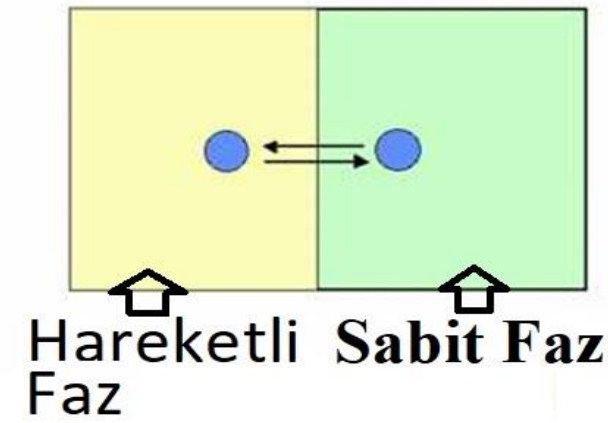
Adsorbsiyon kromatografisinde sabit faz üzerine adsorbe olma prensibine göre maddeler ayrıldığından dolayı, sabit faz adsorbe olan maddeleri parçalamamalı ve bu maddeler ile kimyasal reaksiyon vermemelidir. Ayrıca adsorpsiyon kapasitesi yüksek olmalı ve adsorplanan maddeler yüzeyeden kolaylıkla uzaklaşabilmelidir. [25]



Şekil 2.6. Adsorpsiyon kromatografisinin temsili gösterilmesi

2.4.1.2. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi

Dağılma kromatografisinde; maddeler sabit faz (sıvı) ve hareketli fazda farklı çözünürlüklere sahip olmalarından dolayı her iki fazda farklı oranlarda dağılmalarından yararlanarak numune bileşenlerinin ayrılmasında kullanılan kromatografi tekniğidir (Şekil 2.7). Biribiri ile karışmayan iki farklı sıvı arasında madde dağıldığından dolayı ve belirli bir süre sonunda dengeye ulaştığından maddelerin her iki fazda dağılımı dağılma katsayısıyla (Kd) ifade edilir. Kromatografik sistemde Kd değerleri birbirinden farklı olan maddeler farklı hızlarda ilerleyerek birbirlerinden ayrılırlar. [25]

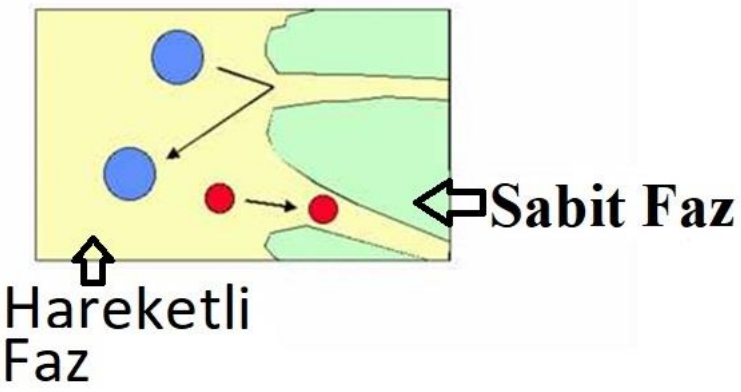


Şekil 2.7. Dağılma kromatografisinin temsili gösterilmesi

2.4.1.3. Boyutlandırma (Eleme) Kromatografisi

Bir numunedeki maddelerin molekül büyüklüklerine göre ayrılmasında kullanılan kromatografi tekniğidir (Şekil 2.8). Genellikle protein gibi moleküllerin

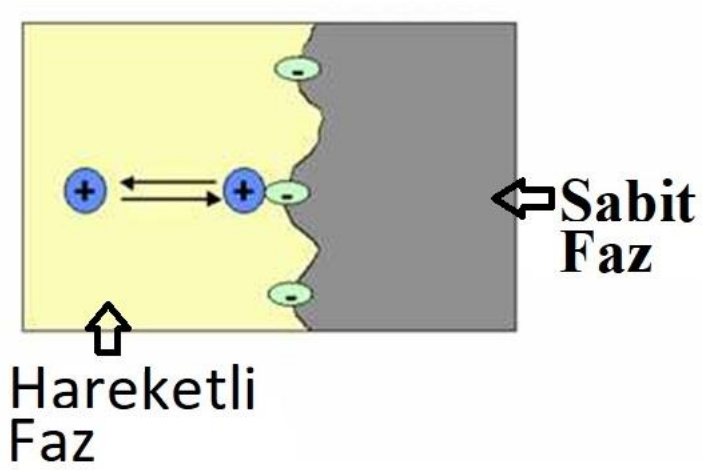
ayrılmasında kullanlır. Bu kromatografi tekniğinde farklı büyüklükte porlara sahip olan sabit faz (Jel:Sephadex, Biogel) üzerinden numune geçirildiğinde küçük moleküller porlarda tutulurken büyük moleküller kolonda tutunmadan hızlı olarak terk eder. Küçük moleküller büyüklere göre kolondan daha geç çıkarlar. Bu şekilde numunedeki moleküller büyüklüklerine göre birbirlerinden ayrılmış olurlar. [26]



Şekil 2.8. Boyutlandırma kromatografisinin temsili gösterilmesi

2.4.1.4. İyon Değiştirme Kromatografisi

Numune içerisinde bulunan iyonlar yani katyon veya anyonların bir iyon değiştirici jel vasıtasıyla birbirlerinden ayrılmasında kullanılan kromatografi tekniğine iyon değiştirme kromatografisi denir (Şekil 2.9). Katyonların ayrılmasında katyon değiştiriciler, anyonların ayrılmasında da anyon değiştirici jeller kullanılır. Katyon değiştirici sabit faz kullanılarak katyonların ayrılması tekniğine katyon değiştirme kromatografisi, anyon değiştirici sabit faz kullanılarak anyonların ayrılması tekniğine anyon değiştirme kromatografisi denir.



Şekil 2.9. İyon değiştirme kromatografisinin temsili gösterilmesi

2.4.1.5. Afinite Kromatografisi

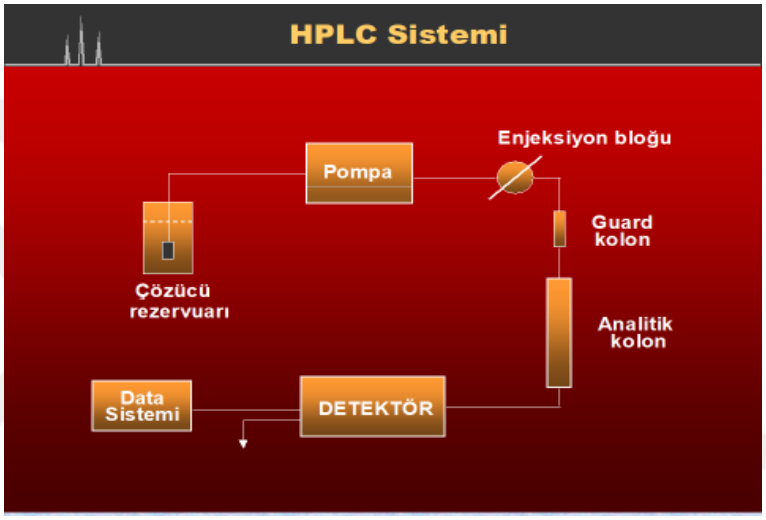
Afinite kromatografisi bir ayırma ve saflaştırma tekniğidir. Bu kromatografi tekniği bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, sabit faz ile maddelerin etkileşimi Antijen–Antikor ve Enzim–Ligand gibi spesifik etkileşimlere dayanarak ayrılma meydana gelir. Bu kromatografi tekniğinde saflaştırılması istenen maddeyi içeren numune kolondan geçirildiğinde istenen madde ligand (sabit faz) tarafından tutulur. İstenmeyen maddeler uygun bir tampon kullanılarak kolondan uzaklaştırılır. Sonra kolonda tutulan madde uygun bir elüsyon yoluyla kolondan uzaklaştırılır.

2.4.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), genel olarak bir numune ortamında bulunan maddelerin ayrılması, tanımlanması ve miktar tayinleri için kullanılan spesifik kromatografi tekniğidir. HPLC bir sıvı ortamında bulunan maddelerin, bir kolon içerisinde bulunan sabit faz üzerinden hareketli faz yardımıyla geçirilmesi esnasında maddelerin sabit faz ve hareketli fazla değişik etkileşimleri sonucunda kolon içerisinde değişik hızlarda hareket etmeleri ile kolonu farklı sürelerde terk etmeleri ve dedektörler vasıtasıyla tanınması esasına dayanan bir kromatografi tekniğidir. HPLC, genellikle ayırma mekanizması ve sabit faz tipine göre

sınıflandırılmaktadır. Yaygın kullanılma sebepleri, duyarlılığı, miktar tayinlerine kolaylıkla uyarlanabilmesi, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolay bozunabilen maddelerin ayrılmasına uygunluğudur. Diğer bir deyişle, HPLC uygun kolon, uygun çözücü ve uygun dedektör kullanıldığı sürece tüm organik, inorganik ve biyolojik numuneleri ayırmak ve tayin etmede kullanılabilir.

Bir HPLC sistemi, çözücü rezervuarı, pompa, enjeksiyon ünitesi, kolon, dedektör ve kaydedici kısımlarından oluşmaktadır (Şekil 2.10). [27,28]



Şekil 2.10. HPLC sistemi

2.4.2.1. Çözücü Rezervuarları

HPLC sisteminde kullanılan hareketli fazın yani çözücülerin bulunduğu kapları içeren kısımdır. Günümüz HPLC sistemlerinde bir veya daha çok (iki, üç veya dört) cam veya paslanmaz çelik kaplar bulunmaktadır. HPLC ayırım tipine göre çözücü seçimi yapılmaktadır. Kullanılacak çözücüler mutlaka çok saf olmalıdır ve çözünmüş gaz içermemelidirler. Bunun için çözücüler HPLC sisteminde kullanılmadan önce degaze edilmelidir. Hareketli faz tipleri; izokratik ve gradent elüsyon olarak ikiye ayrılmaktadır. İzokratik elüsyonda numunedeki maddeler tek yani sabit bileşimli bir çözücü ile ayrılmaları sağlanır. Tüm maddeler kolonda aynı anda, farklı hızlarda göç ederler. Gradiyent elüsyonda ise en iyi ayırımı elde etmek için polarlıkları birbirinden

farklı iki veya daha çok çözücünün bileşimi ayırım esnasında sürekli ve basamaklı olarak değiştirilir. [27-32]

2.4.2.2. Pompalar

Pompalar HPLC sisteminin en önemli kısımlarından biridir. Sistemde, numunenin hareketli faz ile birlikte enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli olarak sabit akışını sağlayan ünitesidir. Pompanın çözücülerle temas eden kısımları paslanmaz çelik ve teflon gibi inert malzemelerden yapılmış olmalıdır. Günümüzde küçük partikül çaplı kolonla kullanıldığından pompaların yüksek basınç sağlamaları gerekir. Bu basınç değerleri 6000-10000 psi arasında olmalıdır. Analitik amaçlar için 0-10 mL/dk, preparatif amaçlar için ise 100 mL/dk akış hızı sağlamalıdır. [27-30] HPLC sistemlerinde Emme Basma Piston Pompalar, Şırınga Tipi Pompalar ve Sabit Basınç Pompaları gibi pompalar kullanılmaktadır.

2.4.2.3. Numune Enjeksiyon Sistemi

Numunenin HPLC sistemine verilmesi numune enjeksiyon kısmından olmaktadır. Enjeksiyon ünitesinin basit olarak bir enjeksiyon valfi ve örnek haznesinden oluşmaktadır. Enjeksiyon üniteleri ikiye ayrılır;

1. Manuel Enjeksiyon: Belirli hacme sahip olan bir enjektör vasıtasıyla numunenin HPLC sistemine manuel olarak verildiği sistemlerdir.
2. Otomatik Enjeksiyon: Numune bir bilgisayar sisteminden verilen komutlar ile sistemin uygun bir şekilde numuneyi alıp sisteme gönderdiği ünitelerdir. Küçük miktarlardaki numune enjeksiyonları için kullanılır ve tekrarlanabilirlik oldukça yüksektir. [29,30]

2.4.2.4. Dedektörler

Dedektörler, kolondan çıkan maddelerden alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan cihazdır. Dedektörler kolon

sonrasında bulunurlar. HPLC sistemine kullanılan dedektörler, geniş derişim aralığında, yüksek duyarlılıkta, düşük gürültü seviyesinde, yüksek seçicilikte, yüksek rezolusyonda cevap verebilme özelliğine sahip olmalıdır. Dedektör seçimi örneğin kimyasal yapısına ve kullanılan yöntemin gereksinimlerine bağlıdır. HPLC'de UV, floresans, refraktif indeks, elektrokimyasal ve kütle dedektörleri kullanılmaktadır. [31,32]

1. UV Dedektörler: Belirli bir dalga boyunda ışın madde üzerine gönderildiğinde madde tarafından ışının absorplama esasına dayalı olarak maddenin absorbansının ölçülmesi amacıyla kullanılan dedektörlerdir. Bunlar sabit dalga boylu ve değişken dalga boylu olmak üzere iki çeşittir.[31]

1. **Sabit dalga boylu dedektörler:** Bu dedektörler basit olup genellikle UV kaynağı olarak civa lambası kullanılır ve dalga boyu seçiminde ise çeşitli interferanslı filtreler kullanılır. [31]
2. **Değişken dalga boylu dedektörler:**Maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda çalışma imkanı sağladığı gibi düşük dalga boylarında da çalışma imkanı sağladığından oldukça kullanışlı dedektörlerdir. 400-800 nm aralığında ışık gönderen tugsten lambaya ve 108-400 nm aralığında ise devamlı ışık gönderen döteryum lambaya sahiptir. [31]

2. Floresan Dedektörler: Bu dedektörde floresans, uyarıcı ışına 90 derecede yerleştirilmiş bir fotoelektrik dedektör yardımıyla gözlenmektedir. Floresans özellik gösteren veya floresans hale getirilebilen numunelerin ayrılması ve analizinde kullanılan dedektörlerdir. Floresans özelliğe sahip ilaçlar, doğal ürünler, klinik numuneler ve petrol ürünleri gibi maddelerin analizinde oldukça fazla tercih edilen yöntemlerdendir. [31]

3. Elektrokimyasal (ECD) Dedektörler: Okside veya redükte olabilen (elektro-aktif) analitlerin ölçümünde kullanılan detektörlerdir. Ölçüm elektrodunun yüzeyinde

meydana gelen redoks olayı, elektron akışına ve dolayısıyla elektriksel sinyale yol açar. Elektrod yüzeyinden salınan elektronlar, analit derişimiyle orantılı bir akım oluşturur. UV deteksiyondanen az 100 kat daha duyarlıdır.[31]

4. Refraktif İndeks (RI) Dedektörler: Madde üzerine görnderilen ışınların kırılması esasına göre ölçüm gerçekleştiren detektörlerdir. Sıcaklık, basınç gibi değişikliklerden çok etkilenirler. Ancak, noniyonik, UV absorbsiyon ve floresans olmayan bileşikler için uygun bir deteksiyon aracıdır.

5. Kütle (MS) Dedektörler: Örnek moleküller fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılarak kütle dedektörü ile tespit edilmektedirler. Molekülleri iyonizasyon işlemiyle uyarılarak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürülmektedir. Birinci kuadrupol filtrede m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılarak, yüksek saflıkta moleküller collision adı verilen özel bir gaz (Azot) ile parçalanmaktadır. İkinci kuadrupol filtrede parçalanma sonucu oluşan iyonların üzerinden teşhis ve miktar tayini yapılmaktadır.

2.4.2.5. Kolon

HPLC sisteminde sabit fazın içerisinde bulunduğu ve ayırımın sağlandığı kısımlardır. Kolonlar; iç çap, uzunluk, partikül boyutu dolgu materyaline göre çeşitlenebilmektedir. Genellikle paslanmaz çelikten üretilirler. Kolonların özelliği Tablo 2.5'de verilmiştir. [30-32]

Tablo 2.5. Kolonun özellikleri

	Kolonun özellikleri	**Kolonun dezavantajları ve avantajları**
Uzunluk:	Kısa kolonlara (1-3 cm) göre Uzun kolonların (10-25 cm)	• Ayrım etkinliği (√) artar. • Analiz süresi (X) artar.
İç çap:	Dar çaplı kolonlara (0.75-2.1 mm) göre Geniş çaplı (4.6 mm veya üzeri) kolonların	• Akış hızı artar. • Sensitivite azalır.
Partikül boyutu:	Büyük p. boyutlulara göre (5-20 mikron) Küçük (1.8-3.5 mikron) p. boyutlular	• Ayrım etkinliği artar. • Analiz süresi azalır. • Geri basınç artar.

Kolon dolgu materyalleri ; Polimer veya hibridlere kıyasla silika daha sağlam olup yüksek basınçlarda stabildir. Sabit sıvı fazlar kimyasal olarak silikaya tutturulmuşlardır. Silika yüzeyine bağlı C4, C8, C18 gibi farklı polaritede kolon dolgu materyalleri üretilmiştir. C zinciri ne kadar uzunsa kolon o kadar hidrofobik olmaktadır.[31]

Hareketli faz ve sabit fazın polarlığına göre kromatografi ikiye ayrılır. Bunlar:

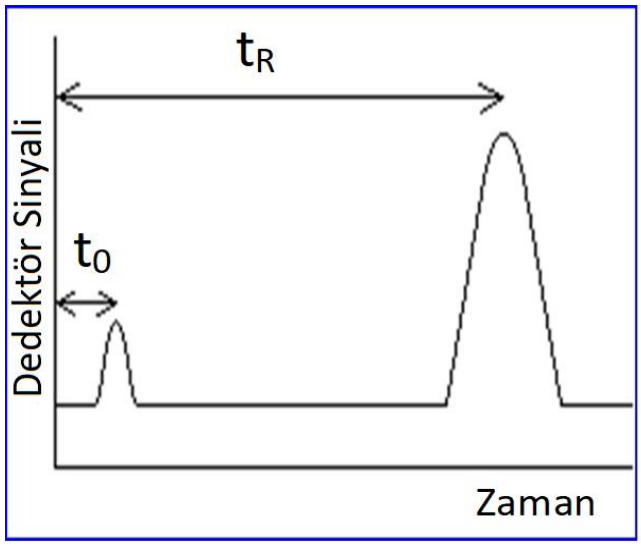
Ters Faz Kromatografisi: Hareketli Faz Polar, Sabit Faz Apolardır.

Normal Faz Kromatografisi: Hareketli Faz Apolar, Sabit Faz ise Polardır.

2.4.3. HPLC'de KullanılanTemel Parametreler

2.4.3.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Alıkonma zamanı (retansiyon zamanı), enjeksiyondan pikin tepe noktasına kadar geçen süredir (t_R). Bir kolona enjekte edilen her numunenin, sabit faz için numune bileşenlerinin afinitesi olmasa bile, kolon boyunca hareket etmesi sınırlı bir zaman alacaktır. Bu durumda, numunenin uygulanması ve kolondan elüsyonu arasındaki süre, yalnızca hareketli fazın kolondan aktığı hıza ve klonun boyutlarına bağlı olacaktır. Bu nedenle, elüsyon için geçen zaman, 'boş', 'kalıcı', 'ölü zaman' (t_o) olarak da adlandırılır (Şekil 2.11). [33]



Şekil 2.11. HPLC kromatogramı

Kapasite faktörü (k), maddelerin bağıl alıkonmasının ifadesidir. Kapasite faktörünün bulunabilmesi için hem maddelerin alıkonma zamanları hem de ölü zamanın [t_0-kolon ölü hacmi: hareketli fazın başlangıçtan sona kadar kolonda geçirdiği zaman)+kolon dışı ölü hacmin ölçüsüdür] bilinmesi gerekir.

$k = (t_R - t_o) / t_o$

K değerinin ayarlanması ;

- Hareketli fazın bileşimi
- Sabit fazın özelliği (ters faz, normal faz vb.)
- Kolon sıcaklığı

2.4.3.2. Seçicilik

Bir kromatografik sistemde, iki bileşeni ayırabilmek için her iki bileşenin de farklı alıkonma davranışı sergilemesi gerekir. Bu farklılık seçicilik olarak tanımlanır. Seçicilik faktörü (α) ardışık olarak elüe olan iki bileşene ait piklerin alıkonma faktörlerinin oranıdır. [34,35]

2.4.3.3. Kolon Etkinliği

Kolonun dar pik oluşturma yeteneğidir. Pik genişliğinin ölçüsüdür (Dar pik , geniş pik). N (Nth) kolon çapları ve ekstra kolon ölü hacminden etkilenir. İdeal olarak pikler simetrik veya Gaussian olmalıdır. Pik asimetrisine bağlı olarak rezolüsyonbozulabilir. N değeri mekanik bir faktör olarak düşünülebilir (boyut, çap gibi). K ve α değerleri ile kimyasal faktörler gibidir (hareketli faz ve kolon kimyası). N değeri, daha uzun kolon seçilerek (analiz süresi uzar) ve daha küçük partikül boyutuna geçilerek (daha yüksek basınç) geliştirilebilir. [34,35]

2.4.3.4. Kolonun Ayırma Gücü

Bileşikleri kolondan ayırmak için ; rezolüsyon, hareketli faz ile kolonun kimyasal yapısı, hareketli faz gradientleri, kolon çapları, sıcaklık, akış hızı, enjeksiyon

hacmi ile pik genişliği ve çıkış sürelerinin ayarlanması ile sağlanır. Bunun için üç parametre dikkate alınır.Bunlar ;

a. k: Kapasite faktörü
b. α: Seçicilik faktörü
c. N: Etkinlik faktörü'dür.

2.5. Spektroskopik Yöntemler

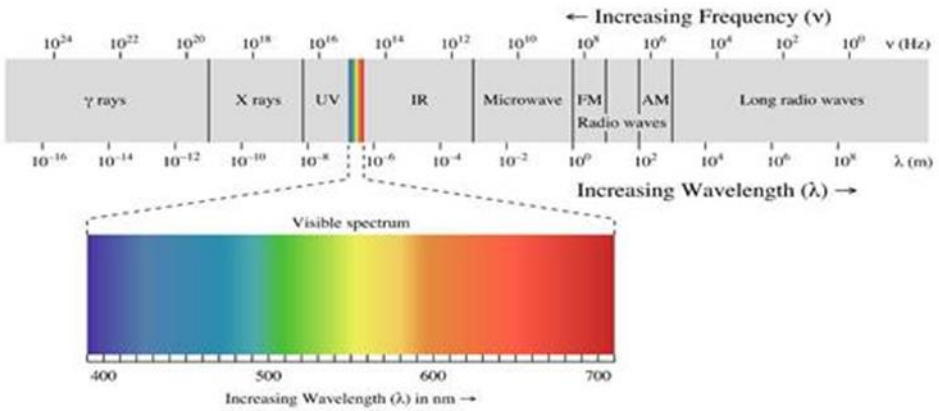
Spektroskopi, örnek içinde bulunan molekül, atom veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişlerinde hesaplanan, absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımanın ölçülmesi esasına dayanır. Günümüzde spektroskopi, elektromanyetik ışınların madde ile etkileşimini inceleyen bir bilim dalıdır. Ancak önceleri görünür ışının çeşitli dalga boylarına ayrılarak spektrumlarının elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Çünkü önceden sadece elektromanyetik ışımanın madde ile etkileşimini incelerken, bugün spektroskopinin tanımı madde ve diğer enerji türleri arasındaki etkileşimleri olarak genişletilmiştir. Uzayda çok büyük hızla hareket eden parçacık ve dalga yapısında bulunan aynı zamanda birçok yapıya girebilen enerji şekline elektromanyetik ışıma adı verilir. Elektromanyetik ışının madde (moleküller veya atom) tarafından yayılma (emisyon) veya soğurma (absorpsiyon) spektroskopileri olarak incelenmektedir. Moleküller tarafından ışının soğurulması; moleküldeki atomların türüne, büyüklüğüne, moleküllerin şekillerine ve düzenlenmesine göre sınıflandırılmaktadır. [36]

Organik ve inorganik bileşiklerin kantitatif, kalitatif analizlerinde, molekül yapılarının ve asit baz denge sabitlerinin aydınlatılmasında spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır. Spektroskopik yöntemler, maddelerin yapıları ve stereokimyasal özelliklerinin tanımlanması, bulunması ve saflık kontrolü gibi birçok uygulama alanına sahiptir. Spektroskopik çalışmalarda, dalga boyu 110 nm'den 30000 nm'ye kadar farklılık gösteren ışınlar gönderilmektedir. Tüm bu dalga boyları ve hangi dalga

boylarının absorplanacağı konusunda tespitini tek bir cihazda yapmak mümkün olmamaktadır. Bu kapsamda belirli dalga boyları arasında çalışan cihazlar üretilmiştir;

1. Ultraviyole-Görünür Bölge Absorpsiyon (UV-Visible) Spektroskopi: 110-1000 nm dalga boylarındaki ışınlarla çalışan cihazlardır.
2. Infrared (IR titreşim) Spektroskopi: 2500-30000 nm dalga boylarında çalışan cihazlardır.
3. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopi: Dalga boyları yüzlerce metreye kadar değişen radyo dalgalarıyla çalışan cihazlardır.

Analitik amaçlar için önemli spektral bölgelerin dalga boyu ve dalga sayısı aralıklarını gösteren diyagram Şekil 2.12'de verilmiştir. [37]



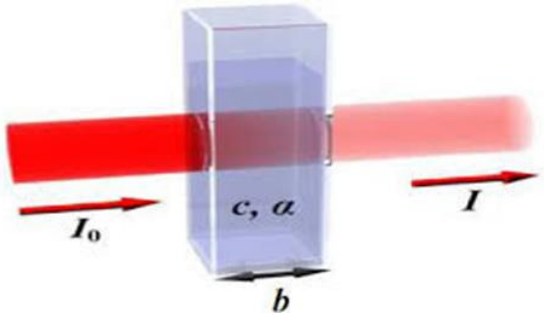
Şekil 2.12. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması [37]

2.5.1. Işının Absorplanması

Işının sıvı, katı veya gaz tabakasından geçmesiyle bazı dalga boyundaki ışınlar kaybolur. Bu süreçteki ışın enerjisinin numuneyi oluşturan atom, molekül veya iyonlarına aktarılmasına ışının absorplanması denir. Absorpsiyonla ışın enerjisi, temel halden bir veya daha fazla sayıdaki yüksek enerjili uyarılmış hallere geçerler. Kuantum teorisine göre; atom, molekül veya iyonlar sadece belirli seviyedeki enerji düzeyinde bulunurken, ışının absorplanabilmesi için uyarıcı foton enerjisinin, absorpsiyon yapan

türlerin uyarılmış halleri ile temel halleri arasındaki enerji farkına eşit olması gerekmektedir. Her tür için bu enerji farkları özgün olduğundan, numuneyi oluşturacak maddenin bileşenlerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, madde ortamına giren ışın şiddeti ve madde ortamını terk eden ışın şiddeti farklarının Lambert-Beer eşitliği ileTransmittans ve Absorbans değerleri elde edilir (Şekil 2.13). A=Absorbans=log I_0 / I = ε.b.c

Burada ; I_0 ışının çözeltiye girmeden önceki şiddeti, I çözeltiden çıktıktan sonraki şiddeti, ε molar absorpsiyon katsayısı veya molar absorptivite (L/mol.cm), b örnek kabının genişliği ve c derişim (mol/L)'dir. Analitik uygulamalar için absorbans ve derişim arasındaki doğrusal ilişki uygulanmaktadır.[38]



Şekil 2.13. Bir ışının b genişliğindeki bir küvet içinden geçerken lambert- beer soğrulmasının gösterimi

2.5.1.1. Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi

Bohr, Planck ve Einstein atom üzerinde yaptıkları çalışmalarda, elektromanyetik dalgayı belirli bir enerjiye sahip parçacıkların akıntısı olarak tanımlamaktadır. Atomik absorbsiyon yalnızca atom elektronların bir enerji düzeyinden diğerine geçişlerinde yer almaktadır. Madde elektromanyetik dalga ile etkileşime girdiğinde bir enerji seviyesinden diğerine geçişlerinde foton salmakta veya soğurmaktadır. Rezonans frekansı, bu iki enerji seviyesi arasındaki geçişleri sağlayan frekanslara denir. Bu geçişler arasında yayılan veya soğurulan ışımanın enerjisi, atomun potansiyel enerjisindeki değişim ile orantılıdır ve $\Delta E = h\nu$ olarak gösterilmektedir. [39]

Atomların en dış tabaka elektronları UV-görünür bölge ışınlarla uyarılmasında atomik absorpsiyon, en iç tabaka elektronlarının X-ışınlarıyla uyarılmasında X-ışınları spektroskopisi kullanılmaktadır . [38,40]

2.5.1.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

Moleküler spektroskopi, elektronik düzeyler arasındaki geçişlere ek olarak ışın ile oluşturulabilen titreşim ve dönme geçişleri içermektedirler. İnfrared, görünür ve UV ışınlarıyla uyarıldıklarında 3 tip geçiş görülmektedir. Bu geçişler gerçekleşirken molekülün toplam enerjisi ; "Etoplam = $E_{elektronik}$ + $E_{titreşim}$ + $E_{dönme}$" Şeklindedir. Burada; $E_{elektronik}$:molekülde bağ yapan elektronlara ait enerji düzeyinden kaynaklanan elektronik enerji, $E_{titreşim}$:moleküllerdeki atomlar arası bağ titreşimlerinin toplam enerjisi ve $E_{dönme}$,:molekül içindeki dönme hallerinden oluşan enerjidir.

Moleküler spektrumlar atom spektrumlarına göre çok daha karmaşıktır. Madde, üzerine gelen elektromanyetik enerjiyi yayımlarken veya soğururken atomlar birbirinden uzaklaşır, yakınlaşır veya atomların arasındaki açıları değiştirmektedir. Moleküllerdeki atomların, bağların ve açıların farklı olması hepsinin titreşim enerjisinin de farklı olmasına neden olmaktadır. Moleküllerin dış orbitallerindeki elektronlarıyla ilişkili enerjiye elektronik geçiş enerjisi adı verilir. Dönme enerjisi molekül ağırlık merkezi etrafında dönmesiyle ilişkili enerji, titreşim enerjisi ise atomlar arası titreşimlere ilişkin enerjidir. [41]

2.5.2. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar

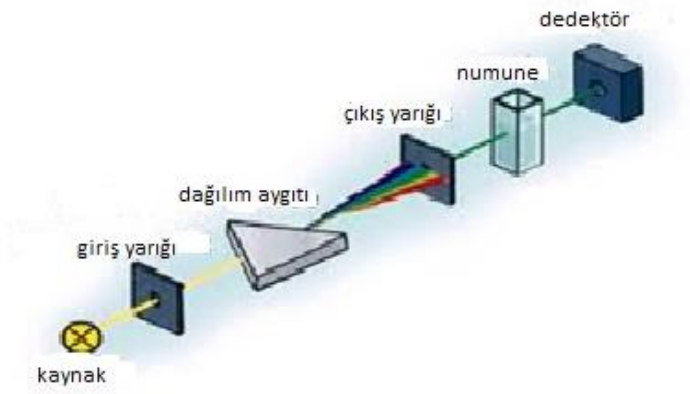
Lambert-Beer kanunu, yüklü taneciklerin birbirlerinin yük dağılımını değiştirmeleri veya etkilemeleriyle sadece çok seyreltik çözeltilere uygulanabilen konundur. Yük dağılımının değişmesiyle absorbansta büyük değişimler gözlenir. Şayet ortamda yüklü tanecikler fazla olursa sapmalar da büyük olmaktadır. [38,41]

- **Gerçek Sapmalar:** Monokromatik ışın için geçerli olmaktadır. Mutlaka örnek homojen olmalıdır. Birden fazla aynı dalga boyunda absorpsiyon yapan aynı türlerin birbirlerinin absorpsiyonunu etkilememelidir.
- **Cihazdan İleri Gelen Sapmalar:** Monokromatik ışın için Lambert-Beer eşitliği geçerlidir. Işığın saçılması veya dedektöre kaçak ışık gelmesi sonucunda ışık şiddetinde azalma olması sapmaları meydana getirmektedir.
- **Çözelti Etkileşmelerinden Gelen Sapmalar:** Örnek homojen değilse ve bazı bölgelerde koagüle olmuş parçalar yer alıyorsa, doğru bir absorbans ölçülmesi beklenemez. Aynı zamanda bu parçalar ışığın saçılmasına neden olmaktadır. Moleküllerin disosyasyonu (ayrışma) veya assosyasyonu (birleşme) da absorbans değerinin yanlış okunmasına neden olarak okumada sapmalara neden olmaktadır.

2.5.3. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometreleri

Bir çözeltinin içindeki madde miktarını çözeltinin tuttuğu veya çözeltiden geçen ışık miktarından yararlanarak ölçülmesine fotometri denir. Bu ölçümleri yapmak için kullanılan cihazlara fotometre adı verilmektedir. Fotometrik ölçümlerle aynı zamanda renksiz çözeltilerin derişimleri de ölçülmektedir. Fotometre veya kolorimetre adı verilen cihazlar analiz edilecek örneğin üzerine ışık demetlerinin bir kısmını filtreler kullanarak ayırıp gönderen cihazlardır. Spektrofotometre ise bu işlemi yarıklar veya prizmalar aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Spektrofotometrelerde derişimi bilinmeyen çözeltinin absorbladığı ışık miktarı ile derişimi bilinen standart bir çözeltinin absorpladığı ışık miktarının (optik dansite, absorbans) karşılaştırılmasıyla yapılmaktadır. Absorpsiyon spektrofotometresi veya absorpsiyon spektrometresi, maddenin ışığı absorblamasını incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Spektrofotometre temel olarak; ışık kaynağı,

monokromatör (dalga boyu seçicisi) ve dedektörden oluşmaktadır (Şekil 2.14). Dedektöre gelen sinyal, optik sinyal kaydedici veya galvanometre ile ölçülmektedir. [42]



Şekil 2.14. Spektrofotometrenin temel bileşenleri. [42]

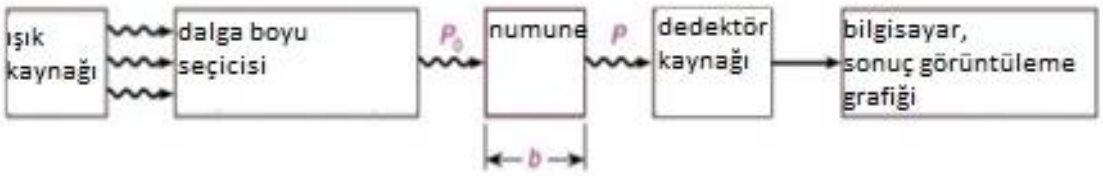
Bu cihazların çalışma prensibi; Lambert-Beer kanununa göre moleküller tarafından monokromatik ışınların absorplanması esasına dayanmaktadır. Bu temel bileşenlere ek olarak spektrofotometrelerde ışığı yansıtmak, iki demete bölmek, toplamak, odaklamak ve örneğin üzerine belirli bir şiddetle göndermek amcıyla aynalar, mercekler, giriş çıkış aralıkları ve ışık bölücüler bulunmaktadır. Örnek, ışını geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına koyularak ışık yoluna yerleştirilmektedir.[42]

UV-görünür bölge spektroskopisi çok sayıda inorganik ve organik bileşenlerin analizi amacıyla kullanılmaktadır. Bu cihazlar 200-900 nm arasında çalışmaktadır. organik ve inorganik bileşiğin analizinde kullanılmaktadır. Bazı moleküller 160-200 nm'de absorpsiyon yaptıkları için 200 nm altındaki moleküller için vakumlu UV cihazları kullanılmaktadır. Bu cihazlarda elektromanyetik ışık kaynağı olarak 160-400 nm aralıklarında ışın üretmek için döteryum lambası, 350-2500 nm için tungsten lambası kullanılmaktadır. UV-görünür bölgede kullanılan spektrofotometreler ise;

- Tek ışınlı spektrofotometreler,
- Çift ışınlı spektrofotometreler, olarak ikiye ayrılmaktadır. [37]

2.5.3.1. Tek Işınlı Spektrofotometreler

En basit tanımla spektrofotometre kaynaktan çıkan ışığın bir mercek ile toplanarak monokromatöre gönderildikten sonra seçilen dalga boyu aralığından geçirilerek örnek üzerine düşürülmektedir. Işığın absorplama miktarı dedektörle ölçüldükten sonra bu sinyal elektronik olarak çoğaltılarak bir galvanometre ile okunmaktadır. Bu basamakların hepsinin aynı ışık yoluna yerleştirildiği spektrofotometreler tek ışın yollu spektrofotometreler olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.15). Bu cihazlar tek bir ışın demeti kullanır ve sıfır ayarı ile ölçüm işlemleri ayrı ayrı yapılmaktadır. Kantitatif analizler için uygun oldukları gibi oldukça basit ve ucuz cihazlardır. [43]

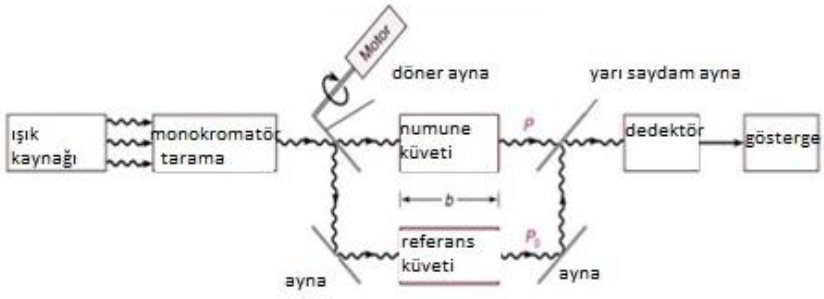


Şekil 2.15. Tek ışınlı spektrofotometrenin şematik yapısı

2.5.3.2. Çift Işınlı Spektrofotometreler

Her dalga boyunda özellikle ‘’yüz’’ ve ‘sıfır’ ayarlarının yapılması çok zaman alıcı bir işlemdir. Spektrofotometrelerde, monokromatörden çıkan ışığın iki demete bölünerek eşit şiddette birinin sadece çözücünün bulunduğu kaba, diğerinin ise örneğe gönderilmesi ile bu işleme gerek olmamaktadır. Böylece aynı anda örnek ile çözücünün geçirgenlik değeri karşılaştırılmış olmaktadır. Işığın ikiye ayrılmasıyla, iki ayrı dedektörle algılanıp oluşan sinyallerin oranı ölçülmektedir. Bu tür cihazlara çift ışın yollu spektrofotometre adı verilmektedir (Şekil 2.16). Burada dedektörün eşit şiddetteki ışık ile aynı sinyali oluşturması oldukça önemlidir. Bu cihazlar tek ışın yollu cihazlara göre hem elektronik hem de optik yönden oldukça karmaşıktır. En önemli avantajı

voltaj değişikliklerinden etkilenmemesi ve zaman kazandırmalarıdır. Tek ışın yollu spektrofotometrelere göre daha az hassasiyete sahiptir. [43]



Şekil 2.16. Çift ışınlı spektrofotometrenin şematik yapısı

2.5.4. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometrenin Kullanım Amaçları

- Molekül Yapısını Aydınlatma
- Kalitatif Analiz
- Kantitatif Analiz

2.5.4.1. Kalitatif Analiz ve Molekül Yapısını Aydınlatma

UV spektrumu, bilinmeyen bir madde saflaştırıldıktan sonra alınmaktadır. Bu spektrum, daha önce yapılmış analizlerdeki spektrumlarla karşılaştırılır. Bilinmeyen madde, daha önceki spektrumlardan hangisiyle uyumluysa o madde bilinmeyen madde olarak tanımlanmaktadır. Bilinmeyen madde, analizi yapan kişi tarafından bilinmeyen maddedir. Diğer maddelerin ne olduğu biliniyor ancak saflığı hakkında bilgi edinilmek isteniyorsa maddenin spektrumu alınmaktadır. Şayet spektrumda beklenmedik pikler görülüyorsa maddenin saf olmadığı söylenebilmektedir. Aynı zamanda, UV ışınlarla yapılan spektrofotometrik ölçümlerle benzer kromofor gruplarının da belirlenmesinde rol oynamaktadır. Organik moleküllerden çok karmaşık yapılı olanlar, 180 nm'den daha uzun dalga boylarına karşı çok daha fazla geçirgen olmaktadırlar. Doymamış gruplarda 200-400 nm aralığında birden fazla pik görünüyorsa halojen veya kükürt gibi atomların

var olduğunu göstermektedir. Eğer çok sayıda yapısı bilinen ve kromofor grup içeren başka bir molekülün spektrumu ile analitin spektrumu karşılaştırılırsa, analitin fonksiyonel grupları hakkında da bilgi edinmek mümkündür. Ancak genel kurallar doğrultusunda, analitin kesin yapısını öğrenmek için UV spektrumları yeterli olmamaktadır. Bu yüzden UV spektrumlarından elde edilen bilgilerle MS, NMR gibi diğer kimyasal ve fiziksel verilerle, mümkün olduğu kadar kaynama ve erime noktası ile çözünürlük verileriyle desteklenmektedir. Kalitatif analizlerde analitin seyreltik çözeltileri kullanılmaktadır. Şayet madde gaz haline dönüştürülebiliyorsa gaz halindeki spektrumları alınarak daha ayrıntılı ve daha yararlı spektrumlar elde edilmektedir. UV-Görünür bölge spektroskopisinde, ilk olarak çözücü numuneyi çözmeli ve çözücü ile absorpsiyon yapan tür arasında bir etkileşim olmamalıdır. Eğer varsa mutlaka dikkate alınmalıdır. Örneğin ; alkol, ester, su ve keton gibi polar çözücüler, spektrumdaki titreşim ayrıntılarını örtebilmektedir. Polar çözücüler, hem spektrumun titreşimlerinden kaynaklanan küçük piklerin kaybolmasına hem de piklerin esas yerlerinden kaymasına neden olmaktadırlar. [38]

2.5.4.2. Kantitatif Analiz

Kantitatif analizde, ilk olarak analizi yapılacak maddenin en iyi absorbans yaptığı dalga boyu belirlenmektedir. Artan derişimlerde hazırlanan seri çözeltinin belirlenen dalga boylarında ölçümleri alınıp absorbansları okunmaktadır. Daha sonra derişime karşı oluşturulan absorbans grafiği ile kalibrasyon eğrisi elde edilmektedir. Bu kalibrasyon eğrisinin yardımıyla bilinmeyen maddenin derişimi elde edilmektedir. Kimyacıların kantitatif analizde en çok kullandıkları teknik UV-Görünür bölge absorpsiyon spektrofotometrisidir. [38]

2.5.5. Türev Spektrofotometrisi Yöntemi

1920'lerde ilk defa Rutherford tarafından kütle spektrumlarının yorumlanması amacıyla kullanılmıştır. 1950'lerde genel kullanıma başlanarak bu yöntem kullanılmıştır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan mikro işlemler, bu yöntemin kolaylıkla uygulanmasını sağlamış ve spektrofotometreler bu şekilde geliştirilmiştir. Son yıllarda bu yöntemle ilgili birçok ilaç analizine rastlanmaktadır. Türev absorbsiyon spektrofotometri; türev spektrumlarının kullanılması esasına dayanmaktadır. Matematiksel işlemler ile türev eğrileri hazırlanmaktadır. Bir spektrumun her bir noktasındaki türevin hesaplanması ve sonuçlar doğrultusunda grafikler oluşturulup türev eğrilerinin hazırlanması kolay olmamaktadır. Bilgisayar yardımı ile hesaplamalar yapılmaktadır. UV-Görünür bölge spektroskopisinden daha fazla uygulama alanına sahiptir. Çünkü UV-Görünür bölge spektroskopisi üst üste binen çakışan bantlar daha fazla görülmektedir ve ayrım gücü oldukça zayıftır. Ayrıca sinyal /gürültü (S/G) oranı da oldukça düşüktür. Türev uygulamalarıyla, bu tür sorunlar çözülmüş, çözümlenmemiş bantlar içeren spektrumların ayrım gücü artmış ve karakteristik pikleri az veriler elde edilmiştir. Türev tekniği, orijinal spektrumların eğimleri hakkında bilgi verirken, bunların omuz ve dönüm noktalarının da daha belirgin hale gelmesini sağlamaktadır. Bu sayede bileşikler daha kesin ve daha kolay tanımlanabilmektedir. Eğer orijinal spektrumlarda üst üste çakışan bantlar varsa, bunların belirli oranlarda birbirlerinden ayrılması sağlanmaktadır. Böylelikle karışımların analizleri de yapılmaktadır. UV-Görünür Bölge spektroskopisinde bulanık çözeltilerle çalışıldığında tanecik büyüklüğü ve çökme hızı etkenlere bağlı nedenlerle büyük hatalar görülürken, türev yöntemiyle bu sorun ortadan kalkmaktadır. Bu yöntemin dezavantajı ; dönüm noktası kayması, pik şekillerinin ve yüksek türev derecelerinde S/G oranın bozulmasıdır. Bu yüzden mutlaka uygulanacak türevin derecesi iyi şekilde belirlenmelidir**.** [36]

2.6. Validasyon (Yöntem Geçerlilik Testleri)

Validasyon daha önceden geçerli kılınmamış bir yöntemin laboratuvarda rutin kullanıma alınmadan önce ulusal/uluslararası kurallara göre tanımlanan şartların sağlanıp sağlanmadığının teyit edilmesi ve bu amaçla performans parametrelerinin araştırılmasıdır. Validasyon parametreleri aşağıda verilmiştir. [45,46]

2.6.1. Doğrusallık

Ölçüm aralığı; kalibrasyon eğrisinde ölçülen analitin miktarı (derişimi) ve dedektör yanıtının (response) doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır. Ölçüm aralığı yöntemin uygulama aralığını belirler. Çoğu yöntemde bu aralık belirtilir. Tüm validasyon çalışmaları bu aralık belirlendikten sonra planlanır. Ölçüm aralığı doğrusallık parametresi ile ilişkilidir. Örnekteki analitin en alt ve en üst derişimlerinin arasındaki alanın lineer olması gerekir. [45,46]

2.6.2. Seçicilik (Belirleyicilik)

Bir yöntemin örnek matriksi içerisinde sadece ölçümü amaçlanan maddeyi ölçme yeteneğidir. Seçicilik parametresi ile örnekte interferansa (girişim) neden olduğu düşünülen maddelerin sonucu etkilememesi istenir. Kör numune ve değişik numunelere aranan analit eklenerek girişim oluşturup oluşturmadığı incelenir. Farklı bir yöntemle karşılıklı çalışılarak belirlenebilir. [45,46]

2.6.3. Doğruluk/Kesinlik

Doğruluk, bir analiz sonucunun gerçek veya gerçek olduğu kabul edilen değere ne kadar yaklaştığının ölçütüdür. Doğruluk bağıl hata ve geri kazanım değerleri ile verilmektedir. Kesinlik tekrarlanan analiz sonuçlarının birbirinne yakınlığı olarak iafade edilmektedir. Kesinlik ise standart sapma, bağıl satnadart sapma, varyans ve varyans katsayısı ile verilmektedir. Gerçeklik; bir ölçüm yönteminin gerçek sonucu verebilme kabiliyetidir. [44] Doğruluk ve kesinlik değerleri güniçi (aynı gün içerisinde

tekrarlayan analiz) ve günler arası (aynı numunenin farklı günlerde tekrarlayan analizi) analiz sonuçaları halinde verilmektedir. [45,46]

2.6.4. Duyarlılık

Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür. [45,46]

2.6.5. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)

Saklanan örneklerin analiz süresince bozulmadan sabit kaldığından emin olmak için yapılan testlere kararlılık (stabilite) denilmektedir. Etken maddeyi içeren kan örneklerinin normal laboratuvar koşullarında nem, sıcaklık, hava ve örneklerin dondurulup-eritilmesi (-20°C bekletilmesi) gibi etkilere maruz kaldığında etken maddenin bozulmadan sabit kaldığı süre tespit edilmeli ve aynı zamanda elde edilen bilgilerin literatür bilgileri ile de desteklenmesi gerekmektedir.[44-46]

2.6.6. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

LOD, örnekte ölçülebilen fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük miktardır. LOQ, kabul edilebilir doğrulukta (kesinlik ve gerçeklik) ölçülebilen en düşük miktardır. LOD-LOQ üç şekilde hesaplanabilmektedir.[44]

1. Ölçülen örneklerin sonuçlarının standart sapmaları üzerinden

- LOD=SDx3
- LOQ=SDx10

2. Yöntemin standart sapması üzerinden (kalibrasyon eğrisi sonuçları üzerinden)
3. Gürültü üzerinden

- En düşük derişimdeki spike örneğinin “Sinyal / Gürültü (S/N)” oranı bulunur. LOD = (S/N) x 3, LOD = (S/N) x 10

2.6.7. Geri Kazanım/Analitik Geri Kazanım

Analiz sonucunda elde edilen değerin gerçek değer oranının yüzdesi yüzde geri kazanım değeri olarak verilir. Analitik Eklenen miktar bilindiğinden bulunan miktarla yüzdesel bir orantı yapılır. [44]

% Geri Kazanım= (Ort. Ölçülen Sonuç/Gerçek Değer)X 100

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan etofenamate standart maddesi Santa Farma ilaç ve A.Ş'den temin edildi. Etofenamate içeren %5 Efamat Jel ticari farmasötik preparat serbest eczanelerden temin edildi. Metanol (HPLC Grade %99,8) Sigma Aldrich, deiyonize su (Millipure), çalışma sırasında kullanılan otomatik pipetler (10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL ve 1000-5000 µL), ve spektrofotometrede kuartz küveti (USA) Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarından temin edildi.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Etüv (Membert Typ UM 500), Ultrasonik banyo (Bondelin Sonorex RK 255H), Hassas terazi (Scoltec SBA 31), Vorteks (Isolab Vorteks Mixer VM-20), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Sistemi (Agilent Technologies 1200 Series), UV Spektrofotometresi (Thermo Scientific Multiskan GO) ve Bilgisayar.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Yöntem Şartları

HPLC analizleri için intermal standart olarak (IS) cilostazol seçildi. Toz halindeki cilostazolden 3.12 mg tartılıp metanolde çözülüp 1500 µg/mL derişiminde stok çözelti hazırlanarak bu stok çözeltiden 50 µg/mL derişiminde iç standart çözeltisi hazırlandı. HPLC çalışmasında, etofenamate etkin maddesi için uygulanan kromatografik yöntem şartları Tablo 3.1.'de verildi.

Tablo 3.1. HPLC yöntem şartları

Yöntem Şartları	Etofenamate
Kolon	C18 (250x4.6 mm, 5µm)
Dedektör	UV
Dalga Boyu	286 nm
Hareketli Faz	Metanol: Asetonitril: Deiyonize Su (40:35:25, h/h/h)
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Kolon Akış Hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	10 µL

3.2.2. Jel Çözeltisinin Hazırlanması

Etofenamate içeren jel formundaki ticari farmasötik preparattan (%5 Efamat Jel) 380 mg tartıldı. Önce 50 mL metanolde çözüldükten sonra hacmi 100 mL tamamlandı.

3.2.3. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yöntem Şartları

Etofenamate etkin maddesi için uygulanan spektroskopi yöntem şartları Tablo 3.2'de verildi.

Tablo 3.2. UV-görünür bölge absorpsiyon spektroskopi yöntem şartları

Yöntem Şartları	**Etofenamate**
Küvet	Kuartz 96 well plate
Dedektör	UV
Start Lamba	200 nm
Stop Lamba	400 nm
Tarama Hızı	800 nm/dk
Monokromatörün Slit Aralığı	2

4. BULGULAR

4.1. HPLC Yöntemi

4.1.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

Etofenamate etkin maddesi jel halinde alınıp hasas terazide 0.1 g tartılıp 100 mL balon joje içerisinde metanol de çözündükten sonra ultrasonik banyoda 2 defa yarım saatlik süre ile bekletildi. Bu şekilde 1 mg/mL'lik stok çözeltisi elde edildi. Bu stok çözeltiden uygun miktarda alınıp metanol ile seyreltilerek 1, 5, 7.5, 10, 20, 35 ve 40 µg/mL derişimlerde standart çalışma çözeltileri hazırlandı..Hazırlanan çözeltiler analiz süresi boyunca +4 °C'de saklandı.

4.1.2. HPLC Yöntem Geliştirme

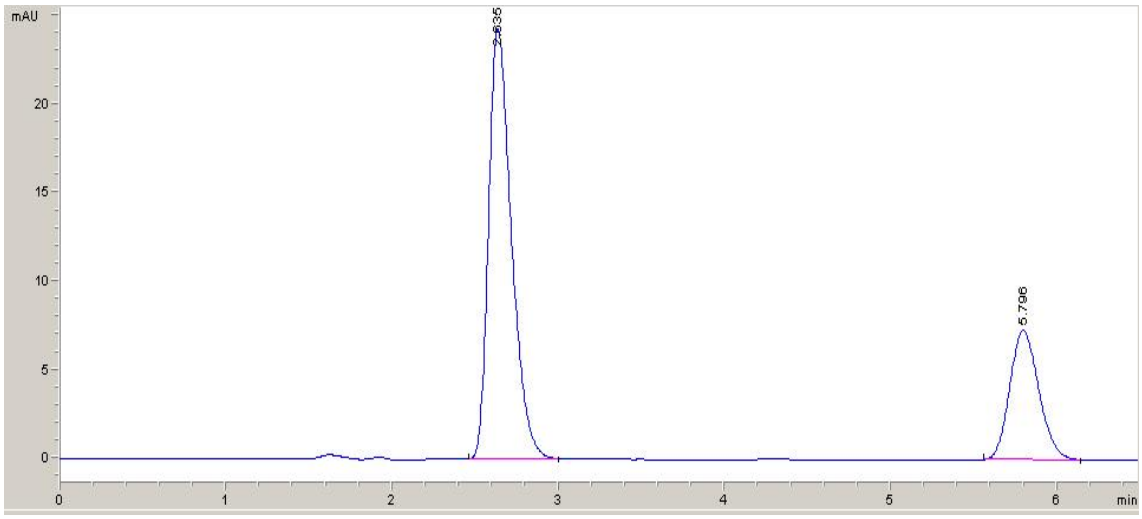
Kromatografik sistemde çözünen hareketli faz bileşenleri ve durgun faz arasındaki bütün etkileşimler kromatografik sistemin seçiçiliğini yansıtır.Bu etkileşimler sıcaklık, hareketli fazın yapısı gibi deneysel koşulların değiştirilmesiyle yönetilebilir. Bu çalışmada farklı hareketli fazlar denendi ve en iyi ayrımın metanol/asetonitril/su (40:35:25 ,h/h/h) olarak belirlendi ve çalışmanın devamında bu hareketli faz kullanıldı.

4.1.3. HPLC Yöntem Validasyonu (Geçerlilik Testleri)

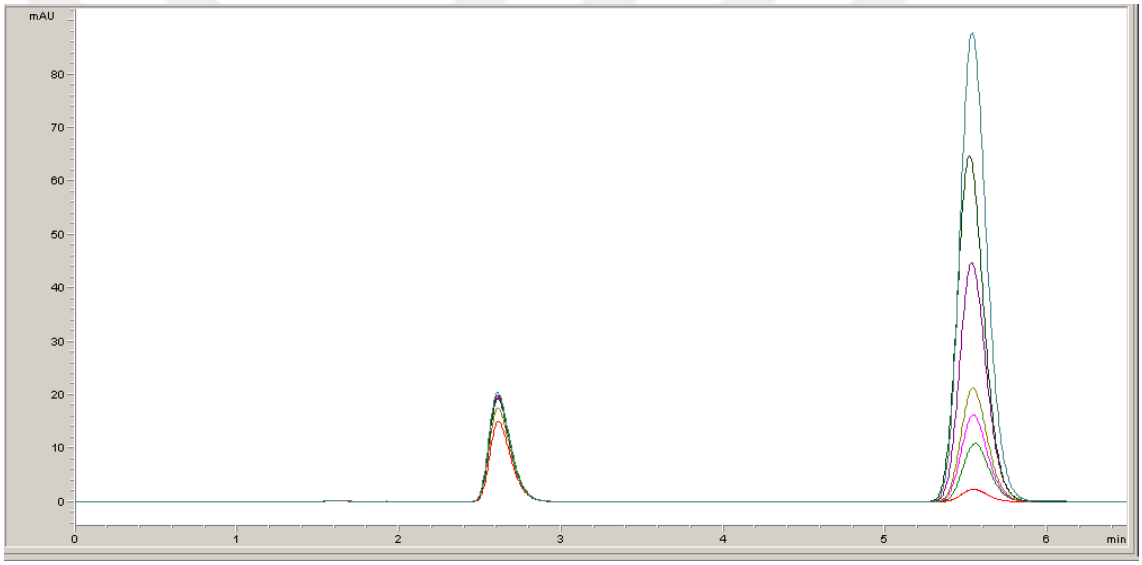
Yöntemin farklı koşullarda uygulanabilirliğini gösterebilmek amacıyla analitik yöntem validasyonu (geçerlilik testleri) yapıldı.

4.1.3.1. Seçicilik (Belirleyicilik)

Standart çözeltiler ile elde edilen kromatogramların incelenmesinde etofenamate ve cilostazolden (IS) alıkonma zamanları sırasıyla 2,63 ve 5,79 dakika olarak belirlendi. Etofenamateye ait kromatogram Şekil 4.1'de verildi. Etofenamate etkin maddesinin IS sabit tutularak derişimine bağlı olarak alınan kromatogram Şekil 4.2' de verildi .



Şekil 4.1. 5 µg/mL derişiminde standart etofenamate çözeltisinin HPLC kromatogramı

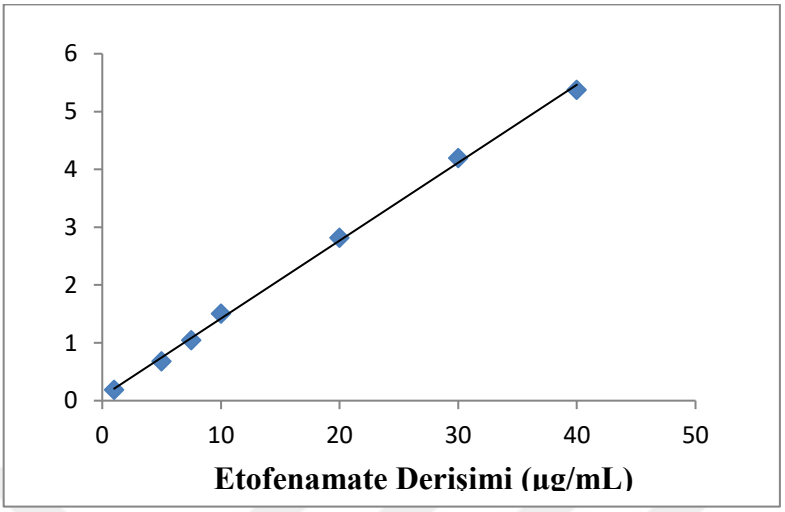


Şekil 4.2. Artan derişime bağlı etofenamate standart çalışma çözeltilerinin HPLC kromatogramı (1,5,7.5,10,20,35 ve 40 µg/mL)

4.1.3.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

1, 5, 7.5, 10, 20, 35 ve 40 µg/mL derişimlerindeki etofenamate çözeltilerinin ve 1500 µg/mL derişiminde internal standart olarak kullanılan cilostazolden (IS) kromatogramları alınarak pik alanları tespit edildi. Daha sonra etofenamate çözelti derişimlerine karşı etofenamate pik alanının cilostazolden pik alanına oranları (etofenamate pik alanı/IS pik alanı) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi (n=6). Etofenamate etkin maddesine ait ortalama kalibrasyon eğrisi Şekil 4.3'de

verildi.Elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz değerleri ise Tablo 4.1'de verildi.



Şekil 4.3. HPLC yönteminin ortalama kalibrasyon eğrisi

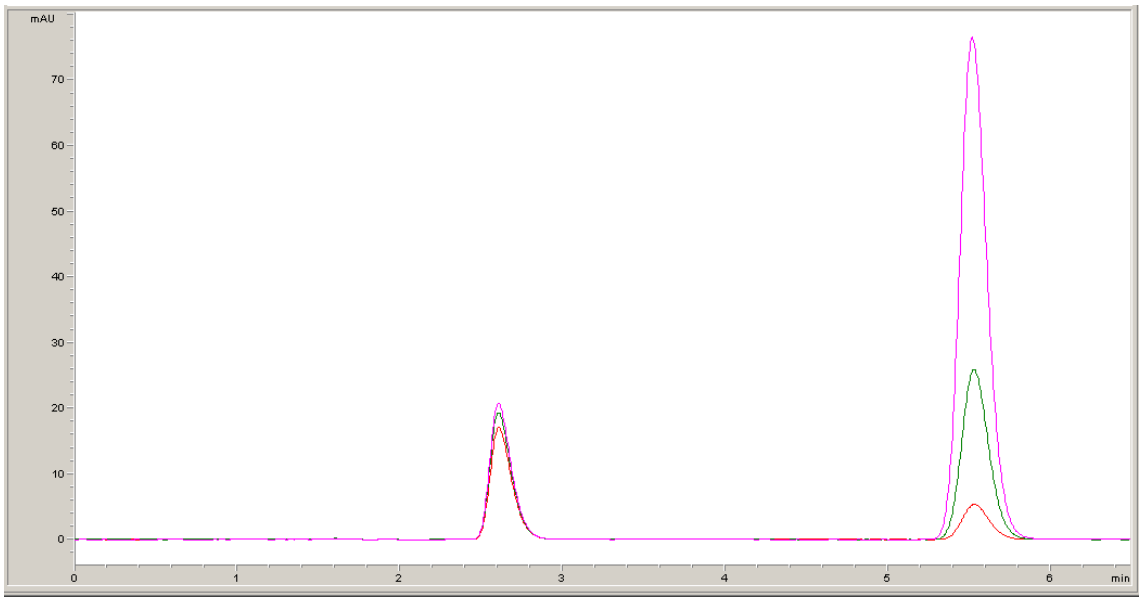
Tablo 4.1. HPLC yönteminin kalibrasyon eğrisinin istatiksel analiz değerleri

Etkin Madde	Derişim (µg/mL)	λ (nm)	LR[a]	Sa	Sb	R
Etofenamate	1-40	286	Y=0.1348x+0.0727	0.0001	0.0018	0.9986

λ: dalga boyu, a: 6 tane kalibasyon eğrisinin ortalaması, LR: lineer regresyon, , R: korelasyon katsayısı
Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması

4.1.3.3. Doğruluk/Kesinlik

Etofenamate kalibrasyon eğrisinin sınırları içerisinde yer alan ve üç farklı derişimde (2.5 12.5, 35 µg/mL) oluşturulan kalite kontrol çözeltilerinin güniçi (1 gün içerisinde aynı yöntem ve aynı laboratuvar koşulları atında 6 defa) ve günler arası (aynı yöntemle 3 farklı günde 6 defa) analizleri yapıldı. Yapılan analizler neticesinde sonuçların ortalama değeri, standart sapması, bağıl stanadart sapması ve bağıl hatası belirlendi. Yöntemin doğruluğu bağıl hatayla (%BH), kesinliği ise bağıl standart sapma (%BSS) ile gösterildi (Tablo 4.2). Şekil 4.4'de kalite kontrol çözeltilerinin kromatogramları verildi.



Şekil 4.4. Etofenamate kalite kontrol çözeltilerine ait HPLC kromatogramı

Tablo 4.2. HPLC yönteminin güniçi ve günler arası doğruluk- kesinlik değerleri

λ(nm)	Eklenen (µg/mL)	Güniçi			Günler arası		
		Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Ortalama (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
286	2.5	2.46±0.002	-1.30	0.09	2.46±0.02	-1.34	1.13
	12.5	12.28±0.006	-1.70	0.05	12.24±0.003	-2.00	0.02
	35	34.41±0.05	-1.67	0.15	34.28±0.03	-2.04	0.11

λ: dalga boyu, SS: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, BH: bağıl hata

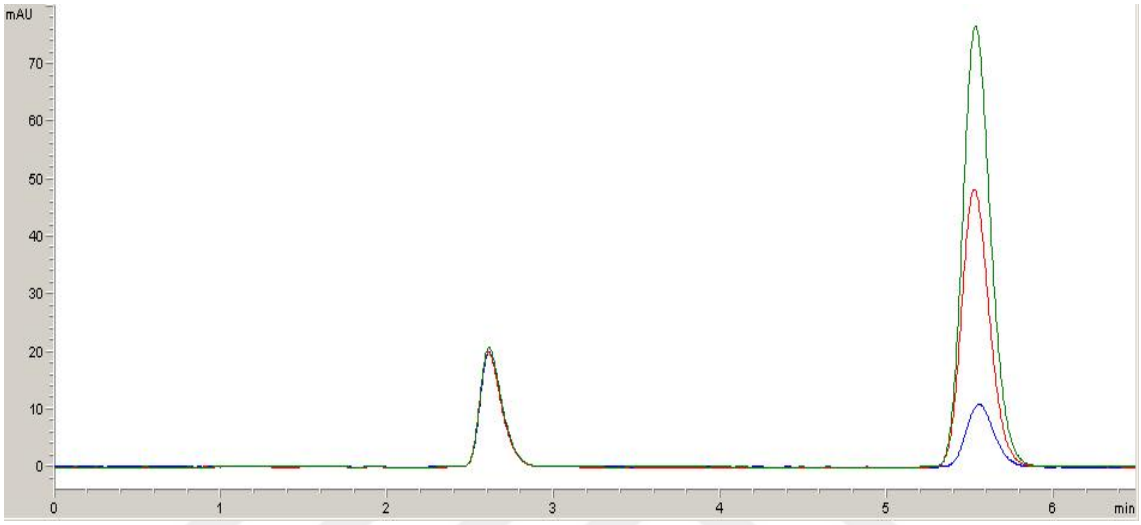
4.1.3.4. Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Etofenamate standart çalışma çözeltierinden elde edilen kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranının 10 olduğu derişim miktar tayin alt sınırı (LOQ) değeri iken, sinyal/gürültü (S/G) oranının 3 olduğu derişim ise gözlenebilme sınırı (LOD) olarak belirlendi.HPLC yönteminin LOQ değeri 1.0 µg/mL ve LOD değeri 0.30 µg/mL olduğu belirlendi.

4.1.3.5. Analitik Geri Kazanım

Standart ekleme yöntemi ile farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları yapıldı. 2.5, 20 ve 35 µg/mL derişimlerde hazırlanan etofenamate çözeltisine ticari satın

alınan %5'lik efamat jelden hazırlanan 2.5 µg/mL derişimindeki çözelti ilave edildi. Toplamda 5, 22.5 ve 37.5 µg/mL derişimdeki çözeltiler oluşturularak kromatogramları alındı (Şekil 4.5). Bu çözeltilerin analitik geri kazanım değerleri [(toplam çözeltinin pik alanı-eklenen standart çözelti pik alanı)/farmasötik preparat çözeltisinin pik alanı]x100 formülü kullanılarak tespit edildi (Tablo 4.3).



Şekil 4.5. 2.5 µg/mL derişimde ılaç çözeltisine üç farklı derişimde olan etofenamate çözeltilerinin eklenmesi sonrası elde edilen çözeltilerin (5, 22.5, 37.5 µg/mL) HPLC kromatogramı

Tablo 4.3. Farmasötik preparatlarda yöntemin analitik geri kazanım değerleri (n=6)

Ticari Preparat	Preparat çözeltisi (µg/mL)	Eklenen (µg/mL)	Ortalama±SS (µg/mL)	% Geri kazanım	%BSS
Efamat Jel(%5)	2.5	2.5	2.53±0.01	101.41	0.73
		20	2.24±0.05	98.73	2.29
		35	2.89±0.02	101.13	0.88

SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma

4.1.4. HPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan HPLC yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla, 50 mg etofenamate etkin maddesini içeren piyasada mevcut olan ticari ilaçta (Efamat jel) etofenamate miktar tayini mevcut yöntemle yapıldı.

4.2. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yöntemi

4.2.1. Standart Çalışma Çözeltilerin Hazırlanması

Etofenamate etkin maddesi jel halinde alınıp hasas terazide 0.1 g tartılıp 100 mL balon jojede metanol ile çözüldükten sonra ultrasonik banyoda 2 defa yarım saat bekletildi. Bu şekilde derişimi 1 mg/mL olan stok çözeltisi elde edildi. Hazırlanan bu çözeltiden uygun miktarlarda alınıp metanol ile seyreltilerek 1, 5, 10, 15, 25, 35, 45 ve 50 µg/mL derişimlerde standart çalışma çözeltileri hazırlandı.

4.2.2. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yöntemi İle Analiz

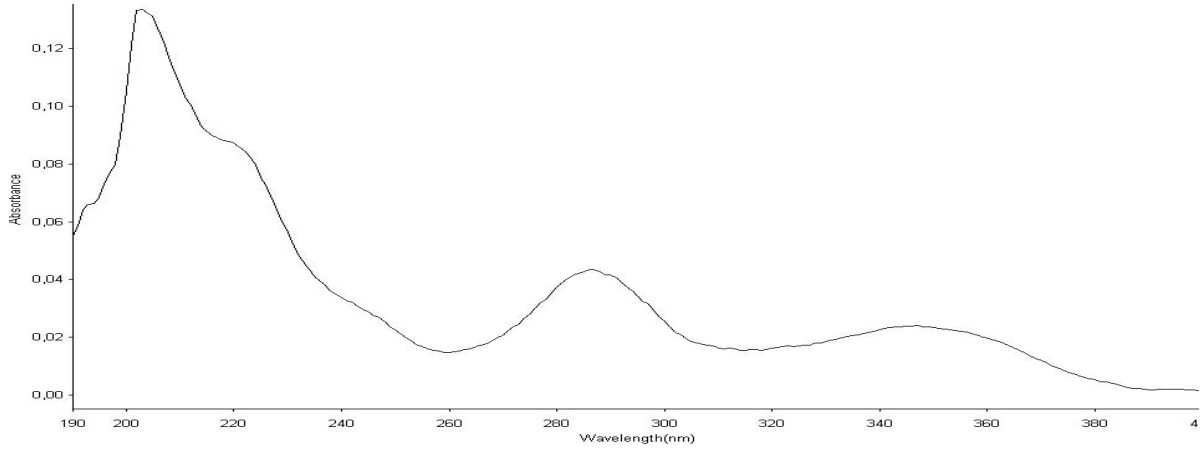
Etofenamate etkin maddesinin UV-Görünür Bölge Spektroskopi çalışmasında uygun çözücüyü belirlemek için yapılan literatür taraması da dikkate alınarak su, kloroform ve metanol çözücüleri ilave edildi ve karıştırıldı. Etofenamatenin en iyi metanolde çözündüğü gözlendi ve çalışmada çözücü olarak metanol kullanıldı. Bunun için ilk önce etofenamate etkin maddesi jel halinde alınıp hasas terazide 0.1 g tartılıp 100 mL balon joje içerisinde metanol de çözündükten sonra ultrasonik banyoda 2 defa yarım saat bekletildi. Bu şekilde 1 mg/mL'lik stok çözeltisi elde edildi. Bu stok çözeltiden uygun miktarda alınıp metanol ile seyreltilerek 1, 5, 10, 15, 25, 35, 45 ve 50 µg/mL derişimlerinde etofenamate standart çözeltisi hazırlandı. Etfenamatenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunu belirlemek için etfenamate standart çözeltisinin 200 nm ve 800 nm dalga boyu aralığında spektrumu alındı. Etfenamatenin 286 nm dalga boyunda maksimum absorbans verdiği tespit edildi. Çalışmada 286 nm dalga boyu kullanıldı.

4.2.3. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yönteminin Validasyonu (Geçerlilik Testleri)

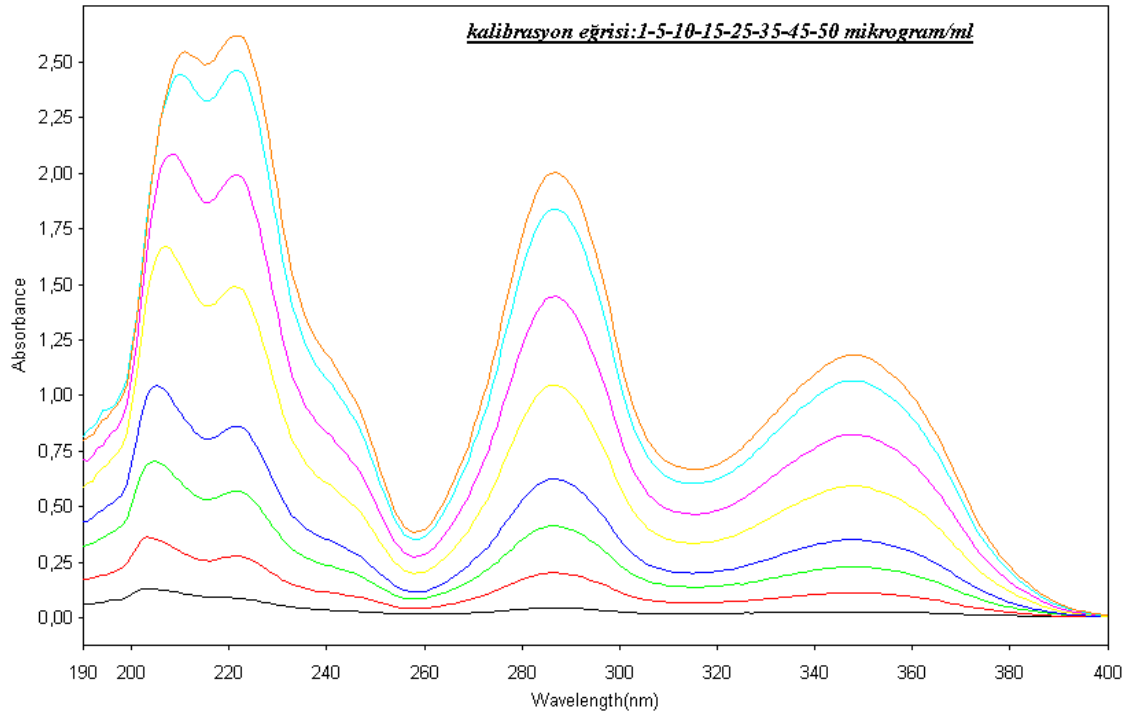
Yöntemin farklı koşullarda uygulanabilirliğini gösterebilmek amacıyla analitik yöntem validasyonu yapıldı.

4.2.3.1. Seçicilik (Belirleyicilik)

Metanol ile hazırlanan etofenamate standart çalışma çözeltilerinin 286 nm dalga boyunda maksimum absorbans verdiği belirlendi. 1.0 µg/mL derişimindeki etofenamate standart çözeltisine ait spektrum Şekil 4.6'da; 1, 5, 10, 15, 25, 35, 45 ve 50 µg/mL olarak sekiz farklı derişimde hazırlanan etofenamate standart çözeltisine ait spektrum ise Şekil 4.7'de verildi.



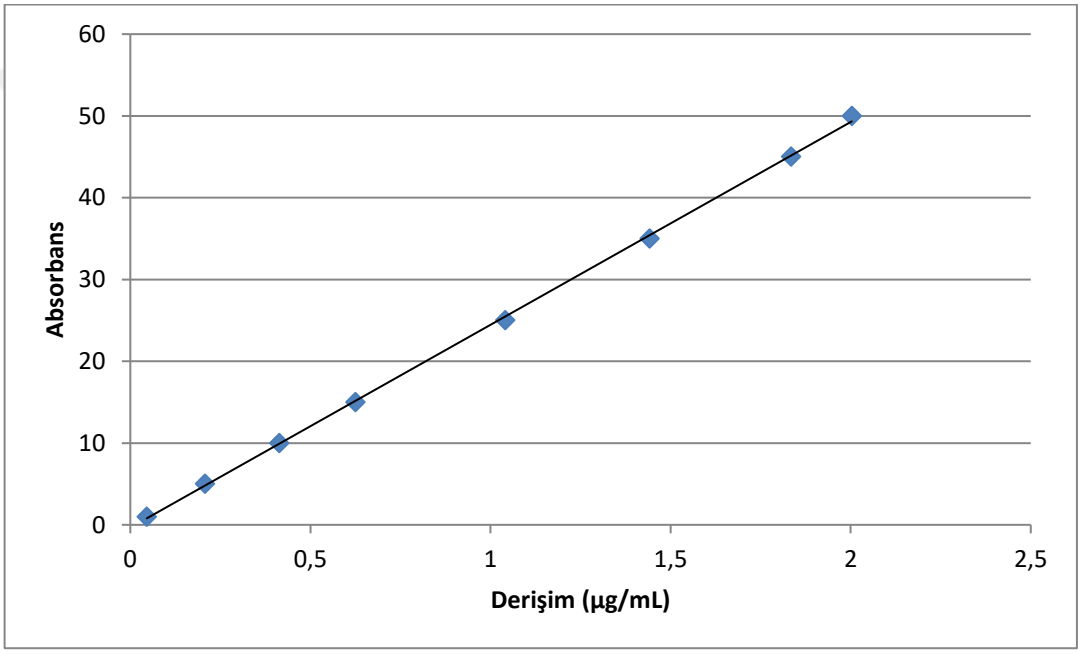
Şekil 4.6. 1.0 µg/mL derişimde standart etofenamate çözeltisinin spektrumu



Şekil 4.7. 1, 5, 10, 15, 25, 35, 45 ve 50 µg/mL derişimlerde etofenamate standart çalışma çözeltilerinin spektrumu

4.2.3.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

1, 5, 10, 15, 25, 35, 45 ve 50 µg/mL derişimlerde etofenamate standart çalışma çözeltilerinin spektrumları alınarak en az altı kez okundu ve absorbans değerleri tespit edildi.Etofenamate derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetildi. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminde oluşturulan ortalama kalibrasyon eğrisi Şekil 4.8'de kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları da Tablo 4.4'de gösterildi.



Şekil 4.8. UV-görünür bölge absorpsiyon spektroskopi yönteminde elde edilen ortalama kalibrasyon eğrisi

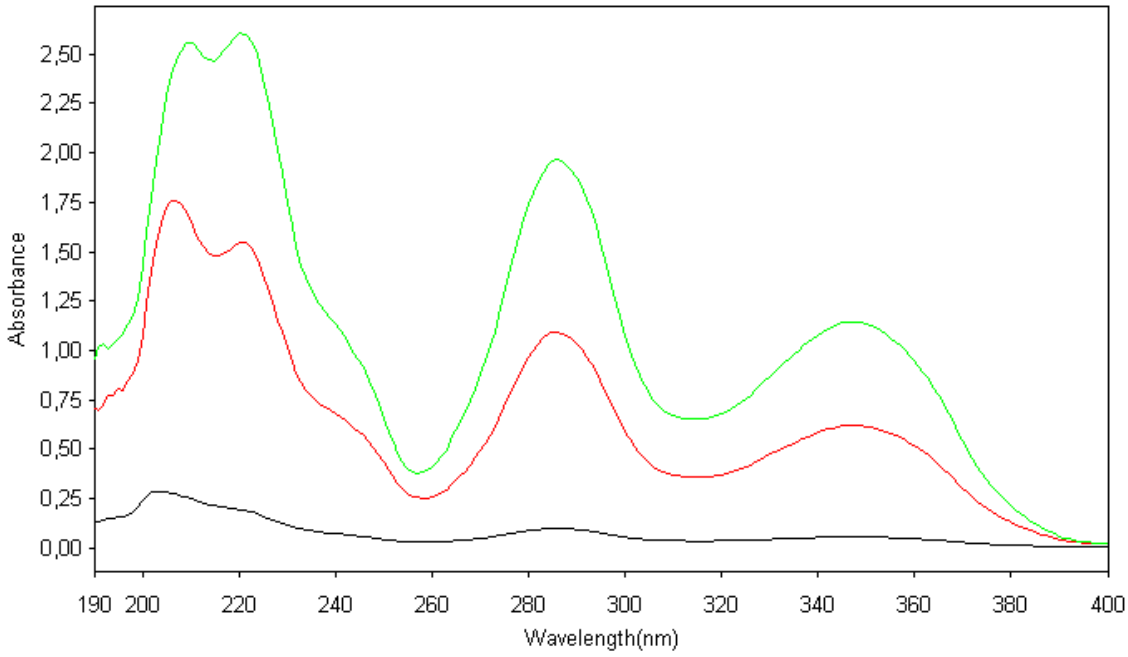
Tablo 4.4. UV-görünür bölge absorpsiyon spektroskopi yöntemi ile edinilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonucu

Derişim (µg/mL)	λ (nm)	LR[a]	Sa	Sb	R
1-50	286	A=24.796x-0.3395	0.0005	0.0001	0.9996

λ: dalga boyu, a: 6 tane kalibasyon eğrisinin ortalaması, LR: lineer regresyon, R: korelasyon katsayısı Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması

4.2.3.3. Doğruluk/Kesinlik

Etofenamate kalibrasyon eğrisinin sınırları arasında bulunan üç farklı derişimde (2, 27 ,47 µg/mL) kalite kontrol çözeltilerinin güniçi ve günler arası ölçümleri en az 6 kez tekrarlanarak analiz edildi. Etofenamate kalite kontrol çözeltilerinin spektrumu Şekil 4.9'da verildi. Analiz sonuçlarının standart sapması, bağıl hatası, bağıl standart sapması , ortalaması belirlendi. Yöntemin kesinlik değeri bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk değeri bağıl hatayla (% BH) verildi. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminin günler arası ve güniçi kesinlik ,doğruluk değerleri Tablo 4.5'de gösterildi.



Şekil 4.9. 2,27 ve 47 µg/mL derişimlerde etofenamate kalite kontrol çözeltilerine ait UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumları

Tablo 4.5. UV-görünür bölge absorpsiyon spektroskopi yönteminin günler arası ve güniçi kesinlik ve doğruluk değerleri(n=6)

λ(nm)	Eklenen (µg/mL)	Güniçi			Günler arası		
		Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Ortalama	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
286	2	2.02±0.16	1.30	7.92	1.93±0.01	-3.14	0.92
	27	26.71±0.06	-1.06	0.25	27.09±0.06	0.34	0.25
	47	47.88±0.39	1.89	0.82	47.56±0.03	1.20	0.07

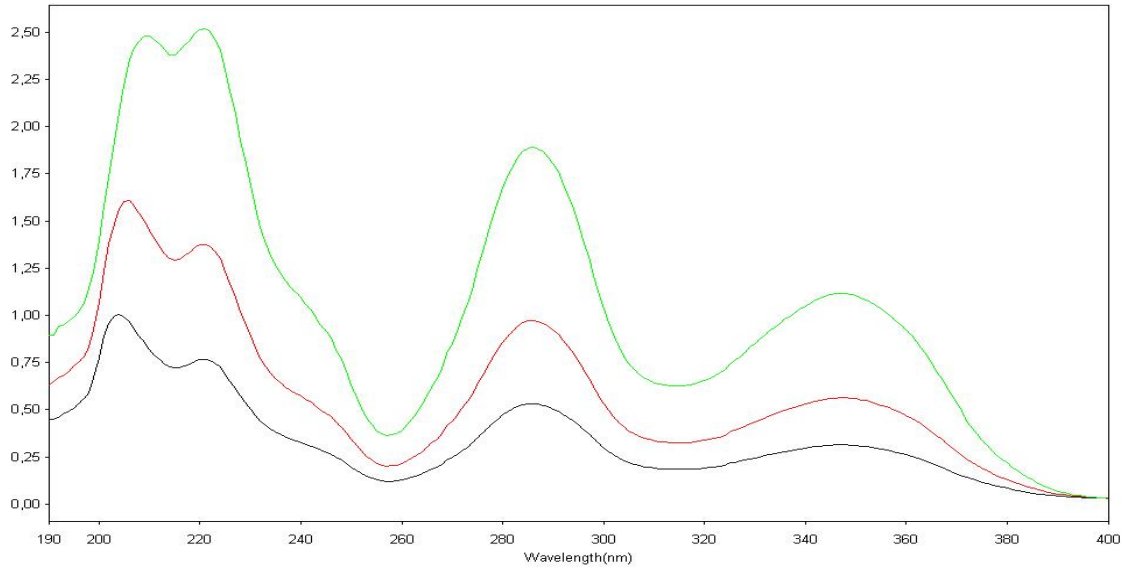
λ: dalga boyu, SS: standart sapma, , BSS: bağıl standart sapma BH: bağıl hata

4.2.3.4. Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Kalibrasyon eğrisinin en düşük değeri olan 1 µg/mL'den daha düşük derişimlerde standart çözeltiler hazırlanarak altı kez absorbans değerleri okundu.Okunan bu altı değerin yüzde (% BSS) bağıl standart sapmaları belirlendi. % BSS değeri % 10 dan düşük olan derişm değeri ise miktar tayin alt sınırı (LOQ) ve % 20 den düşük olan derişim gözlenebilme sınırı (LOD) olarak tespit edildi. Yöntemin LOD değeri 0.5 µg/mL iken LOQ değeri 1.0 µg/mL olarak tespit edildi.

4.2.3.5. Analitik Geri Kazanım

Standart ekleme yöntemi ile farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları yapıldı. 3, 14, 36 µg/mL derişimlerde hazırlanan etofenamate stok çözeltisine ticari satın alınan %5'lik etofenamate jelden 10 µg/mL derişimde hazırlanan çözeltiden eklenerek toplamda 13, 24 ve 46 µg/mL derişiminde çözeltiler oluşturuldu ve UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi cihazına verildi. Her bir farmasötik preparat çözeltisi üzerine üç farklı etofenamate standart çalışma çözeltisi eklendi ve spektrum ölçümleri alındı (Şekil 4.10). Analitik geri kazanım değerleri [(toplam çözeltinin pik alanı-eklenen standart çözelti pik alanı)/farmasötik preparat çözeltisinin pik alanı]x100 formülü kullanılarak tespit edildi (Tablo 4.6).



Şekil 4.10. 10 µg/mL derişimde ılaç çözeltisine eklenen üç farklı derişimde (3, 14 ve 36 µg/mL) etofenamate çözeltilerinin eklenmesi ile elde edilen çözeltilerin spektrumu

Tablo 4.6. Farmasötik preparatlarda yöntemin analitik geri kazanım değerleri (286 nm)

Ticari Preparat	Preparat çözeltisi (µg/mL)	Eklenen (µg/mL)	Ortalama±SS (µg/mL)	% Geri kazanım	%BSS
Efamat Jel(%5)	10	3	9.88±0.03	96.70	0.36
		14	9.84±0.04	99.00	0.47
		36	10.22±0.58	101.30	5.71

λ: dalga boyu, SS: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma

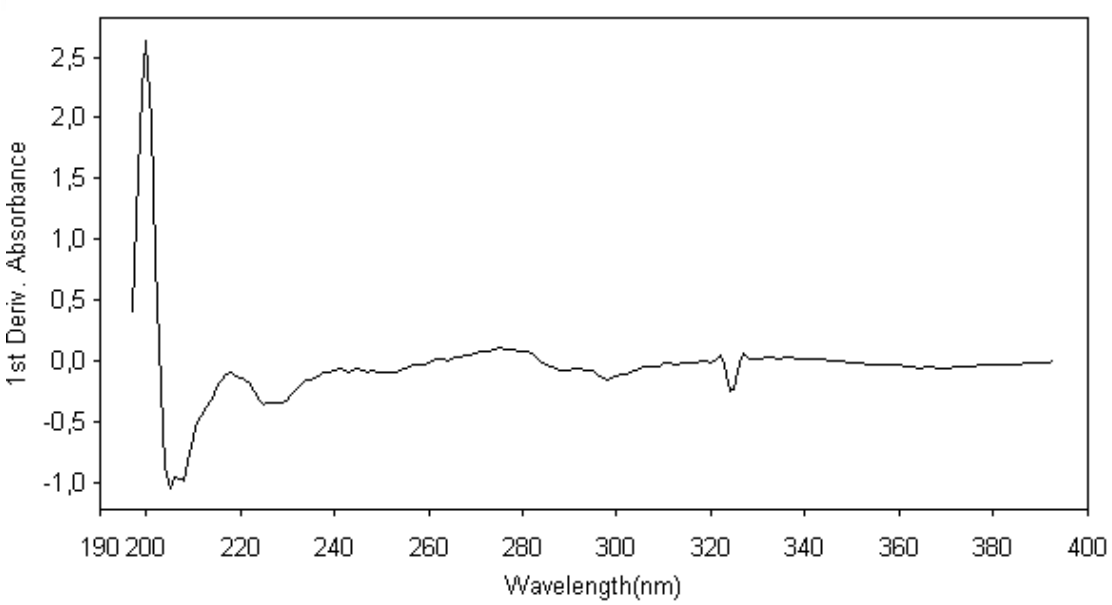
4.2.4. UV–Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilip valdasyonu yapılan UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla 50 mg etofenamate etkin maddesini içeren piyasada mevcut olan ticari ilaçta (Efamat jel) geliştirilen mevcut yöntem ile etofenamate miktar tayini yapıldı.

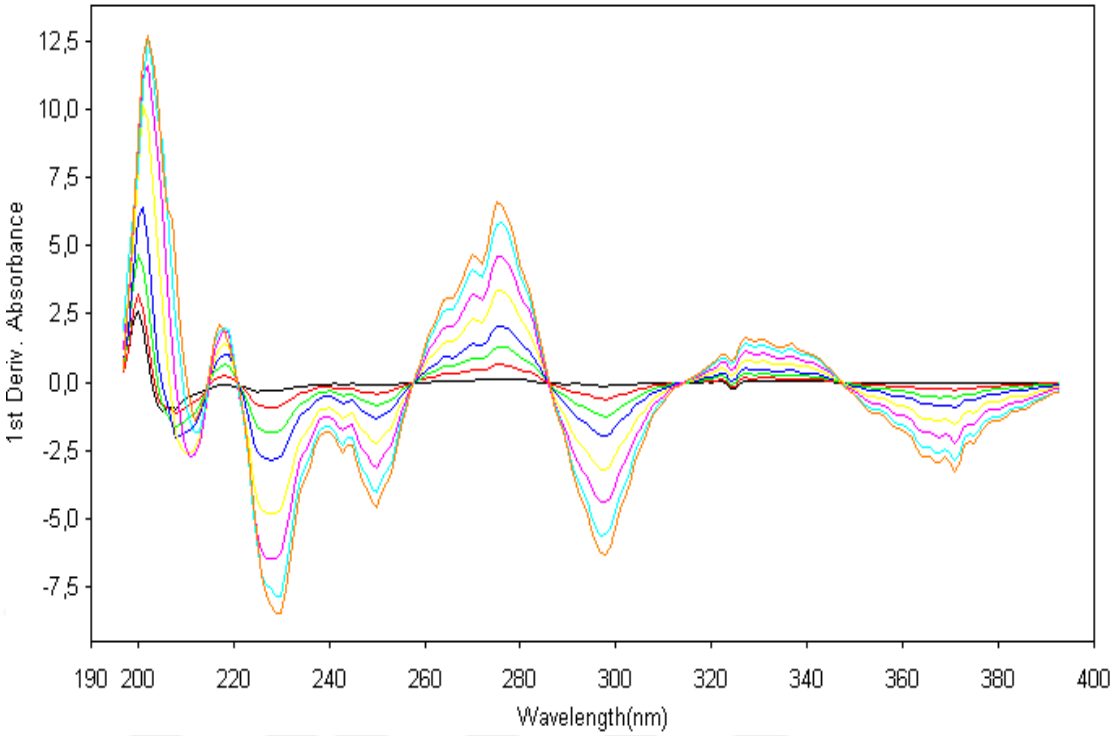
4.3. Birinci Derece Türev Spektroskopi Yöntemi

Etfenamate standart çözeltisinin UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrumunun birinci derece türevi alındı. Birinci derece türev spektrumda dört maksimum ve üç

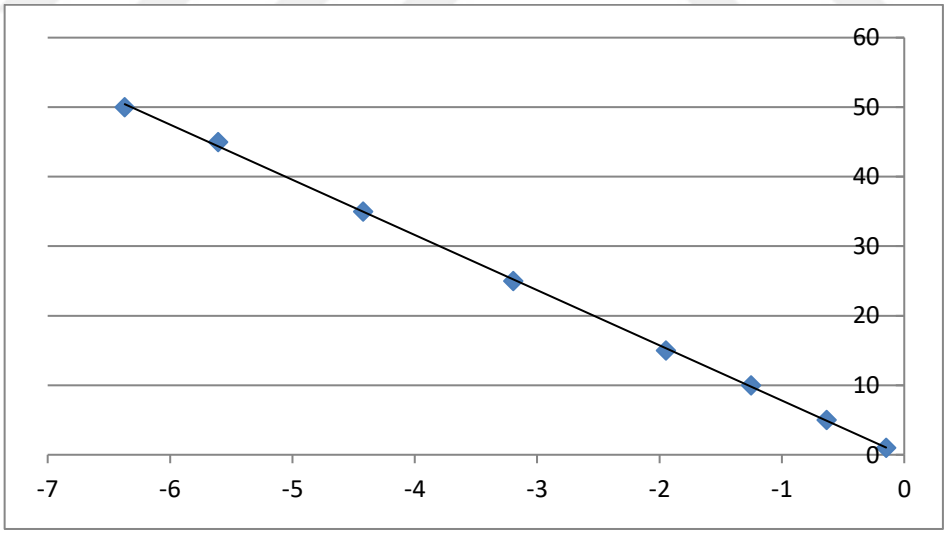
minimum pik gözlendi. 298 nm dalga boyunda absorbans verilen dalga boyu çalışma için belirlendi ve çalışma bu dalga boyunda gerçekleştirildi. Metanol ile hazırlanan etofenamate standart çalışma çözeltilerinin birinci derece spektrumları 200 nm ve 800 nm dalga boyu araığında belirlendi ve 298 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. 1.0 µg/mL derişimindeki etofenamate standart çözeltisine ait birinci türev spektrumu Şekil 4.11'de ; 1, 5, 10, 15, 25, 35, 45 ve 50 µg/mL olarak sekiz farklı derişimde hazırlanan etofenamate standart çözeltilerine ait birinci derece türev spektrumu Şekil 4.12'de ve bunların kalibrasyon eğrisi Şekil 4.13'de gösterildi.



Şekil 4.11. 1.0 µg/mL derişimlerde etofenamate standart çalışma çözeltisinin birinci derece türev spektrumu



Şekil 4.12. 1,5,10,15,25,35,45 ve 50 µg/mL derişimlerde etofenamate standart çalışma çözeltilerinin birinci derece türev spektrumu

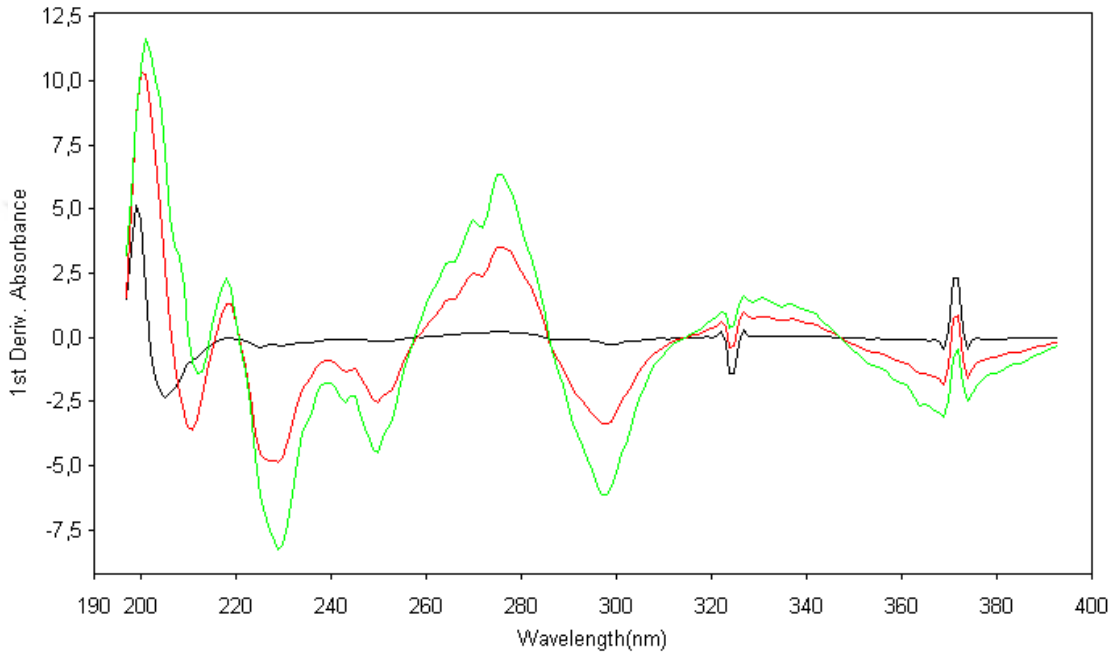


Şekil 4.13. Birinci derece türev spektroskopi yönteminde 298 nm dalga boyunda elde edilen kalibrasyon eğrileri

Tablo 4.7. Birinci derece türev spektroskopi yönteminden elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonucu

Etkin Madde	Derişim (µg/mL)	Λ (nm)	LR[a]	Sa	Sb	R
Etofenamate	1-50	298	A= -7.9389x-0.1398	0.0048	0.0006	0.9997

λ: dalga boyu, a: 6 tane kalibasyon eğrisinin ortalaması, LR: lineer regresyon, , R: korelasyon katsayısı, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması

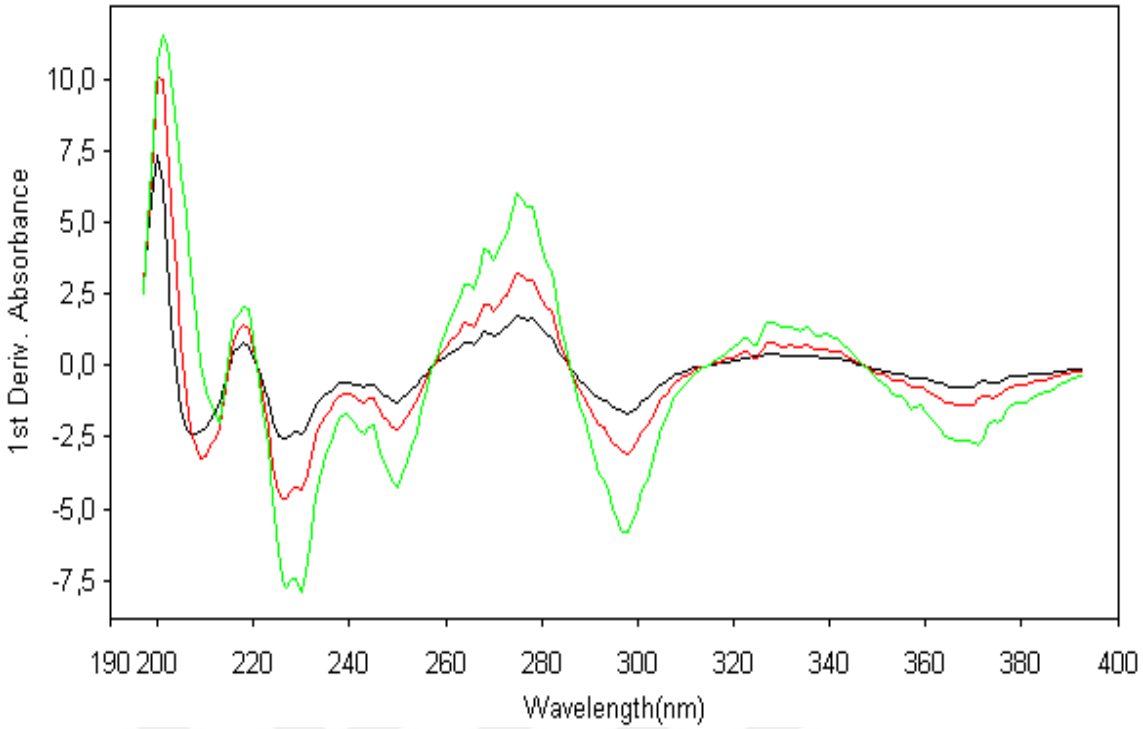


Şekil 4.14. 2,27 ve 47 µg/mL derişimlerde kalite kontrol çözeltilerine ait birinci derece türev spektrumu

Tablo 4.8. Farmasötik preparatlarda birinci derece türev spektroskopi yönteminin analitik geri kazanım değerleri (298nm)

Ticari Preparat	**Preparat çözeltisi (µg/mL)**	**Eklenen (µg/mL)**	**Ortalama±SS (µg/mL)**	**% Geri kazanım**	**%BSS**
Efamat Jel(%5)	10	3	10.00±0.04	100.12	0.45
		14	10.03±0.09	100.28	0.93
		36	9.86±0.09	99.63	0.98

λ: dalgaboyu SS: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma



Şekil 4.15. 10 µg/mL derişimde ılaç çözeltisine eklenen üç farklı derişimde (3, 14 , 36 µg/mL) etofenamate standart çalışma çözeltilerinin eklenmesi ile elde edilen çözeltilerin birinci derece türev spektrumu

5. TARTIŞMA

Analitik kimya çalışmalarında bir maddenin analizini yapabilmek için kullanılacak analitik yöntemin sınırlamaları ve üstünlükleri hakkında yeteri kadar bilgi donanımına ve karar verme yetisine sahip olmak gerekir. Ayrıca çalışılacak konu ile ilgili iyi bir litaratür taramasının yapılmış olması gerekmektedir. Hangi analitik tekniğin daha iyi olduğunu söylemek pek mümkün olmamakla birlikte laboratuvar koşulları ve kullanılacak teknikler değişebilmekte ve her zaman en iyi yol sadece bir tane olamamaktadır. Analitik yöntem seçildikten ve uygulandıktan sonra da kullanılmış olan analitin bu yöntem ile farklı ortamlarda, farklı zamanlarda ve farklı kişiler tarafından miktar tayini için uygulanabilir olduğunu göstermek gerekir. Bu amaçla doğrusallık, doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, özgünlük gibi analitik yöntem geçerlilik test parametrelerinin uygulanması gereklidir. Bu parametreler test edilirken bileşimi bilinen standart numunelerin kullanılması ve kıyaslama yapılarak yorumlanması testin güvenilirliği açısından önem göstermektedir. Bu kullanılacak test numunelerinin asıl analit ile benzer kimyasal özelliklerde ve benzer derişimlerde olmaları gerekmektedir.

İlaç etkin maddelerinin analizi çalışmalarında kantitatif tayinlerin doğru olarak yapılması ilacın biyoyararlanımı açısından oldukça önemlidir. İlaç analizlerinde, analizin yapılacağı ortam farmasötik preparat veya biyolojik sıvılar olabilmektedir. Etkin madde veya maddelerin hangi ortamda miktar tayininin yapılacağına göre literatür bilgilerine de dayanarak analitik yöntem seçiminin yapılması gerekmektedir. Verimli çalışabilmek ve doğru sonuçlar elde edebilmek için iyi bir literatür taraması yapılması gerekir. Literatür çalışmalarının ardından non-steroid antienflamatuar olarak kullanılan etofenamate etkin maddesinin farmasötik preparatlarda miktar tayini için UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi, Birinci Derece Türev Spektroskopi ve HPLC

yöntemlerinin geliştirilip validasyonlarının yapılmasına karar verildi ve laboratuvar çalışmaları da bu bilgiler ışığında gerçekleştirildi.

Çalışmada kullanılan etofenamate standart maddesi Santa Farma ilaç ve A.Ş'den ve %5 etofenamate içeren Efamat Jel ticari farmasötik preparat olarak serbest eczanelerden temin edildi. HPLC analizleri için intermal standart olarak (IS) cilostazol seçildi.

Kromatografi; temel olarak bir ayırma tekniğidir. Bir örnek karışımı içinden istenilen bileşeni ayırmada, analitin tespit ve tayininde kullanılan yöntemler bütünüdür. Bu yöntemler içerisinde Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi kolonun, rejenerasyon gerekmeksizin pek çok kez kullanılabilir olması, tekrarlanabilirliğin daha yüksek olması ve ayrıca düşük derişimlerde miktar analizlerinin de yapılabilir olması, analiz süresi kısa ve duyarlılığın yüksek olması gibi önemli özellikleri sayesinde diğer yöntemlere kıyasla daha avantajlı bir yöntem olarak analitik çalışmalarda kullanımı sıklıkla tercih edilmektedir. HPLC yönteminde sıcaklık, kolon çeşidi, sabit faz, hareketli faz gibi parametreler çalışılan analitin analiz sonucunu etkileyebileceğinden her analizden önce bu parametreler optimize etmek gereklidir.

HPLC yönteminde C_{18} (250x4.6 mm, 5µm) kolonu, metanaol- asetonitril –su (40:35:25, h/h/h) dan oluşan hareketli faz, 1.0 mL /dk akış hızı, 286 nm dalga boyu ve 10 µL enjeksiyon hacminden oluşan çalışma paramatreleri kullanıldı. Bu parametreler belirlenirken öncelikle literatürdeki veriler incelendi ve böylelikle en uygun parametreler tayin edildi.Yönteminin 1-40 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirlendi. Stok çözeltiden 1, 5, 7.5, 10, 20, 35 ve 40 µg/mL derişimlerinde bir seri standart etofenamate çözeltisi hazırlandı ve bu karışıma iç standart olarak 50 µg/mL derişimindeki cilostazol standart çözeltisi eklenerek HPLC'de kromatogramları alındı. Her bir çözeltinin derişimine karşı etofenamate pik alanının clistazol pik alanına oranı

grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrususnun denklemi y=0.1348x+0.0727 (y: etofenamate pik alanı/IS pik alan oranı, x: etofenamate derişimi); etofenamate etkin maddesi için korelasyon katsayısı (r) 0.9986 olarak belirlendi. Yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin alt sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 0.30 µg/mL ve 1.0 µg/mL olarak belirlendi.Gün içi doğruluk ve kesinlik çalışmalarında %BH ve %BSS vsırasıyla %-1.70 ve %0.15'den küçük olduğu belirlendi. Günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında ve %BH ve %BSS değerleri ise sırasıyla %-2.04 ve %1.13'den küçük olduğu tespit edildi. Elde edilen veriler ışığında yöntemin yüksek doğruluk ve kesinlik değerlerine sahip olduğu söylenebilir. Bu yönüyle geliştirilen yöntemin literatürdeki benzer yöntemlere oranla daha tekrarlanabilir sonuçlar sağladığı görülmektedir. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan HPLC yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla ticari olarak satılan farmasötik preparatta (efamat jel) etofenamate miktar tayini başarıyla yapıldı. Analitik geri kazanım değerleri % 100.42 olarak ve %BSS değeri ise %1.30 olduğu belirlendi.

Peraman ve ark.[19,20] yaptıkları çalışmada etofenamatın farklı derişimlerine verdiği tepkinin doğrusallığı, 20-90 µg/mL aralığında sekiz farklı derişimde incelenmiştir. Bu sonuçlar uyguladığımız yöntemin literatürdeki benzer yöntemlere göre daha hassas ölçüm yapabilme kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir.

Peraman ve ark.[19,20] yaptıkları çalışmaya göre %2'den küçük doğruluk ve kesinlik oranları ve %98-101'lerde seyreden geri kazanım değerleri bulunmuştur, böylece bu literatür çalışmasına dayanarak gerçek farmasötik preperatlar üzerinde denenen bu yöntemimizde yüksek doğruluk ve geri kazanım değerleriyle analizi gerçekleştirme imkânı verdiğini göstermekteyiz.

UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yöntemi, yüksek duyarlık ve seçimlilik, yüksek doğruluk, kesinlik, kolaylık ve rahatlık açısından ilaç endüstrisinde farmasötik preparatlarda ilaç etkin maddelerinin miktar tayini analizinde sıklıkla tercih edilen tekniklerden biridir. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. A= f(λ) fonksiyonu esastır. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi çalışmasında, etofenamate etkin maddesi için en iyi çözücü olarak metanol belirlendi ve çözeltilerin 286 nm dalga boyunda maksimum absorbans verdiği tespit edildi. Spektroskopi çalışmalarında 286 nm dalga boyu kullanıldı.

Standart çözeltilerden 1, 5, 10, 15, 25, 35, 45 ve 50 µg/mL olarak sekiz farklı derişimde hazırlanan etofenamate standart çözeltisine ait spektrum değerlendirildi. Etofenamate çözeltisinin derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi y=24.796x +0.3395 (y: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9996, gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri 0.50 µg/mL ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri 1.0 µg/mL olarak belirlendi. Gün içi doğruluk ve kesinlik çalışmalarında %BSS ve %BH sırasıyla % 2.90 ‘dan ve %1.40’dan küçük olduğu belirlendi. Günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında %BSS ve %BH değerleri ise sırasıyla % 0.40 ve %1.50’den küçük olduğu tespit edildi.Farmasötik preparattan yöntemin analitik geri kazanım değeri % 99.00 ve %BSS değerinin ise % 2.18’den düşük olduğu belirlendi. Bu sekiz farklı derişimde hazırlanan etofenamate standart çözeltisine ait birinci derece türev spektrumu değerlendirildi. Etofenamate çözeltisinin derişimine karşı okunan değerler grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi y=-7.933x-0.1398 (y:türev değerleri, x: derişim) , korelasyon katsayısı (r) 0.9997, %BSS ve

%BH değerlerinin 0.78 ve 0.58 , analitik geri kazanım değerinin ise 100.01 olduğu belirlendi.Geliştirilip validasyonu yapılan UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yöntemiyle ticari olarak Eczanelerde satılan Etofenamate Jel (%5) miktar tayini için başarıyla uygulandı.

Etofenamatın analitik yöntem validasyonu hakkında literatür çalışmalarına bakıldığında Peraman ark.[19,20] yaptıkları HPLC yönteminin kullanıldığı çalışma ile bizim çalışmamızın sonuçları tutarlılık göstermektedir. Ayrıca yapılan literatür taramasında farmasötik praparatlarda etofenamatın UV Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi ve Birinci Derece Türev Spektroskopi yöntemleriyle miktar tayinine yöenlik bir çalşmaya ulaşılamamıştır. Bu şekliyle bizim çalışmamız etofenamate etkin maddesinin UV Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi ve Birinci Derece Türev Spektroskopi yöntemlariyle farmasötik preparatlarda miktar tayinine yönelik ilk çalışma özelliğini taşıdığı söylenebilir.

Bu açıdan çalışmamız literatürle karşılaştırıldığında etofenamate etkin maddesine sahip farmasötik preparatlarda etofenamate miktar tayini için UV Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi ve Birinci Derece Türev Spektroskopi yöntemlerini geliştirip validasyonlarının yapılması ve farmasötik preparatlarda uygulanabilir olduğunun gösterilmesi açısından ilk olup özgün bir çalışma özelliği de taşımaktadır. Bu yönüyle çalışmadan elde edilen bilgiler literatüre etofenamate ile ilgili yapılan çalışmalara önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Etofenamate etkin maddesine içeren ilaçlar çok fazla reçete edildiğinden dolayı, bu etkin maddesinin farmasötik preparatlarda miktar tayinine yönelik literatürdeki yöntemlere alternatif olacak UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi, Birinci Derece Türev Spektroskopi ve HPLC yöntemlerinin geliştirilip ve validasyonları yapıldı.

Geliştirilen bu yöntemlerin hassas, duyarlı, seçici, doğru ve kesin olduğu validasyon çalışmalarıyla gösterildiğinden dolayı yöntemlerin farmasötik preparatlarda kalite kontrol amaçlı çalışmalarda başarıyla uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı. Bu çalışmadan elde edilen verilerin literatüre önemli derecede katkı sağlayacağı ve ileriki çalışmalara da yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Şentürk N. Kütanöz inflamasyon/Cutaneous inflammation. *Turkderm*, 2013, 47(1): 28-36.
2. Peraman R., Nayakanti D, Dugga H, Kodikonda S. Development and validation of a stability-indicating assay of etofenamate by rp-hplc and characterization of degradation products. *Scientia Pharmaceutica*, 2013, *81*(4): 1017-1028.
3. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Etofenamate, CID=35375, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/35375. 19 Mart 2019.
4. Kumar V, Abbas A, Aster JC. *Robbins Basic Pathology*, 10th ed. Saunders, Elsevier, 2017: 1781-1785.
5. DeRuiter J. *Principles of Drug Action*, 2nd ed.Tulane University, Fall, 2002: 1-25.
6. Solomon DH. NSAIDs: Therapeutic use and variability of response in adults. In: Romain PL, (ed). *UpToDate* [database on the Internet]. Waltham (MA): UpToDate; 2015. http://www.uptodate.com/contents/search. [cited 2019 July 12].
7. Samavi MS, McKenna F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Robert R, Rich, Thomas A, Fleisher, William T, Shearer, Harry W, Schroeder, Anthony J, Frew, Cornelia M, Weyand (eds). Mosby, 3rd ed. *Clinical Immunology*, 2008: 1307-1316.
8. Fokunang CN, Fokunang ET, Frederick K, Ngameni B, Ngadjui B. Overview of non-steroidal anti-ınflammatory drugs (NSAIDs) in resource limited countries. *MOJ Toxicol*, 2018, *4*(1): 81.
9. Bertolacci L, Romeo E, Veronesi M, Magotti P, Albani C, Dionisi M, Piomelli, D. A binding site for nonsteroidal anti-inflammatory drugs in fatty acid amide hydrolase. *Journal of the American Chemical Society*,2012, *135*(1): 22-25.

10. Rossi S. *Australian Medicines Handbook*, 2nd ed. Adelaide, Australian Medicines Handbook, 2006: 2-3.
11. Villar MA, Pagan JA, Palacios L, Quiralte J, Ramirez M. Allergic contact dermatitis to etofenamate cross-reaction to other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Contact Dermatitis*, 2008, *58*(2): 118-119.
12. Andrew W. *Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia*, 3th ed. Norwich NY, William Andrew Publishing, 2006:1526.
13. Marto J, Baltazar D, Duarte A, Fernandes A, Gouveia L, Militão M, Ribeiro HM. Topical gels of etofenamate in vitro and in vivo evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2015, 20(6): 710-715.
14. Sanz T, Garc A. Combined contact and photocontact allergic dermatitis to etofenamate in flogoprofen gel. *American Journal of Contact Dermatitis*, 2001, *12*(4): 215-216.
15. Patiño JLA, Mejía SN, Ramos EQ. Etofenamate and the analgesic effect in the management of acute pain from spine in the emergency room. *Acta Ortopedica Mexicana*, 2017, *21*(5): 253-255.
16. Dell HD, Fiedler J, Wäsche B. Analysis of etofenamate. Particular determination in biological material (author's transl). *Arzneimittel-Forschung*, 1977, *27*(6B): 1312-1316.
17. Dell HD, Fiedler J, Jacobi H, Kolle J. Gas-liquid chromatographic determination of etofenamate/determination, method and use in biological material . *Arzneimittel-Forschung*, 1981, *31*(1): 17-21.
18. Dannhardt G, Laufer S, Lehr M. HPLC determination of etofenamate and flufenamic acid in biological material. *Clinical Chemistry*, 1988, *34*(12): 2580-2581.

19. Peraman R, Nayakanti D, Dugga H, Kodikonda S. Development and validation of a stability-indicating assay of etofenamate by rp-hplc and characterization of degradation products. *Scientia Pharmaceutica, 2013, 81*(4): 1017-1028.

20. Peraman R, Bhadraya K, Reddy YP, Reddy CS, Lokesh T. Analytical quality by design approach in rp-hplc method development for the assay of etofenamate in dosage forms. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences,* 2015, *77*(6): 751.

21. Fraga A, deAlmeida M, Moreira SV, Sousa NM, Severo L, Matos FA, Almeida L. Intramuscular etofenamate versus diclofenac in the relief of renal colic. *Clinical Drug İnvestigation*, 2003, *23*(11): 701-706.

22. Golcuk Y, Oray D, Atilla OD, Tefennioglu N. Etofenamate associated with lyell syndrome: a case report. *Clinical Toxicology*, 2010, *48*(5): 471-472.

23. Vem İlaç. Kullanma Talimatı. http://www.vemilac.com/yonet/plugins/kcfinder/upload/files/talimat/Restafen_Ampul.pdf. 19 Mart 2019.

24. Medsafe, New Zealand Medicines and Medical Devices Safety Authority https://medsafe.govt.nz/profs/Datasheet/r/Rheumongel.pdf. 19 Mart 2019.

25. Harris DC. *Quantitative Chemical Analysis*, 8th ed. New York, The Macmillan Press, 2010: 385.

26. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*,4th ed. New York, The Macmillan Press, 2005: 119.

27. Martin M, Guiochon G. Effects of high pressure in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005, *1090*(1-2): 16-38.

28. Abidi SL. High-performance liquid chromatography of phosphatidic acids and related polar lipids. *Journal of Chromatography A,* 1991, *587*(2): 193-203.

29. Stobel HA, Heineman WR. *Chemical Instrumentation: A Systematic Approach*, 3rd ed. Hoboken, John Wiley & Sons Ltd, 1989: 1248.

30. Yıldız A, Genç Ö, Bektaş S. *Enstrümental Analiz Yöntemleri Hacettepe Üniversitesi Yayınları,* 2. Baskı. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Basımevi,1977: 49-58.

31. Hışıl Y. *Enstrümental Gıda Analizleri,* 5.Baskı. İzmir, Ege Üniversitesi Yayınları, 2008: 566

32. Avcı A. Enstrümental Analiz Uygulama Kılavuzu,Ankara, Gazi Kitapevi, 2014.

33. Janssen HG. Separation parameters in GC. https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Chromedia/01Gas_Chromotography_(GC)/Gas_Chromotography%3A_Basic_Theory/08Separation_parameters_in_GC. 15 Nisan 2019.

34. McNair H.Separatıon Parameters. http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=muxadDsHqnOxmOlIEcCzBa. 15 Nisan 2019

35. Rajor VM, Parmar PT, Patel CN, Patel AS. Analytıcal method developement and valıdatıon for the sımultaneous estımatıon of memantıne hcl and donepezıl hcl in bulk and pharmaceutıcal dosage form. *IJPRBS*, 2014, 3(3): 188- 197.

36. Gündüz T. *İnstrümental Analiz*, 11. Baskı. Ankara, Gazi Kitapevi, 2012: 1357.

37. Holler F, Nieman T, Skoog D. *Principles of Instrumental Analysis*, 5th ed. Philadelphia, Saunders College Publishing, 1998: 849.

38. Wiberg K. Multivariate Spectroscopic Methods for the Analysis of Solutions. Institutionen För Analytisk Kemi, Doktora Tezi, Stockholm: Stockholm University, 2004

39. Stuart B. *Spectral analysis. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Hoboken, John Wiley & Sons Ltd, 2004: 45-70.

40. Hollas JM. *Modern Spectroscopy*, 4th ed. Hokoben, John Wiley & Sons Ltd, 2004: 483.

41. Gündüz T. *İnstrümental Analiz*, 6. Baskı. Ankara, Gazi Kitapevi, 2002: 101.

42. Aydın A. *Enstrümental Analiz-Teori ve Prensipler*, İstanbul, İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, 982.

43. Martire C, Hainberger L. Sensitive and selective spectrophotometric determination of aluminium with chrome fast pure blue B and cetyltrimethylammoniumbromide. *Microchimica Acta*, 1985, 86(3-4): 223-229.

44. JUPAC. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report) *Pure and Applied Chemistry*, 2002, 74: 835 - *855*

45. U.S. Depertment of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001 BP. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation,http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm. 15 Nisan 2019.

46. Willet JE, Gas Chromatography Analytical Chemistry by Open Learning, 5th ed. Kealey D (ed). London, John Willey & Sons Ltd, 1991: 65-73.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Merve YILDIZ KINIK
Doğum tarihi:	20.09.1988
Doğum Yeri:	ERZURUM
Medeni Hali:	Evli
Uyruğu:	T.C
Adres:	Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, 25240 ERZURUM
Tel:	0537 301 27 97
Faks:	
E-mail:	merveyldzknk@gmail.com
Eğitim	
Lise:	Erzurum Mecidiye Anadolu Lisesi (2007)
Lisans:	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2008-2013)
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2015-2019)
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta Derece
Almanca:	
Rusça:	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
İlgi Alanları ve Hobiler	

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'nun danışmanlığında sunulan "Etofenamate Etkin Maddesinin Biyoanalitik Yöntem Validasvonu" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	*9*	**15**
Genel Bilgiler	*21*	**30**
Materyal ve Metod	*24*	**35**
Bulgular	*10*	**10**
Tartışma	*7*	**15**

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 18 /07/ 2019

Öğrenci Adı-Soyadı Merve YILDIZ KINIK **İmza**

Danışman Adı-Soyadı Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU **İmza**

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve …… sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve …… sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu

Sayı : 93722986.12/57
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

02/11/2017

Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

İlgi: 02.11.2017 tarih ve 255 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Alt Etik Kurulunun 02.11.2017 tarihinde almış olduğu 12 numaralı karar ile danışmanı olduğunuz yüksek lisans öğrencisi Merve YILDIZ'ın "Etofenamate Etkin Maddesinin Biyoanalitik Yöntem Validasyonu" başlıklı çalışma etik kurulumuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

(Oylamaya Katılmadı)
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU
Başkan

Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Üye

Prof. Dr. Halise İnci GÜL
Üye

Doç. Dr. Yasin BAYIR
Üye

Doç. Dr. Beyzagül POLAT
Üye

Karar-12- Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'nun danışmanı olduğu yüksek lisans öğrencisi Merve YILDIZ'ın Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Laboratuvarında yürüteceği "Etofenamate Etkin Maddesinin Biyoanalitik Yöntem Validasyonu" başlıklı çalışma ile ilgili 02.11.2017 tarih ve 255 sayılı yazı ile ekleri görüşülmüştür.

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yürütülmesinin etik kurallara uygun olduğu (Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU çalışma ekibinde olduğundan oylamaya katılmadı) mevcut oybirliği ile kabul edilmiştir.

Atatürk Üniversitesi kampusu 25040 Tlf: 0442-231 52 07 Fax: 0442 – 2315201 Elektronik Post: eczfak@atauni.edu.tr ERZURUM