

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PARASETAMOL VE FLURBİPROFENİN YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ
İLE YANYANA ANALİZİ**

NEŞET NEŞETOĞLU

**DANIŞMAN
PROF.DR. SERAP SAĞLIK ASLAN**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Neşet NEŞETOĞLU tarafından hazırlanan Parasetamol ve flurbiprofenin yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile yanyana analizi başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

21 / 08 / 2015

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

1. Prof. Dr. Serap SAĞLIK ASLAN (İ.Ü. Eczacılık Fak. Analitik Kimya AD.)

2. Prof. Dr. Durişehvar ÜNAL (İ.Ü. Eczacılık Fak. Analitik Kimya AD)

3. Yrd. Doç. Dr. Ebru TÜRKÖZ ACAR (Yeditepe Üni. Eczacılık Fak. Analitik Kimya AD)

4.

5.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Neşet NEŞETOĞLU

(İmza)

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, desteğini hiç esirgemeyen, samimiyeti ile yanımda olan değerli danışman hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan'a

Araştırma ve çalışmalarım sırasında bana gerek bilgi gerek laboratuvar imkanları açısından her zaman destek veren Prof. Dr. Durişehvar Özer Ünal'a

Destek sağlayan Cem Sarioğlu'na

Yardımlarını esirgemeyen aileme, arkadaşlarım Cem Kaplan, İbrahim Daniş, Ali Rahmi Alp'e, Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 40085

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLOLAR LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Parasetamol (Asetaminofen)	3
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	3
2.1.2. Farmakolojik Özellikleri	4
2.1.3. Analiz Yöntemleri.....	5
2.1.3.1. HPLC-UV Yöntemi ile Analizleri	5
2.1.3.2. LC-MS/MS Yöntemi ile Analizleri.....	7
2.1.3.3. LC-ESI/MS Yöntemi ile Analizleri	8
2.1.3.4. Spektrofotometrik Yöntemler ile Analizleri	8
2.1.3.5. Diğer Yöntemler ile Analizleri.....	8
2.2. Flurbiprofen	9
2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	9
2.2.2. Farmakolojik Özellikleri	10
2.2.3. Analiz Yöntemleri.....	11
2.2.3.1. HPLC-UV Yöntemi ile Analiz Yöntemleri.....	11
2.2.3.2. LC-MS/MS Yöntemi ile Analizleri.....	13
2.2.3.3. HPLC Flouresans Yöntemi ile Analizleri	14
2.2.3.4. HPTLC Yöntemi ile Analizleri	15
2.3. Sıvı Kromatografisi.....	15
2.3.1. Sıvı Kromatografisi Sistemleri.....	15

2.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	15
2.3.3. Autosampler (Otomatik Örnekleyici)	18
2.3.3.1. Mobil (Hareketli) Faz	19
2.3.4. Pompa	19
2.3.5. Kolon	19
2.3.6. Dedektör	20
2.4. HPLC Analizlerinin Değerlendirilmesi	20
2.5. Sistem Uygunluk Testi	20
2.6. Validasyon Parametreleri	22
2.6.1. Spesifiklik ve Seçicilik	22
2.6.2. Doğrusallık	22
2.6.3. Doğruluk	22
2.6.4. Kesinlik	23
2.6.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	24
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	24
3.1.2. Çözeltiler	25
3.1.2.1. Mobil Faz Çözeltisi	25
3.1.2.2. Parasetamol Çözeltileri	25
3.1.2.3. Flurbiprofen Çözeltileri	27
3.2. Aletler ve Gereçler	28
3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi	30
3.4. Parasetamolün ve Flurbiprofenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-UV) ile Yöntem Geliştirme	31
3.4.1. Dedektör Dalga Boyu Seçimi	31
3.4.2. Mobil Faz Seçimi	31
3.4.3. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	31
3.5. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	32
3.5.1. Spesifiklik ve Seçicilik	32
3.5.2. Doğrusallık	32
3.5.3. Doğruluk	32
3.5.4. Kesinlik	33

3.5.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ).....	33
3.5.6. Validasyon Serisinin Hazırlanması	33
3.6. Tabletlerde Parasetamol ve Flurbiprofenin Analizi	34
3.6.1. Tabletlerin ve Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması	34
3.6.2. Geliştirilen HPLC Yöntemi ile Tabletlerin Analizi	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Parasetamolün ve Flurbiprofenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Yanyana Analiz Sonuçları	35
4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi.....	35
4.2. Yöntem Validasyonu	36
4.2.1. Seçicilik.....	36
4.2.2. Doğrusallık.....	37
4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik	39
4.2.4. Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları	43
4.3. Tabletlerde Parasetamol ve Flurbiprofen Analizi	43
5. TARTIŞMA	45
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	52

TABLOLAR LİSTESİ

.....	
Tablo 2-1: FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri	21
Tablo 3-1:Referans standart.....	24
Tablo 3-2: Kullanılan Kimyasallar	24
Tablo 3-3: Parasetamol için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı.....	26
Tablo 3-4: Kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı	26
Tablo 3-5: Flurbiprofen için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı	27
Tablo 3-6: Kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı	28
Tablo 3-7: Ekipmanlar	28
Tablo 3-8: Destek ekipmanlar.....	29
Tablo 3-9: Cam Malzemeler	30
Tablo 4-1: Parasetamol için validasyon serilerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları	38
Tablo 4-2: Flurbiprofen için validasyon serilerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları	39
Tablo 4-3: Bir Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Parasetamolün Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	40
Tablo 4-4: Bir Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Flurbiprofenin Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	40
Tablo 4-5: İki Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Parasetamolün Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	41
Tablo 4-6 İki Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Flurbiprofenin Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	41
Tablo 4-7: Üç Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Parasetamolün Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	42
Tablo 4-8: Üç Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Flurbiprofenin Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	42
Tablo 4-9: Tabletlerde Parasetamol Analiz Sonuçları	44
Tablo 4-10: Tabletlerde Flurbiprofen Analiz Sonuçları	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Parasetamolün Molekül Yapısı	3
Şekil 2-2: Parasetamolün 10 µg/mL konsantrasyonda asetonitrilde 200-400 nm aralığında alınmış UV spektrumu	4
Şekil 2-3: Flurbiprofenin Molekül Yapısı	9
Şekil 2-4: Flurbiprofenin 10 µg/mL konsantrasyonda asetonitrilde 200-400 nm aralığında alınmış UV spektrumu	10
Şekil 2-5: İki bileşenli bir numuneye ait kromatogram	16
Şekil 2-6: HPLC sistemi	18
Şekil 4-1: 0.3 µg/mL parasetamol ve 0.2 µg/mL flurbiprofen karışımına ait örnek kromatogram.....	35
Şekil 4-2: Mobil faz enjeksiyonuna ait bir kromatogram	36
Şekil 4-3: Plasebo çözeltisine ait kromatogram.....	36
Şekil 4-4: Parasetamolün 0,1-1,5 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	37
Şekil 4-5: Flurbiprofenin 0,1-1,5 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	38
Şekil 4-6: Tabletteki analizlere ait bir kromatogram	43

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)

MS : Kütle spektrometrisi

HPLC/MS/MS : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi (High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

LC–MS/MS: Sıralı Kütle spektrumlu Sıvı Kromatografisi

LC-ESI-MS/MS: Elektrosprey İyonizasyon Sıralı Kütle Spektrumlu Sıvı Kromatografisi

UPLC/MS-MS : Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi (Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

NSAİİ: Non Steroidal Anti Enflamatuvar

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

FDA : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S Food and Drug Administration)

UV : Ultraviyole

HCl : Hidroklorik asit

NaOH : Sodyum Hidroksit

ACN : Asetonitril

MeOH : Metanol

mM : miliMolar

N : normalite

v : hacim

g : gram

mg : miligram

µg : mikrogram

ng : nanogram

mL : mililitre

μ L : mikrolitre

nm : nanometre

C : konsantrasyon

$\bar{A}$: pik alanları ortalaması

A : pik alanı

SD : Standart sapma

RSD : Bağıl standart sapma

%CV: Varyasyon katsayısı (Coefficient of variation)

LOD : Teşhis sınırı

LOQ : Tayin sınırı

σ : İnterseptin standart sapması

S: Eğim

PAR : Parasetamol

FLU : Flurbiprofen

KK : Kalite kontrol

ÖZET

(Neşetoğlu, N. (2015). Parasetamol ve Flurbiprofenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Yanyana Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu tez çalışmasında, patenti bulunan ancak henüz kullanıma sunulmamış, tablet formundaki parasetamol ve flurbiprofenin yanyana analizi için basit ve seçici bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem ters fazlı C_{18} kolonda; fosforik asit ile pH 5.00'a ayarlanmış 0.1 M sodyum asetat : asetonitril (40:60, h/h) mobil fazı ile 0.8 mL/dak akış hızında maddelerin ayrılması esasına dayanmaktadır. Dedeksiyon dalga boyu 247 nm'ye ayarlanmıştır. Maddelerin doğrusallık aralıkları parasetamol için 0.1-1.5 µg/mL ve flurbiprofen için 0.1-1.5 µg/mL olarak bulunmuştur. Teşhis (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) ise sırası ile PAR için 16.33 ng/mL ve 54.45 ng/mL; FLU için 15.25 ng/mL ve 50.82 ng/mL' dir. Geliştirilen yöntemin validasyonu yapılarak, bu iki ilaç maddesinin tabletlerdeki analizine uygulanmıştır. Geliştirilen yöntem kolay, hassas ve tekrarlanabilir olup parasetamol ve flurbiprofenin yan yana tablet analizlerinde güvenle kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler :Parasetamol, Flurbiprofen, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, Tablet Analizi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 40085

ABSTRACT

Neşetoğlu, N. (2015) Simultaneous Determination of Paracetamol and Flurbiprofen by High-Performance Liquid Chromatographic Method, Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. Istanbul.

In this study, a simple and selective HPLC method was developed for the analysis of paracetamol and flurbiprofen in tablets with a patent but not yet available. The method was based on separation by using a mobile phase acetonitrile– 0.1M sodium acetate solution (pH:5.00) (60:40,v/v) and reversed-phase C₁₈ column. The mobile phase flow rate was 0.8mL/min. The substances were detected at 247 nm. The linearity ranges were found as 0.1-1.5 µg/mL for both paracetamol and flurbiprofen, respectively. The limits of detection and quantification were found to be 16.33 ng/mL and 54.45 ng/mL for PAR and 15.25 ng/mL and 50.82 ng/mL for FLU, respectively. The proposed method was successfully validated and applied for the determination of tablets. The developed method is simple, sensitive and reproducible and can be used safely routine simultaneous analysis of paracetamol and flurbiprofen in tablets.

Key Words: Paracetamol, Flurbiprofen, High Performance Liquid Chromatography, Tablet Analysis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No:40085

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Analjezik-antipiretik ilaçlardan nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar ve parasetamol (asetaminofen), günlük pratikte güvenli olduğu düşünülen, ağrı ve ateş kontrolünde sık kullanılan ilaçlardır [1]. Parasetamol nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) farklı olarak, santral sinir sisteminde (SSS) etki gösterir ve prostaglandin sentezi ile ilgili bir enzim olan siklooksijenazın COX-1 ve COX-2 izoformlarını inhibe eder ve etkisini çabuk gösterir. Oral yoldan alındığında gastrointestinal kanaldan hızla ve tama yakın absorbe olur [2]. Plazmada doruk konsantrasyonlarına 0.17-1.2 saat içinde ulaşır [3]. Parasetamol benzeri diğer ilaçlardan farklı olarak , hipotalamus ve omurilik gibi peroksitlerden fakir ortamda, prostaglandin sentezini inhibe ederek antipiretik ve analjezik özellik gösterir. Beyinde COX-3 enzimini inhibe etmesi santral analjezik etkisinde rol oynar. Periferik dokularda siklooksijenaz enzimini inhibe edemediği için antiinflamatuvar aktivitesi yoktur [1-4]. Parasetamol orta ve şiddetli postoperatif ağrıda etkin olduğu ve postoperatif opioid tüketiminde azalmayla birlikte analjezi kalitesinde artış sağlamaktadır. Ayrıca parasetamol opioidlerin reseptörlere bağlanmasıyla ilişkili komplikasyonlara ve NSAİİ kullanımı ile gözlenebilen gastrik irritasyon ve kanamaya neden olmamaktadır [5]. Normal dozlarda alındığında oldukça güvenlidir fakat, yüksek dozlarda alındığında karaciğer nekrozuna neden olabilir. Sağlıklı yetişkinlerin 24 saatlik bir periyotta 4 gram parasetamolden (asetaminofen) daha fazla almamaları gerekir. Ağrı tedavisinde tablet başına 650-750 mg arasında parasetamol içerebilir. Bu yüzden ortadan şiddetliye değişen ağrılarda parasetamol ile kombine edilmiş NSAİİ' ler faydalı olabilir. Odontojenik ağrılarda daha iyi rahatlama sağlamak amacıyla NSAİİ' lerin parasetamol ile kombine edilmiş formları kullanılmaktadır [4-5]. Ayrıca parasetamolün tedaviye sunulmuş ruhsatlı farklı kombinasyonları da mevcuttur.

Flurbiprofen propiyonik asit grubu nonsteroidal antiinflamatuvar bir ilaçtır(NSAİİ). Flurbiprofen siklooksijenaz enzimini reversible yani geri dönüşümlü olarak inhibe ederek periferde enflamasyondan sorumlu tutulan prostaglandin sentezini engeller. Bu sayede parasetamolün etkili olamadığı hususlarda antiinflamatuvar özellik gösterir. Yarı ömrü ketoprofen ve fenoprofen'e göre daha uzun olduğu için günde iki kez alınarak kullanılır. Oral yoldan ağrı ve romatoid ve osteoartrit ile ilişkili enflamasyona karşı

kullanılır. Ayrıca ameliyat sonrası ve lazer trabeküloplastisi sonucu anterior segmentte meydana gelen enflamasyonunun tedavisinde kullanılan güvenli bir analjeziktir [2-7]. Diğer NSAİİ' ler gibi flurbiprofen trombositlerde bulunan ve güçlü agresyon yapan tromboksan A2 yapımını engeller. Geçici olarak trombosit agregasyonunu inhibe eder ve bazen kanama zamanını uzatır ve gastrik prostaglandinlerin sentezini inhibe etmelerine bağlı olarak gastrik veya intestinal ülserlerin ortaya çıkmasına neden olurlar [2]. Ancak parasetamol opioidlerin reseptörlere bağlanmasıyla ilişkili komplikasyonlara ve NSAİİ kullanımı ile gözlenebilen gastrik irritasyon ve kanamaya neden olmadığı bildirilmiştir[5].

Buluş sahibi Marvin Berkowitz, başvuru sahibi The Upjohn Company ve yayın numarası EP0109281 A1 olan patente ait tablet formunda parasetamol ve flurbiprofen karışımı mevcuttur.

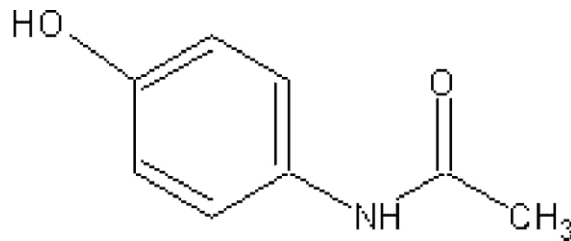
Parasetamol ve flurbiprofenin farmasötik preparatlardaki analizleri incelendiğinde bu iki ilaç maddesinin yan yana analizi için yapılmış çalışmalara rastlanmamıştır. Bu nedenle kombinasyon olarak tedaviye sunulabilecek olan bu iki maddenin yanyana analizi, bu özgün yüksek lisans tezi kapsamında yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılarak tabletlerde analizi için bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin validasyonu yapılmış ve ilaç maddelerinin tabletlerdeki analizlerine uygulanabilirliği test edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parasetamol (Asetaminofen)

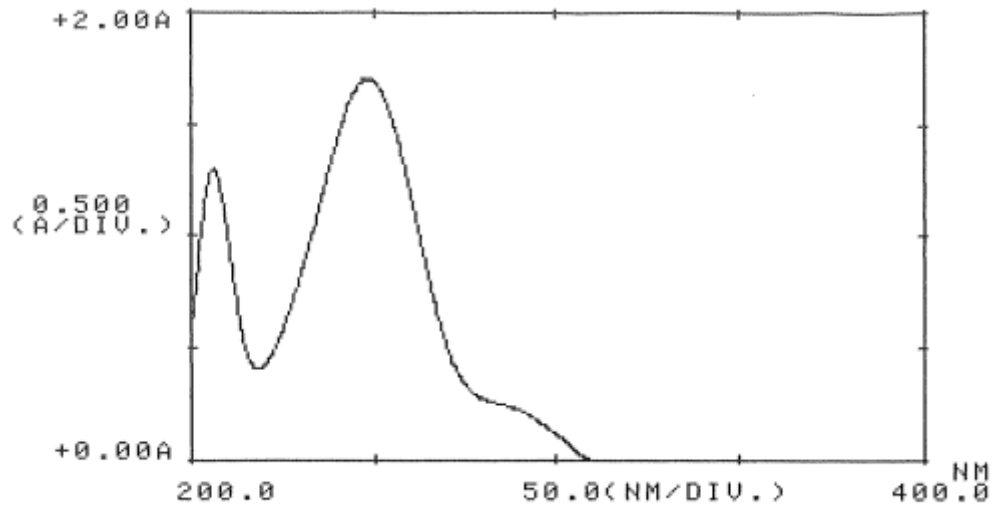
Harmon Northrop Morse 1873 yılında p-nitrofenolü asetik asitle indirgeyerek parasetamolü ilk sentezleyen kişidir. Fakat parasetamol tıpta kullanıma girmek için 20 yıl beklemiştir. Brodie ve Axelrod 1948 yılında parasetamolun asetanilid gibi toksik etkilere sahip olmadığını bildirmişlerdir. [8-9]. Asetanilidin toksisite göstermesi ve organizmada etkiden sorumlu N-asetil-p-aminofenole dönüşmesiyle üzerinde çok sayıda çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar sonucu toksik olmayan p-asetamidofenol yapısında bileşik geliştirilmiştir [10]. Parasetamol ilk kez 1955 yılında ‘Tylenol’ adı altında Amerika Birleşik Devletlerinde piyasaya sürüldü. İngiltere’de 1956 yılında ‘Panadol’ ticari adı ile ağrı ve ateş giderici olarak piyasaya sürüldü. Çocuklar için hazırlanan formu ‘Panadol elixir’ 1958’ de kullanıma girdi. Sonraki yıllarda az yan etkisi olan bir analjezik olarak büyük popülerite kazandı [9]. Tablet, şurup, çözelti, rektal supozituar gibi değişik farmasötik dozaj formları mevcuttur [2]. Klinik çalışmalarda parasetamolün santral siklooksijenaz enzim inhibisyonu etkileriyle orta ve şiddetli postoperatif ağrıda etkin olduğu ve postoperatif opioid tüketiminde azalmayla birlikte analjezi kalitesinde artış sağladığı gösterilmiştir [5].

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-1: Parasetamolün Molekül Yapısı

Parasetamol ya da diğer adıyla asetaminofen, paraaminofenol türevi analjezik ve antipiretik bir ilaçtır [2]. Beyaz renkli kristal yapıya sahiptir. Parasetamolün kimyasal adı N-(4-hidroksifenil) asetamid ve moleküler formülü $C_8H_9NO_2$ ' dir. Bu kimyasal yapısından dolayı asetaminofen olarak adlandırılır. Molekül ağırlığı 151.17g/mol, erime noktası 169 °C, yoğunluğu 1.263 g/cm³, sudaki çözünürlüğü 1.4 g/100 mL (20 °C)' dir. Asidik pKa: 9.5' tir [3-9]. Parasetamol nonpolar çözücülerde düşük, orta polariteye sahip çözücülerde ve alkollerde iyi çözünürlük derecesine sahiptir. [11].



Şekil 2-2: Parasetamolün 10 µg/mL konsantrasyonda asetonitrilde 200-400 nm aralığında alınmış UV spektrumu

2.1.2. Farmakolojik Özellikleri

NSAİİ' lerden (nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlar) farklı olarak, asetaminofen esas olarak santral sinir sisteminde (SSS) etki gösterir ve prostaglandin sentezi ile ilgili bir enzim olan siklooksijenazı inhibe eder ve etkisini çabuk gösterir. Oral yoldan alındığında gastrointestinal kanaldan hızla ve tama yakın absorbe olur. Plazmada doruk

konsantrasyonlarına 0.17-1.2 saat içinde ulaşır [3]. Plazma proteinlerine bağlanması zayıftır. Plazma yarı ömrü 1-4 saattir. Parasetamol başlıca karaciğerde metabolize edilir. Burada sülfat ve glukuronid ile konjuge olarak inaktif bileşiklere çevrilir ve sonra böbreklerden atılır. İdrarla parasetamolün %1-3' ü değişmemiş olarak atılır. %80' i ise glukuronid veya sülfat bileşikleri olarak atılır [9]. Asetaminofen (parasetamol) siklooksijenaz enziminin hem COX-1 hem de COX-2 izoformlarını inhibe eder ancak periferik dokulardaki siklooksijenaz enzimini inhibe edemediği için antienflamatuar etkisi yoktur [2-6].

Antipretik etkisini hipotalamusta bulunan sıcaklık düzenleme merkezinde endojen pirojenlerin etkilerini bloke ederek gösterir. Hastanın yüksek vücut sıcaklığı ilacın yaptığı damar genişlemesi, periferik kan akımındaki artış ve terlemeye bağlı olarak düşer [2].

2.1.3. Analiz Yöntemleri

2.1.3.1. HPLC-UV Yöntemi ile Analizleri

Rafael R. Cunha ve ark. [14] parasetamol, kafein ve ibuprofenin farmasötik formülasyonlarda eş zamanlı olarak birbiri yanında yüksek performanslı sıvı kromatografisi UV dedeksiyonu ve kapiler elektroforez ile iletkenlik tespiti yapmıştır. Bu çalışmada yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle birlikte fotodiyot serili dedektör kullanılmıştır. C₁₈ kolon (250×4.6 mm, 2.5 µm). Mobil faz; 20-100% asetonitril ve pH 7.00, 40 mmol/L fosfat tamponu. Analiz süresi 9.6 dakika ve dedeksiyon limitleri sırasıyla 0.7 µmol/L, 4.4 µmol/L, 3.4 µmol/L olarak bulunmuştur.

Nouruddin W. Ali ve ark. [15] N-bütil bromit ve parasetamolün ikili karışımlarının ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle eş zamanlı tayinini gerçekleştirmişlerdir. Sabit faz olarak C₁₈ (250×4.6 mm, 2.5 µm) kolon ve hareketli faz olarak CF₃COOH ile pH 3.9' a ayarlanmış hacimce (50:50) (H₂O:Metanol) kullanılmış, akış hızı 1.0 mL/dak ve dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Marcello Locatelli [16] parasetamol ve eperisone HCl' nin yüksek performanslı sıvı kromatografisi fotodiyot serili (PDA) dedektör ile fare plazmasında eş zamanlı tayinini yapmışlardır. İç standart olarak ciprofloksasin, sabit faz olarak C₁₈ kolon

(250×4.6 mm, 2.5 µm), hareketli faz pH 3.00 10 mM amonyum asetat tamponu, metanol ve asetonitril kullanılmıştır. Akış hızı 1.2 mL/dak ve analiz süresi 15 dakika olarak bulunmuştur. Bu gradient metodun kalibrasyon konsantrasyonları 5-25 µg/mL olarak seçilmiştir.

A.P.Dewani ve ark. [17] parasetamol, fenilefrin HCl, kafein, setirizin ve nimelusidin RP-HPLC ile eş zamanlı tayini için yeni bir yöntem geliştirilmesi başlıklı gradient çalışmayı yapmışlardır. Sabit faz olarak C₁₈ kolon (250×4.6 mm, 2.5 µm), hareketli faz olarak pH 3.3 10 mM fosfat tamponu ve asetonitril kullanmıştır.

Dinç Ş. ve ark. [18] 'allobarbitol, adifenin HCl ve parasetamolün fitillerde eş zamanlı tayini için kromatografik ve kemometri destekli spektrofotometrik metod' adlı çalışmada sabit faz olarak 5µm partikül boyutlu inertsil ODS-3V C₁₈ (300mm x 3.9mm) kolon ve hareketli faz olarak hacimce (40:60) (ACN:0.025M sodyum asetat) kullanılmış, dalga boyu olarak 195 nm seçilmiş, akış hızı ise 1.0 mL/dak olarak belirlemiştir.

Eva Kalmar ve ark. [19] parasetamol, asetil salisilik asit ve papaverinin eş zamanlı nicel analizi için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu gradient çalışmada sabit faz olarak zorbox SB-C₁₈ (150mm x 4.6 mm, 3.5 µm) kolon ve hareketli faz olarak pH3.4' e ayarlanmış 25 mM fosfat tamponu ve asetonitril karışımının oranı (93:7)(v/v)-(75:25)(v/v) olarak belirlenmiş. Akış hızı 1.5mL/dak, analiz süresi 10 dakikadır. Dalga boyu 240 nm'dir. Doğrusallık konsantrasyonları parasetamol için 0.02-0.04mg/mL, asetilsalisilik asit için 0.03-0.065 mg/mL, papaverine için 0.006-0.013 mg/mL bulunmuştur.

V.K. Redasani ve ark. [20] klorfeniramin maleat, fenilefrin HCl, parasetamol ve kafeinin ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile eş zamanlı tayinini yapmışlardır. Bu çalışmada sabit faz inertsil ODS C₁₈ kolon ve hareketli faz olarak (93:7) 0.05M disodyum hidrojen fosfat tamponu ve asetonitril kullanılmıştır. Hareketli faz akış hızı 1.5mL/dak ve dedeksiyon dalga boyu 215 nm'dir. Korelasyon katsayısı sırasıyla 0.999, 0.998, 0.999, 0.999 olarak bulunmuştur. Tabletlerdeki analizlerin standart sapması ise %2' nin altında bulunmuştur.

K. Karunakaran [21] parasetamol ve lornoksikamın dozaj formları için valide edilmiş RP-HPLC yöntemi geliştirmiştir. Bu çalışmada; sabit faz olarak C₁₈ kolon, hareketli faz olarak (35:65)(v/v) ACN:0.02M potasyum dihidrojen fosfat kullanılmıştır.

Akış hızı 1.0 mL/dak ve dedeksiyon dalga boyu 260 nm'dir. Doğrusallık konsantrasyonları parasetamol için 125-375 µg/mL ve lornoksikam için 2-6 µg/mL bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla parasetamol için 0.238-0.665 µg/mL, lornoksikam için 0.192-0.480 µg/mL bulunmuştur.

Sani Audu Ali [22] Maiuduguri' de piyasada olan farklı markalardaki parasetamol 500mg tabletler için UV spektrofotometre ve HPLC ile analiz yöntemi geliştirmiştir. Bu çalışmada tabletler 0.1M NaOH ve distile su kullanılarak farklı dalga boylarında absorbans ölçümü yapılmış ve HPLC metodu için dalga boyu 257 nm bulunmuştur. Hareketli faz ise hacimce (20:80) (MeOH:H₂O) karışımıdır.

M.L.Altun [23] parasetamol, kafein ve dipironun analizi için HPLC yöntemi geliştirmiştir. Bu çalışmada izokratik akış kullanılarak hareketli faz karışım oranı hacimce (420:20:30:30) (0.01M KH₂PO₄:metanol:asetonitril:isopropil alkol) olarak belirlenmiştir. İzokratik akış hızı 1.0 mL/dak ve dedeksiyon dalga boyu 215 nm ve analiz süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir. Doğrusallık aralığı sırasıyla parasetamol için 0,409-400 µg/mL, kafein için 0.151 µg/mL, dipiron için 0.233-600 µg/mL bulunmuştur.

2.1.3.2. LC-MS/MS Yöntemi ile Analizleri

Qiongfeng Liao ve ark. [24] parasetamol, psödoefedrin ve klorfeniraminin insan plazmasında LC-MS/MS ile eş zamanlı tayini ve farmakokinetik çalışmasını yapmışlardır. Bu çalışmada sabit faz olarak aquasil C₁₈ (150mm x 2.1mm, 5µm) kolon ve hareketli faz olarak sırasıyla metanol, asetonitril, %1'lik formik asit (60:20:20)(v/v/v) ve akış hızı 0.3 mL/dak, analiz süresi 2.5 dakika olarak belirlenmiştir. Doğrusallık konsantrasyonları parasetamol için 20-10000ng/mL, psödoefedrin için 1-500 ng/mL, klorfeniramin için, 1-50 ng/mL olarak bulunmuştur.

Hao Zou ve ark. [25] parasetamol, psödoefedrin ve klorfeniraminin köpek plazmasında LC-MS/MS ile eş zamanlı tayinini yapmışlardır. Bu çalışmada sabit faz olarak Agilent zorbax SB-C₁₈ (100mm x 2.1mm, 3.5µm) kolon seçilmiştir. Hareketli faz olarak metanol, %0.1'lik formik asit (60:40)(v/v) kullanılmıştır. Akış hızı 0.2 mL/dak olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi doğrusallık konsantrasyonları parasetamol için 10-10000 ng/mL, psödoefedrin için 2-2000 ng/mL, klorfeniramin için 0.2-200 ng/mL

olarak bulunmuştur. LOQ değerleri ise; parasetamol için 10 ng/mL, psödoefedrin için 2.0 ng/mL, klorfeniramin için, 0.2 ng/mL olarak ölçülmüştür.

2.1.3.3. LC-ESI/MS Yöntemi ile Analizleri

Anna Wang ve ark. [26] parasetamol ve kafeinin insan plazmasında eş zamanlı olarak LC-ESI/MS ile tayinini yapmışlardır. Bu çalışmada sabit faz olarak C₁₈ (150 x 4.6mm, 5µm) kolon ve hareketli faz olarak %0.2' lik formik asit, metanol (60:40)(v/v) kullanılmıştır. Analiz süresi 4.5 dakika ve doğrusallık konsantrasyonları parasetamol için 0.05-25 µg/mL, kafein için 10-5000 ng/mL, LOQ değerleri de sırasıyla 0.05 µg/mL, 10 ng/mL olarak bulunmuştur.

2.1.3.4. Spektrofotometrik Yöntemler ile Analizleri

Vu Dang Hoang ve ark. [27] parasetamolün ve ibuprofenin kombine preparatlarda UV spektrofotometre ile eş zamanlı analizini yapmışlardır. Bu çalışmada çözücü olarak pH 7.2 fosfat tamponu kullanılmış ve dalga boyu aralığı 200-325 nm' de çalışılmıştır. Hesaplamalar sonucu kalibrasyon eğrisi doğrusallık aralığı ibuprofen için 12-32 mg/L ve parasetamol için 20-40 mg/L olarak bulunmuştur.

2.1.3.5. Diğer Yöntemler ile Analizleri

H. Khan ve ark. [28] tabletlerde eş zamanlı olarak parasetamol, aseklofenak ve bunların bozunma ürünleri için valide edilmiş UPLC/Q-TOF metodu geliştirmişlerdir. Bu çalışmada kromatografik ayırma için sabit faz olarak UPLC BEH C₁₈ (100 x 2.1mm, 1.7µm) kolon ve izokratik hareketli faz olarak asetronitril-2mM amonyum asetat (40:60)(v/v) kullanılmıştır. Hareketli faz akış hızı ise 0.25 mL/dak, analiz süresi 2 dakika olarak belirlenmiştir. Q-TOF kütle dedektörü kullanılarak analizler yapılmış, geliştirilen metod ICH kılavuzuna uygun olarak valide edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi doğrusallık aralığı parasetamol ve aseklofenak için 1-1000 ng/mL, bozunma ürünü olan diklofenak için 0.01-1 ng/mL, para-aminofenol için 0.01-5 ng/mL olarak bulunmuştur.

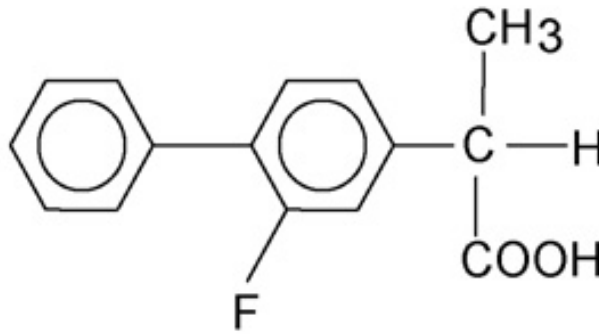
X. Lima [29] farmasötik preparatlarda eş zamanlı olarak parasetamol ve ibuprofenin bor kaplı elmas elektrot kullanılarak diferansiyel puls voltammetrisi ile

analizini gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada kalibrasyon eğrisi doğrusallık aralığı 20-400 $\mu\text{mol/L}$, parasetamol için en düşük dedeksiyon limiti 7.1 $\mu\text{mol/L}$ ve ibuprofen için 3.8 $\mu\text{mol/L}$ olarak saptanmıştır.

A. P. P. Eisele ve ark. [30] katodik ön işleme tabi bor katkılı elmas elektrot ile farmasötik formülasyonlarda parasetamol, kafein ve orfenadrinin eş zamanlı olarak kare dalga voltammetrisi ile analizini yapmışlardır. Bu çalışmada LOD değerleri sırasıyla 2.3×10^{-7} M, 9.6×10^{-8} M ve 8.4×10^{-8} M olarak bulunmuştur.

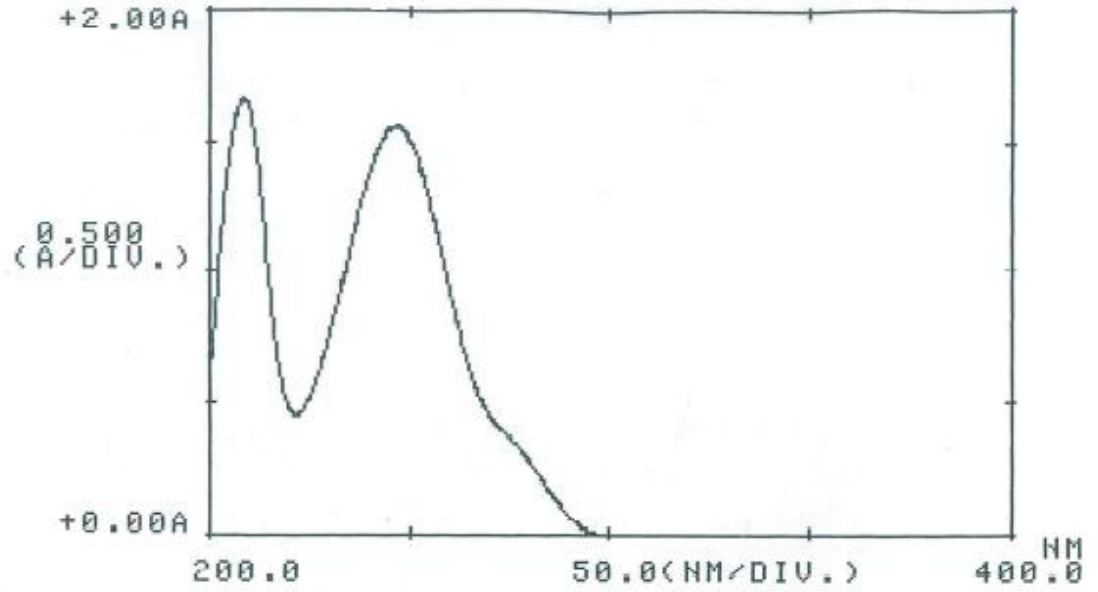
2.2. Flurbiprofen

2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-3: Flurbiprofenin Molekül Yapısı

Flurbiprofen (+/- 2-(2-fluoro-4-bifenil)-propiyonik asit) propiyonik asit grubu nonsteroidal antienflamatuvar bir ilaç (NSAİİ)'tir [12]. Molekül formülü $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FO}_2$ ve molekül ağırlığı 244.261 g/mol'dür [13]. Erime noktası 117 °C ve kaynama noktası 376 °C, yoğunluğu 1.279 g/cm³ (25 °C), pKa: 4.42' dir. Beyaz kristal toz şeklindedir. Çoğu organik çözücünde rahatlıkla çözünür, suda çözünürlüğü çok azdır ancak sulu alkali hidroksit ve karbonatlı çözeltilerde iyi çözünür [31].



Şekil 2-4: Flurbiprofenin 10 µg/mL konsantrasyonda asetonitrilde 200-400 nm aralığında alınmış UV spektrumu

2.2.2. Farmakolojik Özellikleri

Flurbiprofen propiyonik asit grubu nonsteroidal antienflamatuvar bir ilaçtır(NSAİİ). Analjezik, antipiretik ve antienflamatuvar etki gösterir. Oral yoldan ağrı, romatoid ve osteoartrit ile ilişkili enflamasyona karşı kullanılır. Dismenoreya karşı da etkili bulunmuştur. Dental implantların çevresindeki kemik dokusunu koruma da yararlı olabileceği bildirilmiştir. Yarı ömrü ketoprofen ve fenoprofen'e göre daha uzun olduğu için günde iki kez alınarak kullanılır. Sodyum tuzu sterik oftalmik çözeltisi halinde oftalmik cerrahi girişimler sırasında meydana gelen miyozisi önlemede, ameliyat sonrası ve lazer trabeküloplastisi sonucu anterior segmentte meydana gelen enflamasyonunun tedavisinde kullanılan güvenli bir analjeziktir [2-7]. Flurbiprofen siklooksijenaz enzimini reversible yani geri dönüşümlü olarak inhibe ederek periferde enflamasyondan sorumlu tutulan prostaglandin sentezini engeller. Bu sayede parasetamolün etkili olamadığı hususlarda antienflamatuvar özellik gösterir. Flurbiprofen ve diğer NSAİİ' ler gastrik prostaglandinlerin sentezini inhibe etmelerine

bağlı olarak gastrik veya intestinal ülserlerin ortaya çıkmasına neden olabilirler. Son çalışmalarda flurbiprofenin peridontal cerrahi, ayak cerrahisi ve histeraktomi gibi operasyonlardan sonra, ağrı yönetiminde etkili sonuçlar verdiği gösterilmiştir [31-32].

Flurbiprofen oral ve göze topikal olarak uygulanır. Oral yoldan verilmeye özel tabletleri vardır. Oral yoldan alındığında hızlı ve tama yakın absorbe olur. Doruk plazma konsantrasyonlarına alınmasından yaklaşık 1.5 saat (0.5-4saat arası) sonra ulaşır. Besinlerle birlikte verilmesi absorpsiyon hızını etkiler fakat, absorpsiyon kapsamını değiştirmez. Plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık %99' dur. Flurbiprofen eritrositlere de bağlanabilir. Başta karaciğer olmak üzere yoğun bir şekilde metabolize edilir. Metabolitlerinden üç tanesi ana metabolit, geri kalanları ise minör metabolitler şeklindedir. Ana metabolitlerinden ikisi hidroksilasyon, üçüncüsü ise hidroksilasyon ve metilasyonla meydana gelir. Ana metaboliti 4'-hidroksi flurbiprofen zayıf prostanlandin inhibitörü olarak aktive gösterir. Flurbiprofen oral yoldan tek doz halinde verildiğinde verilen dozun %95 kadarı 24 saat içinde idrardan atılıma uğrar. İdrarda; %20-25 değişmemiş ilaç, %40-45 4'-hidroksi flurbiprofen, %5 3',4'-dihidroksi flurbiprofen ve %20-30 kadar da 3'-hidroksi-4'-metoksi flurbiprofen şeklinde bulunur. Ana ilaç ve metabolitleri idrarla esas olarak glukuronit sülfat konjugantları halinde atılırlar. Flurbiprofenin eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 5.7 saattir.

2.2.3. Analiz Yöntemleri

2.2.3.1. HPLC-UV Yöntemi ile Analiz Yöntemleri

Khan ve ark. [33] gatifloksasin ve flurbiprofenin ikili kombinasyonlarının eş zamanlı tayini için ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi metodu geliştirmişlerdir. Bu çalışmada sabit faz olarak BDS Hypersil C₈ (250 x 4.6mm, 5µm) kolon, hareketli faz olarak pH 3.00 20 mM fosfat tamponu ve metanol (30:70)(v/v) kullanılmıştır. Dedeksiyon dalga boyu 254 nm ve akış hızı 1.5 mL/dak olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi lineer konsantrasyon aralığı gatifloksasin için 15-105 µg/mL, flurbiprofen için 1.5-10.5µg/mL bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri ise; gatifloksasin için sırasıyla 0.03 µg/mL - 0.09 µg/mL ve flurbiprofen için 0.09 µg/mL - 0.031 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

M. Akhlaq ve ark. [34] HPLC metoduyla flurbiprofenin belirlenmesi için pratik ve basit bir yöntem bulmuşlardır. Bu izokratik çalışmada sabit faz olarak Gemini C₁₈ (250 x 4.6mm, 5µm) kolon, hareketli faz olarak pH 7.00 30mM sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi ve asetonitril (50:50)(v/v) kullanılmıştır. Dedeksiyon dalga boyu 247 nm ve akış hızı 1.0 mL/dak olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi lineer konsantrasyon aralığı flurbiprofen için 5-50 µg/mL bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri ise; sırasıyla 0.173 µg/mL - 0.578 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

N. A. Charoo ve ark.[35] sıçanlarda transdermal olarak uygulanmış ve eksize edilmiş deri örneklerinde flurbiprofenin belirlenmesi için basit ve seçici bir yöntem bulmuşlardır. Bu izokratik çalışmada iç standart olarak ibuprofen, sabit faz olarak CLC-ODS C₁₈ (50 x 4.6mm, 5µm) kolon, hareketli faz olarak %1' lik fosforik asit çözeltisi ve metanol (20:80)(v/v) kullanılmıştır. Dedeksiyon dalga boyu flurbiprofen için 220 nm, ibuprofen için 254 nm ve akış hızı 0.5 mL/dak olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi lineer konsantrasyon aralığı flurbiprofen için 0.1-10µg/mL bulunmuştur. LOQ değerleri ise; 0.10 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

C. Sajeev ve ark. [36] farmasötik formülasyonlarda flurbiprofenin UV-spektrofotometri ve HPLC ile belirlemişlerdir. Bu çalışmanın spektrometri ile yapılan bölümünde 10 mg flurbiprofenin 100 mL fosfat tamponunda ((pH 6.4; 0.1M NaH₂PO₄·H₂O-0.1M Na₂HPO₄·7H₂O (73.5:26.5)(v/v)) çözeltisi hazırlanmıştır. Dedeksiyon dalga boyu 248 nm olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi lineer konsantrasyon aralığı 1-20µg/mL olarak bulunmuştur. HPLC ile yapılan analizde ise sabit faz olarak LiChroCART prosper C₁₈ (125 x 4.6mm, 5µm) kolon, hareketli faz ise pH 5.6 olarak ayarlanmış metanol, asetonitril, fosfat tamponu (60:20:20)(v/v) kullanılmıştır. Dedeksiyon dalga boyu flurbiprofen için 248 nm ve akış hızı 0.75 mL/dak olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi lineer konsantrasyon aralığı flurbiprofen için 50-1000 ng/mL bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri ise; 15 ng/mL - 50 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

X.W. Teng ve ark. [37] sıçan plazmasında HPLC yöntemi ile flurbiprofenin enantiyomerlerini belirlemişlerdir. Bu izokratik çalışmada iç standart olarak S-naproksen, sabit faz olarak Chiralpak AD-RH (150 x 4.6mm, 5µm) kolon, hareketli faz olarak asetonitril, saf su ve fosforik asit (40:60:0.05)(v/v/v) kullanılmıştır. Dedeksiyon dalga boyu 247 nm ve akış hızı 1.0 mL/dak olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi

lineer konsantrasyon aralığı flurbiprofen için 0.05-50 µg/mL bulunmuştur. LOQ değerleri ise; S-flurbiprofen ve R-flurbiprofen için 0.05 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Y.X. Jin ve ark. [38] insan plazmasında proteinlere bağlanan flurbiprofen, ketoprofen ve etodolak enantiyomerlerini kolon öncesi türevlendirme yaparak RP-HPLC' de analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada sabit faz olarak Agilent Zorbax C₁₈ (250 x 4.6mm, 5µm) kolon, flurbiprofen enantiyomerlerinin analizi için hareketli faz olarak pH 4.50 0.01 M fosfat tamponu ve asetonitril (30:70)(v/v), ketoprofen enantiyomerlerinin analizleri için; pH 4.50 0.01 M fosfat tamponu ve asetonitril (40:60)(v/v), etodolak analizleri için, pH 4.50 0.01 M potasyum dihidrojen fosfat tamponu ve metanol (12:88)(v/v) kullanılmıştır. Dedeksiyon dalga boyu flurbiprofen ve ketoprofen enantiyomerleri için 250 nm, etodolak enantiyomerleri için 278 nm ve akış hızı 0.8 mL/dak olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi lineer konsantrasyon aralığı tüm enantiyomerler için 0.5-50 µg/mL bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri ise; tüm enantiyomerler için sırasıyla 0.15 µg/mL - 0.5 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

G. Giagoudakis ve S.L. Markantonis [39] plazmada diklofenak ve flurbiprofenin tayini için alternatif bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada sabit faz olarak Spherisorb C₁₈ (250 x 4.6mm, 5µm) kolon, hareketli faz karışım olarak glasiyel asetik asit ile pH 6.30' a ayarlanmış 0.1M sodyum asetat ve asetonitril (65:35)(v/v) kullanılmıştır. Dedeksiyon dalga boyu 278 nm ve akış hızı 1.0mL/dak olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi lineer konsantrasyon aralığı diklofenak için 20-5000 ng/mL, flurbiprofen için 100-40000 ng/mL olarak bulunmuştur. LOQ değerleri ise; diklofenak için 20 ng/mL, flurbiprofen için 100 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

2.2.3.2. LC-MS/MS Yöntemi ile Analizleri

C. Mei ve ark. [40] biyoeşdeğerlik çalışmasında uygulanan; LC-MS/MS ile flurbiprofenin insan plazmasında miktar tayinini yapmışlardır. Bu gradient çalışmada iç standart olarak indometasin, sabit faz olarak Ultimate C₁₈ (50 x 2.1mm, 5µm) kolon, birinci hareketli faz(A) olarak ultra saf su-formik asit (99.9:0.1)(v/v), ikinci hareketli faz(B) olarak asetonitril-formik asit (99.9:0.1)(v/v) kullanılmıştır. Bu hareketli A ve B fazlarının 0.1' inci dakikada karışımı (A:B)(60:40)(v/v), 0.5' inci dakikada (15:85)(v/v),

0.5' inci dakikadan 0.9' uncu dakikada (5:95)(v/v), 1.9' uncu dakikadan sonra (5:95)(v/v)' lık karışım tekrar (A:B)(60:40)(v/v) olarak ayarlanmıştır. Analiz süresi 2.5 dakikadır. Kütle dedeksiyonu için ESI negatif modda yapılmıştır. Hareketli faz akış hızı 0.4 mL/dak olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi lineer konsantrasyon aralığı flurbiprofen için 40-10000 µg/L bulunmuştur. LOQ değeri ise; 40 µg/L olarak bulunmuştur.

H.I. Lee ve ark. [41] HPLC-MS/MS kullanılarak klinik uygulamada insan plazmasından flurbiprofen ve hidroksi metabolitinin eş zamanlı analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada iç standart olarak probenesid, sabit faz olarak RP Luna C₁₈ (50mm x 2.0mm, 5µm) kolon, hareketli faz olarak pH 3.50 10 mM amonyum format tamponu ve metanol (15:85)(v/v) kullanılmıştır. Kütle dedeksiyonu için ESI negatif modda yapılmıştır. Hareketli faz akış hızı 0.25 mL/dak olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi lineer konsantrasyon aralığı flurbiprofen için 0.01-10 µg/mL, bozunma metaboliti olan 4'-hidroksi flurbiprofen için 0.01-1 µg/mL bulunmuştur. LOQ değeri ise; iki analit içinde 100 µL insan plazmasında 0.01 µg/mL olarak bulunmuştur.

2.2.3.3. HPLC Flouresans Yöntemi ile Analizleri

J.M. Hutzler ve ark. [42] insan plazmasında ve idrarında; 4'-hidroksi flurbiprofen ve flurbiprofenin analizi için hassas ve özel bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada sabit faz olarak Brownlee Spheri-5 C₁₈ (100mm x 4.6mm) kolon, hareketli faz pH 3.00 20mM disodyum hidrojen fosfat ve asetonitril (60:40)(v/v) kullanılmıştır. Eksitasyon dalga boyu 260 nm ve emisyon dalga boyu 320 nm olarak ayarlanmıştır. LOQ değerleri ise; idrarda flurbiprofen ve 4'-hidroksi flurbiprofen için 0.5 µg/mL, plazmada ise flurbiprofen için 0.25µg/mL, 4'-hidroksi flurbiprofen için 0.05 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

2.2.3.4. HPTLC Yöntemi ile Analizleri

V.V. Dhavse ve ark. [43] flurbiprofenin plazmada tayini için HPTLC yöntemi. Bu çalışmada sabit faz olarak Camag Linomat Model IV Silika jel 60F 254 HPTLC alüminyum tabakası (tabaka kalınlığı 0.2mm), hareketli faz olarak n-hekzan, etil asetat, glasiyel asetik asit (60:30:10)(v/v/v) kullanılmıştır. Flurbiprofenin densitometrik analizi 247 nm' de gerçekleştirilmiştir. Plazmada kalibrasyon eğrisi lineer konsantrasyon aralığı 40-400 ng, LOQ değeri ise; 40ng olarak hesaplanmıştır.

2.3. Sıvı Kromatografisi

Hareketli fazın sıvı olduğu bu kromatografi türünde; sabit faz bir dolgu maddesi üzerine tutturulmuş sıvı film ise bu kromatografi türüne sıvı-sıvı kromatografisi denir. Hareketli ve sabit fazdaki sıvıların polarlıkları farklı olmalıdır. Genellikle hareketli faz olarak hekzan gibi apolar bir sıvı, dolgu maddesi olarak etilen glikol gibi polar bir sıvı kullanılır (Normal faz kromatografisi). Bunun tersi özellikte sıvılar kullanılırsa (Sabit faz apolar, hareketli faz polar) buna ters faz sıvı-sıvı kromatografisi denir [46].

2.3.1. Sıvı Kromatografisi Sistemleri

Laboratuvarlarda kullanılan birçok farklı model sıvı kromatografi sistemi mevcuttur. Bu kısımda yüksek performanslı sıvı kromatografisinin genel yapısı verilecektir.

2.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

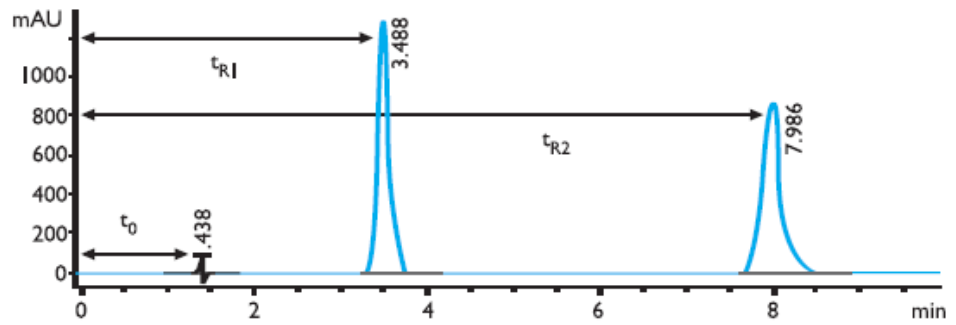
HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi kısaca HPLC olarak adlandırılır.

HPLC analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Yaygın kullanıma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. En önemlisi ise sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu tip bileşiklere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, ilaçlar ve pestisitler verilebilir. HPLC ünitesi: Degasser, pompa, autosampler, kolon ve dedektör olmak üzere dört kısımdan oluşmaktadır. Degasser; mobil fazlarda mevcut çözünmüş gazların giderilmesini sağlar [44].

Yüksek performans; yüksek çözünürlüğü (ayrımı) ifade eder. Mobil fazın yüksek basınçla ilerlemesi sağlandığı için de Yüksek basınçlı Sıvı Kromatografi olarak da adlandırılır [44]. “Yüksek performans” sadece basıncın değil bir çok faktörün birleşmesiyle oluşturulduğundan günümüzde “yüksek performanslı sıvı kromatografi” adlandırılması kullanılmaktadır [45].

Kromatografi tekniğinde türler, kolonda dağılma sabiti (KD) değerlerine bağlı olarak ilerler ve kolonu belli bir sıra ile terk ederler. Kolondan çıkan bileşenlerin derişimlerinin uygun bir yöntemle ölçülerek zaman veya hareketli fazın hacmine karşı çizilen grafiğine kromatogram denir [46]. Şekil 2.5' de iki bileşenli bir numuneye ait bir kromatogram görülmektedir [47].

İki bileşenli bir numunenin HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogram



Şekil 2-5: İki bileşenli bir numuneye ait kromatogram

Şekil 2.5’de görülen t_0 değeri, hareketli fazın enjeksiyon kısmından başlayıp detektöre ulaşması için geçen zaman yani kolonda hiç tutulmayan bir türe ait alıkonma zamanıdır. t_{R1} ve t_{R2} ise sırasıyla kolondan ilk çıkan ve ikinci çıkan türlere ait alıkonma zamanlarıdır. Alıkonma zamanı; analitlerin türü, sabit fazın türü, hareketli fazın türü, akış hızı ve kolon uzunluğu faktörlerine bağlı olarak değişebilir. Kolonda ilerleyen bileşenlerin göç hızlarıyla ilgili olarak kromatografide sıkça kullanılan bir parametre alıkonma veya kapasite faktörüdür. Alıkonma faktörü, k' ile gösterilir ve Eşitlik 2.1’de verildiği gibi bulunur [47].

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.1)$$

Alıkonma faktörünün 2'den küçük olmaması istenir.

Bir kolonun ayırıcılığı ya da ayırma gücü, kolonun bir numunede bulunan türleri birbirinden ne kadar ayırabildiğinin nicel bir ölçüsüdür. Ayırma gücü (rezolüsyon) R_s ile gösterilir ve aşağıda verilen eşitlik 2.2' den bulunabilir. Bu eşitlikteki 'w' değeri her bir pikin ayrı ayrı taban genişliklerinin ölçüsüdür.

$$R_s = 2x \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_1 + w_2)} \quad (2.2)$$

R_s değerinin 1'den büyük olması istenir ve iyi bir ayırıcılık göstergesidir.

Laboratuvarda kullanılan bir HPLC sistemi Şekil 2.6' da verilmiştir.



Şekil 2-6: HPLC sistemi

2.3.3. Autosampler (Otomatik Örnekleyici)

Örnekleyici Analitlerin (Numunelerin) kolon ve detektöre gönderilmesini sağlar. Örnekleyici temel olarak iki tiptedir; Manuel (El tipi) ve Oto örnekleyici (Otomatik) modeller. Manuel örnekleyicilerde numune bir şırıngaya çekilip valf yardımıyla sisteme gönderilir. Oto örnekleyicilerde ise bu işlemleri cihaz kendisi yapabilmektedir. Bazı ünitelerde soğutma, ısıtma, seyreltme ve karıştırma özellikleri vardır. 10 vialden 1000 vial kadar değişik kapasitede olanları bulunabilir. Oto örnekleyiciye numune verirken en önemli konu numunenin temiz olmasıdır, aksi halde sistem çabuk kirlenir veya tıkanır. Numuneleri cihaza göndermeden önce muhakkak şırınga filtresinden veya kartuştan geçirmek gerekir, numunenin mümkün olduğunca berrak ve renksiz olması tercih edilir [44].

2.3.3.1. Mobil (Hareketli) Faz

Analiti (Analiz edilen maddeler) taşıyan mobil fazdır. Mobil faz genellikle su ve sulu tampon çözeltiler, bunların metanol ve/veya asetonitril ile oluşturulan çözeltileri veya organik solventlerden oluşur. Mobil fazın bileşimi ve pH değeri; ayırmı doğrudan etkiler, kullanılan tekniğe, numune tipi ve kolona göre mobil faz seçilmelidir [44].

2.3.4. Pompa

Temel olarak pompa mobil fazın yüksek basınçla HPLC sistemi içinde hareket etmesini sağlar, degazörden mobil fazı çekip, örnekleme ve kolon ünitesine gönderir, bu işlemi akış hızını ve basınç değerini ayarlayarak gerçekleştirir. Akış hızı aralıklarına göre pompalar Analitik, Analitik-Preparatif ve Preparatif olarak gruplandırılabilir. Analitik pompalar genellikle 0.1 – 5mL akış değerleri arasında kullanılır. Mobil faz adedi ve karıştırma kabiliyetlerine görede İzokratik (Tek Kanallı) , Binary Gradient (Çift Kanallı Mikserli) ve Quaternary Gradient (Dört Kanallı Mikserli-Miksersiz) olarak dizayn edilir. İzokratik çalışmalarda mobil faz önceden karıştırılıp hazırlanır, gradient çalışmalarda karışım değişik zamanlarda değişik oranlarda yapılabilir. Bu sayede analiz kalitesi artırılıp, analiz süreleri azaltılabilir. Pompa ünitesi genellikle iki pistonlu başlık, basınç dengeleyici (damper), işlemci, inlet ve outlet check valflerden oluşur. Günümüzde Nano ve Ultra Basınçlı pompaların kullanılmaya başlamasıyla, HPLC sistemleri UHPLC ve nHPLC gibi isimlendirilmektedir. Uzun süreli kullanım ve tekrarlanabilir sonuçlar için pompa temizliği ve bakımına dikkat edilmelidir [44].

2.3.5. Kolon

Kolon (Sabit Faz) maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar. Kolonlar genellikle fonksiyonel grup eklenmiş silika veya polimer bazlı dolguludur. HPLC kolonlarında en fazla kullanılan dolgu maddesi mikroporöz silikadır. Alumina ve Celite (diatom toprağı) de çok kullanılan maddelerdir. Dolgu maddelerin tanecik büyüklüklerinin 1.5-10 mikrometre aralığında olması istenir. Genellikle çelik, PEEK ve camdan imal edilir, içi belli ölçülerde sabit

fazla doldurulur (Silika veya polimer gibi). Kolon Fırını kolonu saklamak ve sabit sıcaklıkta tutmak için kullanılır[48-49].

2.3.6. Dedektör

En çok kullanılan sıvı kromatografisi dedektörü UV-Görünür bölgede absorbans ölçümüne dayanan türdür. Ya tek dalga boyunda (Hg lambası 250 nm) veya Döteryum (D₂) ışık kaynağından gelen polikromatik ışınları bir monokromatör yardımıyla λ 'a göre ayırarak ölçüm alınır. Daha hızlı spektrofotometrik dedektör olarak fotodiyot dizisi kullanılır. Her bir λ ' da ayrı bir fotodiyotun ışık şiddetini ölçtüğü bu cihazlarda monokromatör örnekle dedektör arasına konur. Bunlarda gözlenebilme sınırı 10^{-10} g/mL'dir. Bunlar ışın absorplayabilen bileşenleri ölçebilirler [46].

Her bir bileşen için alınan detektör cevabı bir kaydedici veya bilgisayar ekranında kromatogram olarak görüntülenir. Kromatografik verilerin toplanması, saklanması ve analizi; bilgisayarlar, integratörler ve diğer veri işlemcileri kullanılarak yapılır [45].

2.4. HPLC Analizlerinin Değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçların değerlendirilebilmesi için yöntemle ilgili performans özelliklerini gösteren sayısal ölçütlerin de belirlenmesi gerekir. Bu amaçla ölçümler en az üç defa tekrarlanmalı, standart sapmalar ve bağıl standart sapmalar (RSD) hesaplanarak yöntemin kesinliği bildirilmelidir. Elde edilen kalibrasyon grafiğine bağlı olarak kalibrasyon duyarlılığı, analitik duyarlılık, teşhis sınırı, tayin sınırı ve çalışma aralığı belirlenmelidir. Ayrıca seçilen yöntemin seçiciliği de bu parametrelerle birlikte tespit edilmelidir.

2.5. Sistem Uygunluk Testi

Amerikan Farmakopesi (USP), bileşik değerlendirmesi üzerine yöntem geçerliliğini içeren özgül rehberler yayınlamıştır. Analitik işlemlerin geçerliliğinin

amacı, bilimsel bütünlük ve uygunluğun sağlanması, gereken amaç için yeterli güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların alınmasıdır [50].

Sistem uygunluk testi genelde tüm analitik sistemin (cihaz, reaktif, kolon ve analist dahil) istenilen uygulamaya uygun olduğundan emin olmak için laboratuvarlar tarafından kullanılır. Sistem uygunluk testinin genel amacı kromatografik uygunluk (örneğin: kuyruklanma faktörünü test ederek, kritik pik çiftlerinin kolon etkinliği ve rezolüsyonunu test ederek) ve istikrarlı sistem performansından (örneğin: test standartlarının tekrar enjeksiyonuyla) emin olmak için kromatografik sonuçları izlemektir.

USP'ye göre sistem uygunluk testleri sıvı kromatografisi metodlarının ayrılmaz bir parçasıdır. Bunlar analizin yapılabilmesi için kromatografik sistemin rezolüsyon ve tekrarlanabilirliğinin yeterli olduğunu doğrulamak için kullanılır. Testler; cihaz, elektronik, analitik işlemler ve analiz edilecek örnekler ayrılmaz bir bütünü oluşturur ve böyle değerlendirilir. Tablo 2.1'de FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri verilmiştir.

Tablo 2-1: FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri

Parametre	Limit
Kapasite Faktörü	$k' > 2$
Enjeksiyon kesinliği	$RSD < \%1$, $n \geq 5$
Rezolüsyon	$R_s > 2$
Kuyruklanma faktörü	$T \leq 2$
Teorik plaka sayısı	$N > 2000$

Enjeksiyon kesinliği, RSD (rölatif standart sapma) olarak ifade edilir ve kromatografik sistemin performansını gösterir.

2.6. Validasyon Parametreleri

ICH kılavuzuna göre miktar tayini için validasyon spesifiklik parametrelerinden, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik), seçicilik, dedeksiyon limiti, doğrusallık parametreleri istenmektedir.

2.6.1. Spesifiklik ve Seçicilik

Yöntemin seçimliliği; analiti örnekte varlığı tespit edilmiş analit ile girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir. Örnek matrisinde bulunması gereken bileşenlerin yanında analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün belirlenebilmesi, analitik yöntemlerin seçimliliğini belirler [50].

2.6.2. Doğrusallık

Analitik seyreltmelerde azalan konsantrasyonlarda dedektör cevabının doğrusal olması araştırılır. Analitin değişen konsantrasyonları ile elde edilen verilerden oluşan eğrinin regresyon analizi yapılır. Korelasyon katsayısı, y(ordinat)-kesim noktası, eğrinin eğimi hesaplanarak eğri denklemi elde edilir. Analitik çalışmalarda minimum 5 noktadan doğrusallık gösterilmeli ve korelasyon katsayısı 0.99' dan büyük olmalıdır.

2.6.3. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Doğruluğu belirlemek için çeşitli yöntemler vardır.

a) Analitin bilinen farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin analizi ile belirlenir.

b) Başka bir belirlenmiş metod ile analiz yapılır.

Analitin düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlardaki 3 örnek analiz edilerek miktar tayini yapılır ve doğruluk hesaplanır.

Kabul edilebilir kriter, doğruluk için nominal değerden $\pm \% 5'$ ten fazla sapmanın olmamasıdır [50].

2.6.4. Kesinlik

Yöntemin kesinliği; herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının belirlenen koşullar altında aynı örneklerin analiz sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir. Analizin en az 3 farklı konsantrasyonunda düşük orta ve yüksek konsantrasyonda 3 örnek analiz edilerek relatif standart sapma (varyasyon sabiti, cv) hesaplanır.

2.6.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Her ikisi de analitik başarımların göstergelerindendir. Tayin sınırı; analitin analitik bir işlemle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyondur. Aletli işlemlerde bilinen en düşük konsantrasyonda analit içeren örnek sonuçlarının kör sonuçlarıyla karşılaştırılmasıyla yani sinyal/gürültü oranı ile belirlenir [50].

Teşhis sınırı (LOD) için; sinyal/gürültü (S/N) oranı 3:1 olarak kabul edilir.

$$LOD = 3 \sigma / S$$

σ : İnterseptin standart sapması

S: Eğim

σ regresyon eğrisinin y kesim noktasının standart sapması cevabın standart sapması olarak kullanılabilir.

Tayin sınırı (LOQ), niceleme sınırı; analitik bir yöntemle analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur.

Tayin sınırı (LOQ): Sinyal/ gürültü oranı; en düşük tayin sınırı için (S/N) oranı 10' dan büyük olmalıdır.

Kalibrasyon eğrisinin eğiminden de hesaplanabilir.

$$LOQ = 10 \times \sigma / S$$

σ : İnterseptin standart sapması

S: Eğim.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' nde 2014-2015 yılları arasında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Validasyon sırasında Tablo 3-1' deki referans standart kullanılmıştır.

Tablo 3-1:Referans standartlar

Standart	Üretici	Kullanım Amacı
Parasetamol	Atabay İlaç	Analit
Flurbiprofen	FDC Limited	Analit

Validasyon çalışması sırasında kullanılan kimyasallar Tablo 3-2' de belirtilmiştir.

Tablo 3-2: Kullanılan Kimyasallar

Kimyasallar	Marka
Asetonitril (HPLC saflığında)	VWR
Sodyum asetat (HPLC saflığında)	Merck
Ortofosforik asit (%85 ağı/ağı) (analitik saflıkta)	Ferak Berlin
Ultra saf su	Elga Purelab Option Q

3.1.2. Çözeltiler

3.1.2.1. Mobil Faz Çözeltisi

Mobil faz çözeltisi olarak 0.1 M sodyum asetat çözeltisi (pH 5.00) ve asetonyitril (40:60, v/v) kullanıldı. Mobil faz süzme sisteminden süzülerek ve ultrasonik banyoda degaze edilerek analize hazır hale getirildi.

0.1M Sodyum asetat (pH 5.00) çözeltisinin hazırlanması;

8.203 gram Sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$) tartılarak 1L ultra saf suda çözüldü. Ortofosforik asit yardımıyla pH:5.00' a ayarlandı.

3.1.2.2. Parasetamol Çözeltileri

Ana Stok çözeltisi:

5 mg parasetamol tartıldıktan sonra 5 mL'lik bir balonjojede asetonyitril ile çözülerek hacmine tamamlandı (1.0 mg/mL, PAR-DS1).

Stok çözeltiden asetonyitril ile 10µg/mL'lik (PAR-DS2) ara stok hazırlandı. Daha sonra 0.1-1.5 µg/mL aralığında standart çözeltiler asetonyitril ile hazırlandı (Tablo 3-3). Kalibrasyon eğrisi standartlarından sonra kalite kontrol örnekleri hazırlandı (Tablo 3-4).

Tablo 3-3: Parasetamol için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	DS Konsantrasyonu ve Hacmi	Final Hacim Metanol
ST1	PAR	0.1	50µL PAR-DS2 (10µg/mL)	5mL
ST2	PAR	0.3	150µL PAR-DS2 (10µg/mL)	5mL
ST3	PAR	0.6	300µL PAR-DS2 (10µg/mL)	5mL
ST4	PAR	0.75	375µL PAR-DS2 (10µg/mL)	5mL
ST5	PAR	1.5	750µL PAR-DS2(10µg/mL)	5mL

Tablo 3-4: Kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	DS Konsantrasyonu ve Hacmi	Final Hacim Metanol
KK1	PAR	0.1	50µL PAR-DS2 (10µg/mL)	5mL
KK2	PAR	0.5	250µL PAR-DS2 (10µg/mL)	5mL
KK3	PAR	1.0	500µL PAR-DS2 (10µg/mL)	5mL
KK4	PAR	1.5	750µL PAR-DS2 (10µg/mL)	5mL

3.1.2.3. Flurbiprofen Çözeltileri

5 mg flurbiprofen tartıldıktan sonra 5 mL’lik bir balonjojede asetonitril ile çözülerek hacmine tamamlandı (1.0 mg/mL, FLU-DS1).

Stok çözeltiden asetonitril ile 10µg/mL’lik (FLU-DS2) ara stok hazırlandı. Daha sonra 0.1-1.5 µg/mL aralığında standart çözeltiler asetonitril ile hazırlandı (Tablo 3-5). Kalibrasyon standartlarından sonra kalite kontrol örnekleri hazırlandı (Tablo 3-6)

Tablo 3-5: Flurbiprofen için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	DS Konsantrasyonu ve Hacmi	Final Hacim Metanol
ST1	FLU	0.1	50µL FLU-DS2 (10µg/mL)	5mL
ST2	FLU	0.2	100µL FLU-DS2 (10µg/mL)	5mL
ST3	FLU	0.4	200µL FLU-DS2 (10µg/mL)	5mL
ST4	FLU	0.75	375µL FLU-DS2 (10µg/mL)	5mL
ST5	FLU	1.5	750µL FLU-DS2 (10µg/mL)	5mL

Tablo 3-6: Kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	DS Konsantrasyonu ve Hacmi	Final Hacim Metanol
KK1	FLU	0.1	50µL FLU -DS2 (10µg/mL)	5mL
KK2	FLU	0.5	250µL FLU -DS2 (10µg/mL)	5mL
KK3	FLU	1.0	500µL FLU -DS2 (10µg/mL)	5mL
KK4	FLU	1.5	750µL FLU -DS2 (10µg/mL)	5mL

3.2. Aletler ve Gereçler

Tablo 3-7' deki parçalardan oluşan Agilent Infinity 1260 Series HPLC-UV sistemi kullanıldı.

Tablo 3-7: Ekipmanlar

HPLC-UV Sistemi	Marka - Model
Pompa	Agilent Infinity 1260 Series
Oto örnekleyici	Agilent Infinity 1260 Series
Dedektör	Agilent Infinity 1260 Series
Kolon Fırını	Agilent Infinity 1260 Series
Analitik Kolon	İntersil ODS, 5 µm, 250 x 4,6 mm, C18
Yazılım	Chem32

Validasyon çalışması sırasında kullanılan destek ekipmanlar Tablo 3-8' de belirtilmiştir.

Tablo 3-8: Destek ekipmanlar

Destek Ekipmanlar	Marka - Model
Spektrofotometre	Shimadzu UV-160A
1 cm'lik kuartz küvetler	QS 1000 10 x10 x 45 mm
Ultra saf su cihazı	Elga Purelab Option Q
Ultrasonik banyo	Elma Ultrasonics LC 30 H
pH metre	Mettler Toledo
Otomatik pipetler	Eppendorf 10-100 µL ve 100-1000 µL
Pipet Uçları	Eppendorf 100 µL ve 1000 µL
Oto örnekleyici Vialleri	Agilent
Vial Kapakları	Agilent
Vorteks	Tetra
Analitik Terazî	Ohaus Explorer
Mobil Faz Filtresi	Millipore, 0.45 µm
PTFE Filtre 0.45 µm	Millipore, 0.45 µm

Validasyon çalışması sırasında kullanılan cam malzemeler (Tablo 3-9)' da belirtilmiştir.

Tablo 3-9: Cam Malzemeler

Cam Malzemeler	Marka
Balon joje 5 mL	Isolab
Balon joje 10 mL	Isolab
Balon joje 50 mL	Isolab
Balon joje 100 mL	Isolab
Balon joje 200 mL	Isolab
Mezür 500mL	Isolab
Mezür 1000mL	Isolab

3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi

- Agilent 1260 serisi HPLC sisteminin bilgisayarı güç düğmesine basılarak açılır.
- HPLC kısımları sırasıyla açılır.
- UV dedektörünün güç düğmesine basılarak açılır ve 1-2 dakika bağlantı sağlanana kadar beklenir.
- Ardından bilgisayarda Chem32 ikonuna basılarak Chem32 yazılımı açılır.
- 3.1.2.1'e uygun olarak hazırlanan mobil faz çözeltisi sistemin A hattına yerleştirilir. B hattına ise asetonitril yerleştirilir.

- f. Kullanılan hatlara purge işlemi yapılır.
- g. Purge işlemi bittikten sonra akış 0,1 mL/dak olarak ayarlanır ve kolon bağlantısına kadar mobil faz geçmesi sağlanır.
- h. Akış kademeli bir şekilde artırılır. Final akış 0.8 mL/dak olacaktır.
- i. Analiz süresi 8 dakikadır.
- j. Kolon sıcaklığı 25°C' dir.
- k. Enjeksiyon hacmi 20 µL'ye ayarlanmıştır.
- l. Dedektör 247 nm' ye ayarlanmıştır.
- m. Hazırlanan metod seçilmiştir.

3.4. Parasetamolün ve Flurbiprofenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-UV) ile Yöntem Geliştirme

3.4.1. Dedektör Dalga Boyu Seçimi

Parasetamol ve flurbiprofenin absorbands yaptığı maksimum dalga boyu Spektrofotometri yöntemiyle parasetamol için 248 nm (Şekil2-2) ve flurbiprofen için 247 nm (Şekil2-4) olarak bulundu.

3.4.2. Mobil Faz Seçimi

Mobil faz seçimi için çeşitli oranlarda ve pH' lerde hazırlanan asetonitril-0.1 M sodyum asetat denemelerinden sonra, 0.1 M sodyum asetat (pH 5.00)-asetonitril (40:60)(v/v) uygun görüldü.

3.4.3. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanan 10 µg/mL konsantrasyonlardaki parasetamol ve flurbiprofen çözeltilerinden; 0.1- 0.3- 0.6- 0.75- 1.5 µg/mL parasetamol ve 0.1- 0.2- 0.4- 0.75- 1.5 µg/mL flurbiprofen ihtiva eden konsantrasyonlardaki karışım çözeltileri 5 ml'lik balon jöjelerde hazırlandı, 20 saniye vortekslendi.

20 µL enjeksiyon yapılarak alanlar hesaplandı. Elde edilen pik alanlarından kalibrasyon eğrisi hazırlandı.

3.5. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

İlaç uygulamaları için Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH, International Conference Harmonization Q2 kılavuza göre validasyon yapıldı [51].

3.5.1. Spesifiklik ve Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla, mobil fazdan, tablet yardımcı maddelerinden gelebilecek bir girişim olup olmadığı incelendi. Bunlara ait kromatogramlar Bölüm 4.2.1.' de gösterilmiştir.

3.5.2. Doğrusallık

Analitik seyreltmelerde azalan konsantrasyonlarda dedektör cevabının doğrusal olması araştırılır. Analitin değişen konsantrasyonları ile elde edilen verilerden oluşan eğrinin regresyon analizi yapılır. Korelasyon katsayısı, y(ordinat)-kesim noktası, eğrinin eğimi hesaplanarak eğri denklemi elde edilir. Analitik çalışmalarda minimum 5 noktadan doğrusallık gösterilmeli ve korelasyon katsayısı 0.99' dan büyük olmalıdır. Bölüm 4.2.2' de gösterilmiştir.

3.5.3. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Analitin farklı konsantrasyonlardaki 3 uygulama serisiyle analiz edilerek miktar tayini yapılır ve doğruluk hesaplanır. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.3' de verilmiştir.

3.5.4. Kesinlik

Yöntemin kesinliği; herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının belirlenen koşullar altında aynı örneklerin analiz sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir. Analizin en az 3 farklı konsantrasyonunda düşük orta ve yüksek konsantrasyonda 3 örnek analiz edilerek relatif standart sapma (varyasyon sabiti, cv) hesaplanarak bölüm 4.2.3' de verildi.

3.5.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Teşhis sınırı analizi yapılan örneğin belirdiği fakat kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimdir. Tayin sınırı ise analizi yapılan örneğin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği doğrusallık sınırları içerisine giren veya doğrusallığın en alt derişimini oluşturan düzeyidir. Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüllere göre hesaplandı. Her ikisi de analitik başarının göstergelerindendir. Hesaplanan değerler Bölüm 4.2.4' de verilmiştir.

$$LOD = 3 \times \sigma / S$$

$$LOQ = 10 \times \sigma / S$$

σ : İnterseptin standart sapması

S: Eğim

3.5.6. Validasyon Serisinin Hazırlanması

Validasyon serisi boş, kalibrasyon eğrisi ve kalite kontrol örnekleri olarak hazırlandı. Boş viallere mobil faz karışımı, kalibrasyon eğrisi için parasetamol ve flurbiprofen çözeltilerinden; sırasıyla 0.1- 0.3- 0.6- 0.75- 1.5 µg/mL parasetamol ve 0.1- 0.2- 0.4- 0.75- 1.5 µg/mL flurbiprofen ihtiva eden konsantrasyonlardaki karışımlar (ST) hazırlandı. Kalite kontrol(KK) örnekleri için 0.1- 0.5- 1.0- 1.5 µg/mL konsantrasyonlarındaki karışımlar seçildi. Validasyon serisi; Boş, Kalibrasyon standartları (ST1-ST5), boş, Kalite kontrol örnekleri (KK1, KK2, KK3, KK4, her birinden 5 örnek), boş ve tekrar kalibrasyon standartları (ST1-ST5) şeklindedir.

3.6. Tabletlerde Parasetamol ve Flurbiprofenin Analizi

3.6.1. Tabletlerin ve Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

Tabletler piyasada bulunmadığı için; İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde basılmıştır.

150 mg parasetamol ve 100 mg flurbiprofen içeren 10 adet tablet ayrı ayrı tartılarak ortalama tablet ağırlığı hesaplandı. Havanda güzelce ezilerek, homojen bir karışım olması sağlandı. Ortalama tablet ağırlığı kadar, 6 farklı tartım bu homojen karışımdan alınarak tartıldı. Bu tartımlar ayrı ayrı 100 mL' lik balon jojelerde asetonitril ile çözündürülerek hacmine tamamlandı. 15 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Bu süre sonunda mavi bantlı süzgeç kağıtlarından süzüldü. Böylece 1,5 mg/mL parasetamol ve 1,0 mg/mL flurbiprofen içeren tablet stok çözeltisi hazırlandı (Stok Çözelti 1). Daha sonra asetonitril ile seyreltme işlemleri gerçekleştirilerek, final konsantrasyonu 600 ng/mL parasetamol ve 400 ng/mL flurbiprofen olan 6 tablet çözeltisi hazırlandı.

3.6.2. Geliştirilen HPLC Yöntemi ile Tabletlerin Analizi

Geliştirilen yönteme ait mobil faz, kolon ve analitik cihaz hazır hale getirilerek 6 farklı enjeksiyon yapıldı. Analiz sonuçları bölüm 4.3' de verilmiştir.

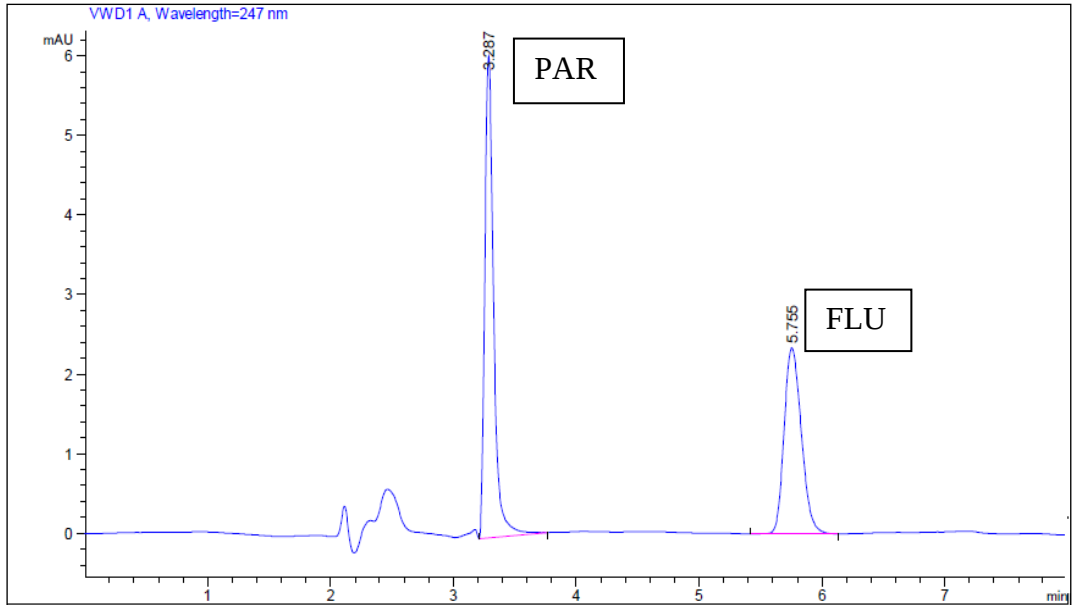
4. BULGULAR

Yöntemin geliştirilmesi amacı ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular ilgili bölümlerde verilmiştir.

4.1. Parasetamolün ve Flurbiprofenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Yanyana Analiz Sonuçları

4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Yapılan denemeler sonucunda en iyi sonuçlar 250 mm uzunluğunda, 4.6 mm iç çapında, 5 µm partikül çaplı C₁₈ kolonda (ODS-Inertsil), 0.1M sodyum asetat (pH:5.00) – asetonitril (40:60)(v/v) çözücü sisteminde, 25°C' de, 0.8 mL/dak akış hızında elde edilmiştir. Çalışma UV dedeksiyonla, 247 nm dalgaboyu kullanılarak yapılmıştır. Bu kromatografik sistemde alıkonma zamanları parasetamol için 3.3 dakika ve flurbiprofen için 5.7 dakikadır (Şekil 4-1).

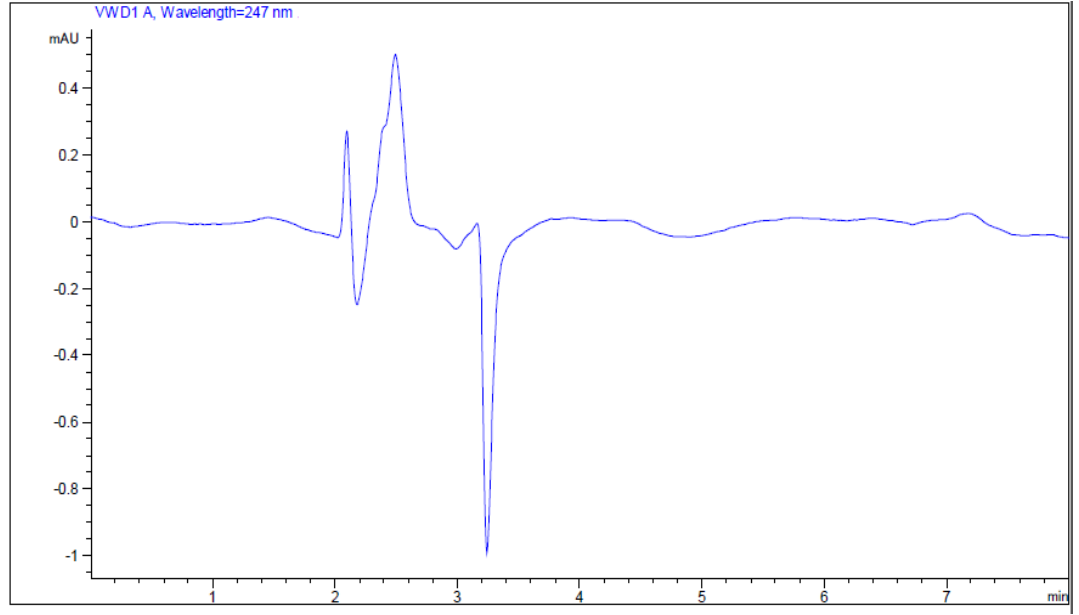


Şekil 4-1: 0.3 µg/mL parasetamol ve 0.2 µg/mL flurbiprofen karışımına ait örnek kromatogram

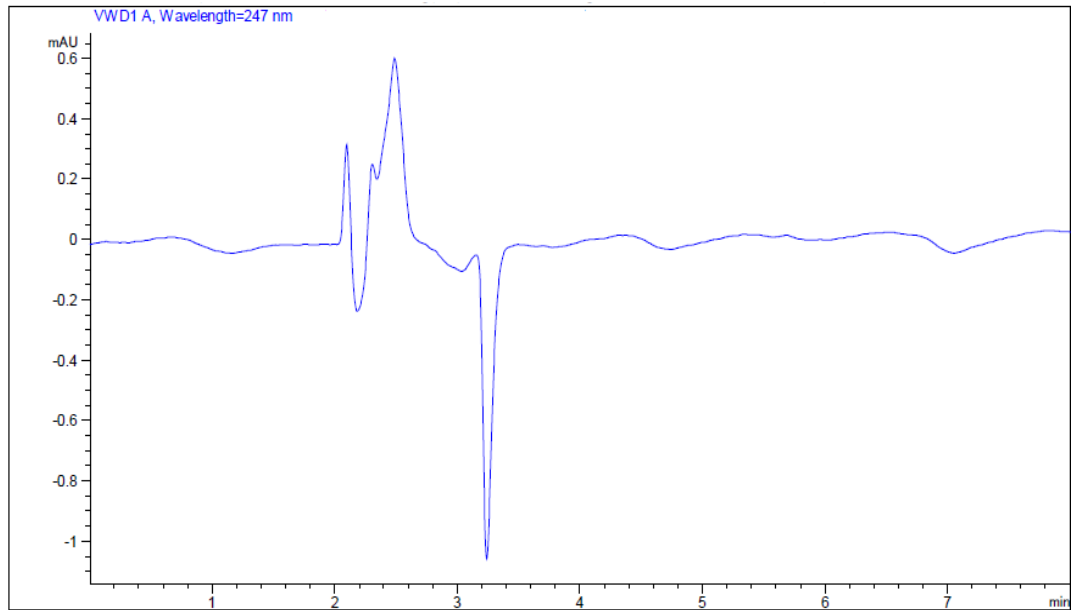
4.2. Yöntem Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin sınanması için; mobil faz enjeksiyonuna ait kromatogram Şekil 4-2' de, plaseboya ait kromatogram ise Şekil 4-3' de verilmiştir. Mobil faz ve plasebo kromatogramlarında analitin alıkonma zamanında herhangi bir girişim yoktur.



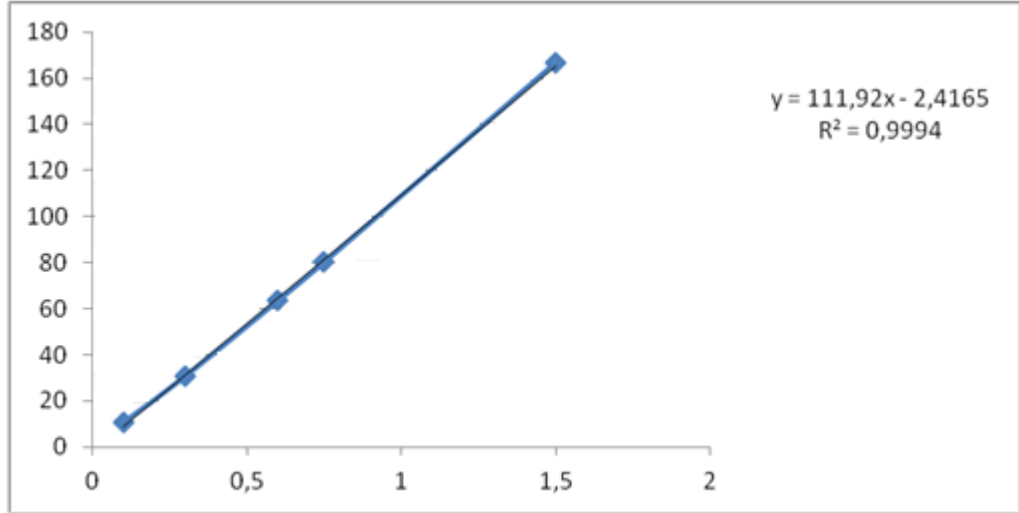
Şekil 4-2: Mobil faz enjeksiyonuna ait bir kromatogram



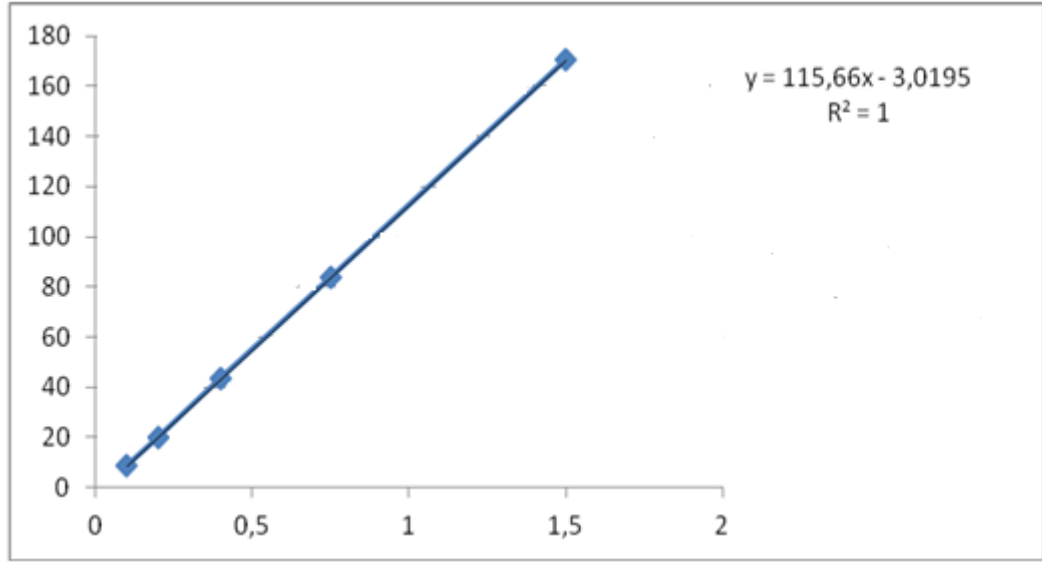
Şekil 4-3: Plasebo çözeltisine ait kromatogram

4.2.2. Doğrusallık

0.1 µg/mL parasetamol - 0.1 µg/mL flurbiprofen, 0.3 µg/mL parasetamol-0.2 µg/mL flurbiprofen, 0.6 µg/mL parasetamol - 0.4 µg/mL flurbiprofen, 0.75 µg/mL parasetamol - 0.75 µg/mL flurbiprofen, 1.5 µg/mL parasetamol - 1.5 µg/mL flurbiprofen olan 5 farklı konsantrasyonda 6'şar örnek hazırlandı ve alana karşı grafiğe geçirildi. Validasyon serilerinde 2'şer adet kalibrasyon standartları hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Elde edilen verilerden çizilen kalibrasyon eğrisi PAR için Şekil 4-4'de ve FLU için Şekil 4-5' de verilmiştir. Kalibrasyon eğrileri korelasyon katsayıları 0.999 mertebesinde kabul edilebilir sınırlardadır. Doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları parasetamol için Tablo 4-1' de, flurbiprofen için Tablo 4-2' de verilmiştir.



Şekil 4-4: Parasetamolün 0.1-1.5 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi



Şekil 4-5: Flurbiprofenin 0.1-1.5 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo 4-1: Parasetamol için validasyon serilerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları

Validasyon Seri No	Korelasyon Katsayısı	Doğru Denklemi
VAL1-1	0,9996	$y=0.110716x-1.04843$
VAL1-2	0,9994	$y=0.110118x-1.58599$
VAL2-1	0,9992	$y=0.111768x-2.02548$
VAL2-2	0,9990	$y=0.110607x-2.60304$
VAL3-1	0,9998	$y=0.112145x-1.50310$
VAL3-2	0,9998	$y=0.111307x-1.02112$

Tablo 4-2: Flurbiprofen için validasyon serilerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları

Validasyon Seri No	Korelasyon Katsayısı	Doğru Denklemi
VAL1-1	1,0000	$y=0.116354x-1.07823$
VAL1-2	0,9999	$y=0.116255x-1.21758$
VAL2-1	0,9998	$y=0.114261x-2.31435$
VAL2-2	0,9998	$y=0.111261x-2.13987$
VAL3-1	0,9997	$y=0.115759x-2.45366$
VAL3-2	0,9998	$y=0.112125x-2,02837$

. Bu altı farklı kalibrasyon eğrisinde aynı konsantrasyonları içeren örneklerin ortalaması alınarak tekrar bir doğru denklemi oluşturuldu. Alan-konsantrasyona karşı çizilen bu grafiğin denklemi parasetamol için;

$y=111,92x-2,4165$ ve korelasyon katsayısı 0,9994 olarak bulunmuştur.

Bu denklem flurbiprofen için ise;

$y=115,66x-3,0195$ ve korelasyon katsayısı 1,0000 olarak bulunmuştur.

4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Yöntem ile elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlığı kontrol edildi. Doğruluk hesabı yapıldı.

Yöntemin kesinliği; herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının belirlenen koşullar altında aynı örneklerin analiz sonuçlarının birbirine yakınlığı kontrol edildi. Parasetamol için yapılan hesaplamalar Tablo 4-3, Tablo 4-5, Tablo 4-7' de ve flurbiprofen için yapılan hesaplamalar Tablo 4-4, Tablo 4-6, Tablo 4-8' de verilmiştir. Bulunan değerlere göre yöntemin doğruluğu ve kesinliği uygun bulunmuştur. Bu değerlerle yöntemin tekrarlanabilir olduğuda görülmektedir.

Tablo 4-3: Bir Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Parasetamolün Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama	%Ort	Alan Ort	Sapma (SD)	%CV	n
KK1	100	106.90	106.94	10.79	0.2430	2.25	5
KK2	500	483.60	96.72	51.35	0.7265	1.41	5
KK3	1000	991.90	99.19	108.77	1.0629	0.97	5
KK4	1500	149.58	99.43	164.10	1.8567	1.13	5

Tablo 4-4: Bir Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Flurbiprofenin Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama	%Ort	Alan Ort	Sapma (SD)	%CV	n
KK1	100	102.29	102.29	11.79	0.5667	4.80	5
KK2	500	504.10	100.82	58.55	2.7338	4.66	5
KK3	1000	996.61	99.66	115.85	2.7212	2.34	5
KK4	1500	1456.48	97.10	169.36	2.1289	1.25	5

Tablo 4-5: İki Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Parasetamolün Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama	%Ort	Alan Ort	Sapma (SD)	%CV	n
KK1	100	112.33	112.33	10.53	0.3276	3.11	5
KK2	500	482.20	96.44	51.87	0.8162	1.57	5
KK3	1000	1005.14	100.51	110.32	1.5874	1.43	5
KK4	1500	1514.61	100.97	167.26	2.2613	1.35	5

Tablo 4-6 İki Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Flurbiprofenin Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama	%Ort	Alan Ort	Sapma (SD)	%CV	n
KK1	100	103.22	103.22	9.48	0.2667	2.81	5
KK2	500	484.80	96.96	53.08	0.4712	0.88	5
KK3	1000	998.95	99.89	109.69	1.4882	1.35	5
KK4	1500	1457.49	97.16	164.22	3.6568	2.22	5

Tablo 4-7: Üç Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Parasetamolün Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama	%Ort	Alan Ort	Sapma (SD)	%CV	n
KK1	100	104.81	104.81	10.65	0.2142	2.01	5
KK2	500	443.20	88.64	48.31	0.4282	0.89	5
KK3	1000	981.31	98.13	108.21	1.3979	1.29	5
KK4	1500	1510.77	100.71	167.14	1.8272	1.09	5

Tablo 4-8: Üç Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Flurbiprofenin Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

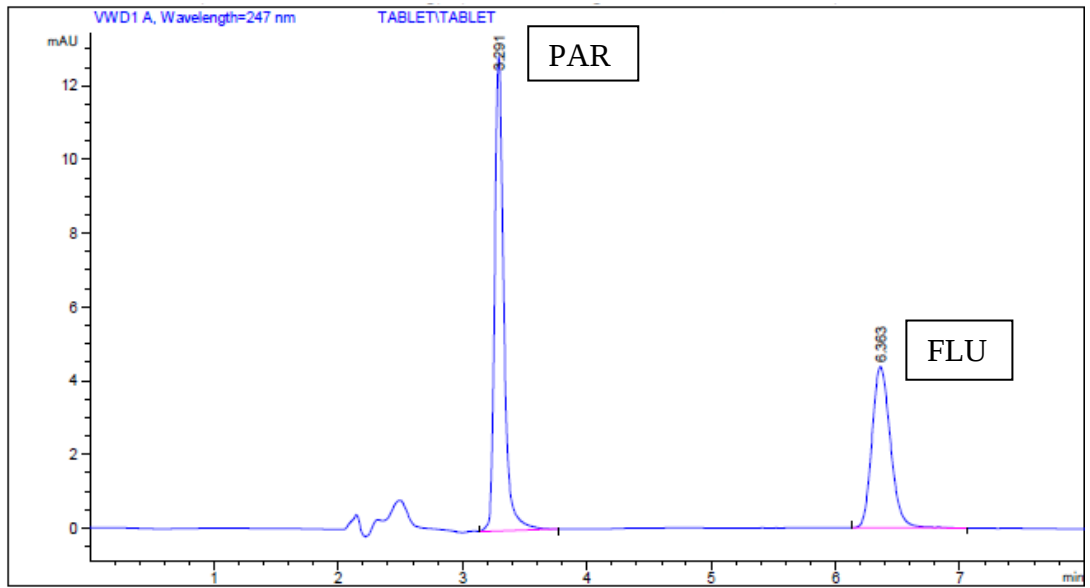
Numune	Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama	%Ort	Alan Ort	Sapma (SD)	%CV	n
KK1	100	106.97	106.97	9.97	0.4844	4.86	5
KK2	500	492.50	98.50	53.19	1.1649	2.18	5
KK3	1000	1013.88	101.38	111.65	1.9946	1.78	5
KK4	1500	1477.77	98.51	163.67	3.6899	2.25	5

4.2.4. Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları

LOD ve LOQ değerleri: Bölüm 3.5.5' de belirtildiği şekilde parasetamol için Tablo 4-1'de ve flurbiprofen için Tablo 4-2'de verilen denklemlerinden hesaplandı. Teşhis (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) ise sırası ile PAR için 16.33 ng/mL ve 54.45 ng/mL; FLU için 15.25 ng/mL ve 50.82 ng/mL olarak bulundu.

4.3. Tabletlerde Parasetamol ve Flurbiprofen Analizi

Parasetamolün tabletten % geri kazanımı; 101.13 ± 0.41 (Tablo 4-9) ve flurbiprofenin tabletten %geri kazanımı; 98.17 ± 0.77 bulunmuştur (Tablo 4-10). Şekil 4-6' da tabletlerdeki analiz sonuçlarına ait bir kromatogram gösterilmektedir.



Şekil 4-6: Tabletteki analizlere ait bir kromatogram

Tablo 4-9: Tabletlerde Parasetamol Analiz Sonuçları

Numune	Konsantrasyon(ng/mL)	Bulunan Konsantrasyon (ng/mL)	%Geri Kazanım
Tartım1	600	608.81	101.4
Tartım2	600	608.96	101.5
Tartım3	600	609.22	101.5
Tartım4	600	606.46	101.1
Tartım5	600	602.91	100.5
Tartım6	600	604.81	100.8

Tablo 4-10: Tabletlerde Flurbiprofen Analiz Sonuçları

Numune	Konsantrasyon(ng/mL)	Bulunan Konsantrasyon (ng/mL)	%Geri Kazanım
Tartım1	400	389.82	97.5
Tartım2	400	388.19	97.1
Tartım3	400	392.44	98.1
Tartım4	400	394.27	98.6
Tartım5	400	396.81	99.2
Tartım6	400	394.04	98.5

5. TARTIŞMA

Analjezik-antipiretik ilaçlardan parasetamol (asetominofen), günlük pratikte güvenli olduğu düşünülen, ağrı ve ateş kontrolünde sık kullanılan ilaçlardır [1]. Oral yoldan alındığında gastrointestinal kanaldan hızla ve tama yakın absorbe olur [2]. Plazmada doruk konsantrasyonlarına 0.17-1.2 saat içinde ulaşır [3]. Orta ve şiddetli postoperatif ağrıda etkin olmakta ve postoperatif opioid tüketiminde azalmayla birlikte analjezi kalitesinde artış sağlamaktadır. Periferik dokularda siklooksijenaz enzimini inhibe edemediği için antiinflamatuvar aktivitesi yoktur [1-4]. NSAİİ kullanımı ile gözlenebilen gastrik irritasyon ve kanamaya neden olmamaktadır [5].

Flurbiprofen propiyonik asit grubu nonsteroidal antienflamatuvar bir ilaçtır (NSAİİ). Flurbiprofen siklooksijenaz enzimini reversible yani geri dönüşümlü olarak inhibe eder [2].

Bu sayede parasetamolün etkili olamadığı hususlarda antienflamatuvar özellik gösterir.

Odontojenik ağrılarda daha iyi rahatlama sağlamak amacıyla NSAİİ' lerin parasetamol ile kombine edilmiş formları kullanılmaktadır [4-5]. Ayrıca parasetamolün ve flurbiprofenin tedaviye sunulmuş ruhsatlı farklı kombinasyonları da mevcuttur.

Buluş sahibi Marvin Berkowitz, başvuru sahibi The Upjohn Company ve yayın numarası EP0109281 A1 olan tablet formunda parasetamol ve flurbiprofen karışımı mevcuttur.

Bu nedenle kombinasyon olarak tedaviye sunulabilecek olan bu iki maddenin yanyana analizi, bu özgün yüksek lisans tezi kapsamında yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılarak tabletlerde analizi için seçici, özgün ve tekrarlanabilir bir yöntem başarıyla geliştirilmiştir.

Parasetamol ve flurbiprofen moleküllerinde $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ geçişini kolaylaştıracak konjuge π bağlarının olması ve elektron verici NH – OH gibi grupların bulunması nedeniyle doğal ve kuvvetli UV absorpsiyon özelliğe sahiptir.

Parasetamolün maksimum absorbans dalga boyu 248 nm (Şekil 2.2), flurbiprofenin maksimum absorbans dalga boyu 247 nm (Şekil 2.4) olarak bulunmuştur.

Polar yapıya sahip bileşiklerdir. C₁₈ apolar kolonda polar mobil faz ile alıkonma sağlanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi parasetamol için; 0.1-1.5 µg/mL ve flurbiprofen için 0.1-1.5 µg/mL konsantrasyonlarında seçilmiştir. Hesaplanan LOD ve LOQ değerleri PAR için; 16.33 ve 54.45 ng/mL, FLU için ise; 15.25 ve 50.82 ng/mL' dir.

Seçilen kalibrasyon konsantrasyonları en yüksek ve en düşük değer alınıp orta konsantrasyon belirlenerek kalite kontrol örnekleri oluşturulmuştur. Validasyon serilerinden elde edilen korelasyon katsayıları 0,999 mertebesinde ve analitik açıdan kabul edilebilir değerlerdir. Kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik değerleri %CV kabul sınırı 5'in altında ve standart sapma 2'nin altındadır. Bu sonuçlarla yöntemin doğruluk ve kesinliği uygun görülmektedir.

Yöntem tabletlere uygulanmıştır. Parasetamolün tabletten % geri kazanımı; %101,13 ± 0.41 ve flurbiprofenin tabletten %geri kazanımı; %98,17 ± 0.77 bulunmuştur. Bulunan geri kazanım değerleri kabul limitleri içindedir.

Literatürlerde bu iki ilaç maddesinin yanyana tayini yoktur. Yapılan bu çalışma parasetamolün ve flurbiprofenin farmasötik preparatlarda yanyana analizi için bir ilk niteliği taşımaktadır.

Geliştirilen ve valide edilen bu yöntemle flurbiprofen ve parasetamolün farmasötik preparatlardan analizi doğru, hassas, seçici ve özgün bir şekilde kolaylıkla yapılabilmektedir. Bu yöntem düşük konsantrasyonlara inebilme açısından biyolojik materyele de uygulanabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Gökceoğlu Uslu A. ve ark. (2013). Analjezik Alımı Sonrası Akut Tübülointerstisyel Nefrit: Dört Olgu Sunumu. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*; **22 (1)**: 106-110
- [2] RxMediaPharma2015 İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı
- [3] *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 95, NO. 1, January 2006
- [4] Bulem Ureyen Kaya, Emre Çiçek, Halil Aşçı.(2013) Endodontide Ağrı ve Analjezik Kullanımı. *S.D.Ü Sağlık Bilimleri Dergisi Cilt 4 / Sayı 1*
- [5] Çınar V.A. ve ark. (2010) İntravenöz Parasetamolün Torakoskopik Cerrahi Sonrası Postoperatif Analjezi Üzerine Etkinliği. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* **36 (2)** 43-48
- [6] Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, yedinci baskı, 2. cilt., Feryal Matbaacılık, Ankara.(1995)
- [7] Mikawa K, Nishina K, Maekawa N, Shiga M, Obara H. (1997). Dose-response of Flurbiprofen on Postoperative Pain and Emesis After Paediatric Strabismus Surgery. *Can J Anaesth*; **44**: 95–8
- [8] Brodie BB, Alexrod J. The fate of acetanilide in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1948,94:29-9
- [9] Dr. ARSLAN Y. (2008). Koroner Arter Baypas Cerrahisi Sonrası Parasetamol, Diklofenak Sodyum ve Tramadolün Postoperatif Analjezide Kullanımı. T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Prof. Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Merkezi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği
- [10] El-Obeid, H.A., ve Al-Badr, A.A., (1985). Acetaminophen. *Analytical profiles of drug substances*, Vol. A4, s. 568
- [11] Roger A. Granberg ve Ake C. Rasmuson (1999). Solubility of Paracetamol in Pure Solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data*, Vol. 44, No. 6,
- [12] Teng X.W. ve ark. (2003) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **33**; 95-100

- [13]Compound Summry for CID 3394. Flurbiprofen. Erişim Tarihi: (06.06.2015)
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3394#section=Top>
- [14] Rafael R. Cunha ve ark.(2015). Simultaneous determination of caffeine, paracetamol and ibuprofen in pharmaceutical formulations by high performance liquid chromatography with UV detection and by capillary electrophoresis with conductivity detection. *J. Sep. Sci.* **38**, 1657–1662
- [15] Nouruddin W. Ali ve ark. (2013) Simultaneous determination of hyoscine N-butyl bromide and paracetamol in their binary mixture by RP-HPLC method. *Arabian Journal of Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.015>
- [16] Marcello Locatelli ve ark.(2015). Simultaneous determination of eperisone hydrochloride andparacetamol in mouse plasma by high performance liquidchromatography-photodiode array detector. *Journal of Chromatography A*, **1388**; 79–86
- [17] Dewani A.P. ve ark.(2015). Development and validation of a novel RP-HPLC method for simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, caffeine, cetirizine and nimesulide in tablet formulation. *Arabian Journal of Chemistry* **8**, 591–598
- [18] Dinç Ş. ve ark.(2014). Chromatographic and Chemometrics-assisted spectrophotometric Methods for the Simultaneous Determination of Allobarbitol, Adiphenine Hydrochloride and Paracetamol in Suppository. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **37**:560–571
- [19] Eva Kalmar ve ark.(2014). Simultaneous Quantification of Paracetamol, Acetylsalicylic Acid and Papaverine with a Validated HPLC Method. *Journal of Chromatographic Science* **52**:1198–1203
- [20] Redasani V.K. ve ark.(2013). Simultaneous Determination of Chlorpheniramine Maleate, Phenylephrine Hydrochloride, Paracetamol and Caffeine in Pharmaceutical Preparation by RP-HPLC. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* **19 (1)** 57–65.
- [21] Karunakaran K. ve ark.(2014). A Validated Stability-Indicating RP-HPLC Method for Paracetamol and Lornoxicam: Application to Pharmaceutical Dosage Forms. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **20 (1)** 109–114.

- [22] Sani Audu Ali ve ark. (2012). Analysis of Different Brands of Paracetamol 500mg Tablets Used in Maiduguri Using Ultraviolet Spectrophotometric and High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) Methods *IRIJ*, 3 (8)
- [23] Altun. M.L. (2002). HPLC Method for the Analysis of Paracetamol, Caffeine and Dipyrone. *Turk J Chem* **26**, 521-528.
- [24] Qiongfeng Liao ve ark.(2008). LC–MS–MS Simultaneous Determination of Paracetamol, Pseudoephedrine and Chlorpheniramine in Human Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study. *Chromatographia* 2008, **67**, May (No. 9/10)
- [25] Hao Zou ve ark.(2008). Simultaneous Quantitation of Paracetamol, Pseudoephedrine and Chlorpheniramine in Dog Plasma by LC-MS-MS. *Chromatographia* 2008, **68**, August (No. 3/4)
- [26] Anna Wang ve ark.(2008). Simultaneous Determination of Paracetamol and Caffeine in Human Plasma by LC–ESI–MS. *Chromatographia* 2008, **67**, February (No. 3/4)
- [27] Vu Dang Hoang ve ark.(2014). UV Spectrophotometric Simultaneous Determination of Paracetamol and Ibuprofen in Combined Tablets by Derivative and Wavelet Transforms. *The Scientific World Journal* Volume 2014, Article ID 313609, 13 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/313609>
- [28] Khan H. ve ark.(2012). Validated UPLC/Q-TOF-MS Method for Simultaneous Determination of Aceclofenac, Paracetamol and Their Degradation Products in Tablets. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **35**:109–128
- [29] Amanda B. Lima ve ark.(2014). Simultaneous Determination of Paracetamol and Ibuprofen in Pharmaceutical Samples by Differential Pulse Voltammetry Using a Boron-Doped Diamond Electrode. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 25, No. 3, 478-483
- [30] Eisele A.P.P. ve ark.(2013). Simultaneous Square-Wave Voltammetric Determination of Paracetamol, Caffeine and Orphenadrine in Pharmaceutical Formulations Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode *Electroanalysis* 2013, **25**, No. 7, 1734 – 1741
- [31] Alaa A.-M. Abdel-Aziz et al. Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, Volume 37
- [32] Dr. Nakayama M. et al.(November 18, 2000) Division of Anesthesia, Obihiro Kosei Hospital.

- [33] Khan I.U. ve ark.(2014). Stability-indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Determination Of Gatifloxacin and Flurbiprofen in Binary Combination. *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 2, 349-354
- [34] Akhlaq M. ve ark.(2011). A simple high-performance liquid chromatographic practical approach for determination of flurbiprofen. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011 Jul-Sep; 2(3): 151–155.
- [35] Charoo N.A. ve ark.(2005). Simple and Sensitive High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Transdermally Applied Flurbiprofen in Rat Plasma and Excised Skin Samples *Chromatographia*, 62, November (No. 9/10)
- [36] Sajeev C. ve ark.(2002). Determination of flurbiprofen in pharmaceutical formulations by UV spectrophotometry and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **463**; 207–217
- [37] Teng X.W. ve ark.(2003). Stereospecific high-performance liquid chromatographic analysis of flurbiprofen: application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical. Biomedical Analysis* **33**; 95-100
- [38] Yin-Xiu Jin ve ark.(2008). Analysis of flurbiprofen, ketoprofen and etodolac enantiomers by pre-column derivatization RP-HPLC and application to drug–protein binding in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **46**; 953–958
- [39] Giagoudakis G. ve Markantonis S.L.(1998). An alternative high-performance liquid-chromatographic method for the determination of diclofenac and flurbiprofen in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **17**;897–901
- [40] Chenghan Mei ve ark.(2015) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantification of flurbiprofen in human plasma and its application in a study of bioequivalence. *Journal of Chromatography B*, **993-994**; 69–74
- [41] Lee H.I. ve ark.(2014). Simultaneous determination of flurbiprofen and its hydroxy metabolite in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical application. *Journal of Chromatography B*, **971**; 58–63
- [42] Hutzler J.M. ve ark.(2000). Sensitive and specific high-performance liquid chromatographic assay for 4'-hydroxyflurbiprofen and flurbiprofen in human urine and plasma. *Journal of Chromatography B*, **749**; 119–125
- [43] Dhavse V.V. ve ark.(1997). High-performance thin-layer chromatographic determination of flurbiprofen in plasma. *Journal of Chromatography B*, **694**; 449–453

- [44] Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi (2015). Yüksek Performanlolu Sıvı Kromatografisi. Erişim: 15.06.2015, <http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>
- [45] ARLAB VIII. Hücresel, Moleküler ve Analitik Teknikler.(2015) Erişim: 22.06.2015, http://webb.deu.edu.tr/arl原因/images/arl原因_kurs_kitapciki_2012.pdf
- [46] Enstrümental Analiz Ders Notları, Erişim: 21.05.2015, http://www.profdrmehmetyaman.com/ders_notlari/ens.pdf
- [47] Aletli Analiz Laboratuvarı , T.C. Anadolu Üniversitesi yayını no: 2092, Açıköğretim Fakültesi yayını no: 1123
- [48]Dibek.H.(2014).TurkChem Ocak/ Şubat;61. Erişim: 17.06.2015 http://www.antteknik.com/images/pressroom/2014_Turkchem_AnalitıkLablardaHPLC_KolonuSecimi_KromSarf.pdf
- [49] Erişim: 17.06.2015, http://www.bayar.edu.tr/besergil/25_BOLUM_8.pdf
- [50] Söğütertaş Ö. ve Kayalı A. (2005) *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 34 (1) 37 - 57
- [51] ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: *Text and Methodology*

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Neşet	Soyadı	NEŞETOĞLU
Doğ.Yeri	Kırcaali	Doğ.Tar.	16.10.1988
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	57553107564
Email	neset_nesetoglu@hotmail.com	Tel	0(506) 755 47 26

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Ege Üniversitesi Kimya Bölümü	2012
Lise	Lüleburgaz Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü.Eczacılık Fak. Analitik KimyaAdD	2015-Devam ediyor
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok İyi	Çok İyi	Çok İyi	60	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	70,1		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

