

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

**ULTRAFİLTRASYON TEKNİĞİ KULLANILARAK KETOPROFEN'İN  
İNSAN PLAZMASINDAN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI  
KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEM  
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

**Kim. Müh. Aycan DEMİR**

**Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2024**



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

**ULTRAFİLTRASYON TEKNİĞİ KULLANILARAK KETOPROFEN'İN  
İNSAN PLAZMASINDAN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI  
KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEM  
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

**Kim. Müh. Aycan DEMİR**

**Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN**

**ANKARA**

**2024**

**ONAY SAYFASI**

**ULTRAFİLTRASYON TEKNİĞİ KULLANILARAK  
KETOPROFEN'İN İNSAN PLAZMASINDAN YÜKSEK PERFORMANSLI  
SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEM  
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

**Kim. Müh. Aycan DEMİR**

**Danışman: Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN**

Bu tez çalışması 01.07.2024 tarihinde jürimiz tarafından Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Nursabah E. Başcı Akduman*  
(Hacettepe Üniversitesi)

**Tez Danışmanı:** *Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN*  
(Hacettepe Üniversitesi)

**Üye:** *Prof. Dr. İncilay Süslü*  
(Hacettepe Üniversitesi)

**Üye:** *Prof. Dr. Mustafa Çelebier*  
(Hacettepe Üniversitesi)

**Üye:** *Doç. Dr. Engin Koçak*  
(Sağlık Bilimleri Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

03 Temmuz 2024

*Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN*

**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .. ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

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

**Kim. Müh. Ayca DEMİR**

1 “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, tez danışmanım Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

***Kim. Müh. Aycan DEMİR***

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı gerçekleştirirken hiçbir aşamada bana desteklerini esirgemeyen, derin bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan danışman hocam Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana kazandırdıkları değerli bilgiler için emeği geçen tüm Analitik Kimya Ana Bilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma,

Eğitim hayatım süresince beni sonsuz özveriyle destekleyen sevgili anneme ve babama,

Bu uzun ve zorlu yolda ilgi ve desteği ile her daim yanımda olan sevgili eşim Mehmet Demir'e,

İçtenlikle teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

## ÖZET

**Demir, A. Ultrafiltrasyon Tekniği Kullanılarak Ketoprofenin İnsan Plazmasından Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Tayini İçin Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2024.** Bu araştırmada, steroid olmayan antiinflamatuvar ilaç (NSAID) olan ketoprofenin yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) analizi için ultrafiltrasyon tekniği ile ayırma yöntemi geliştirilmiş ve geliştirilen yöntem FDA Biyoanalitik Yöntem Validasyonu kılavuzundaki validasyon parametrelerine göre valide edilerek yöntemin güvenilirliği kanıtlanmıştır. Bu metodolojide, bütün analizler ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) kolon kullanılarak yapılmıştır. Hareketli faz olarak, 70:30 h/h oranında 40 mM disodyum hidrojen fosfat dihidrat tamponu (pH 6.0):asetonitril karışımı kullanılmış, akış hızı ise 1 mL/dk olarak ayarlanmıştır. UV dedektörün dalga boyu 258 nm'ye ayarlanmıştır. Optimizasyon sonucu ketoprofenin alıkonma zamanı 5.75 dakikadır. Doğrusallık aralığı olarak 1.0 – 25.0 µg/mL arasında çalışılmıştır. Gözlenebilme sınırı (LOD) 0.33 µg/mL olarak bulunmuş, alt tayin sınırı ise (LOQ) 1.00 µg/mL şeklinde hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem valide edildikten sonra, ketoprofenin HPLC'de plazmadan analizine uygulanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** NSAID, Ketoprofen, ultrafiltrasyon, HPLC, UV dedektör



## ABSTRACT

**Demir, A. Analytical Method Development and Validation for Determination of Ketoprofen from Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography Using the Ultrafiltration Technique, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Analytical Chemistry Program Master's Thesis, Ankara, 2024.** In this research, a separation method with ultrafiltration technique was developed for the high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) ketoprofen, and the developed method was validated according to validation parameters in the FDA Bioanalytical Method Validation guide and the reliability of the method was proved. In this methodology, all analyzes were performed using an ACE C18 (250 × 4.6 mm i.d., 5 µm) column. As the mobile phase phase, a mixture of 40 mM disodium hydrogen phosphate dihydrate buffer (pH 6.0): acetonitrile was used at a ratio of 70:30 v/v, and the flow rate was set at 1 mL/min. The wavelength of the UV detector was set to 258 nm. As a result of optimization, the retention time of ketoprofen was 5.75 minutes. As the linearity range, it was studied between 1.0 and 25.0 µg/mL. The limit of detection (LOD) was found to be 0.33 µg/mL, and the lower limit of detection (LOQ) was calculated as 1.00 µg/mL. After the developed method was validated, it was applied to the analysis of ketoprofen from plasma in HPLC.

**Key words:** NSAID, ketoprofen, ultrafiltration, HPLC, UV detector

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xv
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Ultrafiltrasyon	3
2.2. Kromatografi	5
2.2.1. Kromatografi Çeşitleri	6
2.2.2. Faz Tiplerine Göre Kromatografi	7
2.2.3. Ayrılma Sistemlerine Göre Kromatografi	8
2.2.4. Kromatografide Temel Parametreler	13
2.2.5. Hareketli Fazın İçeriğinin Kromatografik Ayrıma Etkisi	21
2.2.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	21
2.2.7. HPLC Cihazı Bölümleri	22
2.3. Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAID)	28
2.3.1. NSAID'lerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması (33)	29
2.3.2. NSAID'lerin Yan Etkileri	29
2.4. Ketoprofen	30
2.4.1. Ketoprofenin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	30
2.4.2. Farmakodinamik Özellikleri	31
2.4.3. Farmakokinetik Özellikleri (35)	31
2.4.4. Antiinflamatuvar Özellikleri	31
2.4.5. Ketoprofenin Yan Etkileri (37, 38)	32
2.4.6. Endikasyonları	33

2.4.7. Kontrendikasyonları	33
2.4.8. İlaç Etkileşimleri	33
2.4.9. KET'in Kaynaklarda Yer Alan Analiz Yöntemleri	33
<b>3. GEREÇLER VE YÖNTEM</b>	<b>37</b>
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler	37
3.1.1. Cihazlar	37
3.1.2. Kimyasal Maddeler	37
3.1.3. Sarf Malzemeler	37
3.2. Deney Hazırlıkları	38
3.2.1. Etken Maddenin Saflığı	38
3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması	38
3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi	39
3.3.1. HPLC Deneyinin Yapılışı ve Kromatografik Koşulların Saptanması	39
3.3.2. Yöntem Validasyonu Çalışmaları	40
3.3.3. Sistem Uygunluğu Testi	43
3.3.4. Geliştirilen Yöntemin Spike Edilen Plazma Numunelerine Uygulanması	44
<b>4. BULGULAR</b>	<b>45</b>
4.1. HPLC Sisteminin Optimizasyonu	45
4.1.1. Sabit Faz	45
4.1.2. Hareketli Fazın Belirlenmesi	46
4.2. KET'in Geliştirilen Yönteminin Validasyonu	54
4.2.1. Sistem Uygunluğu	54
4.2.2. Analit Çözeltilerinin Kararlılığı	54
4.2.3. Seçicilik (Özgünlük)	55
4.2.4. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı	57
4.2.5. Doğruluk ve Kesinlik	58
4.2.6. Duyarlılık	59
4.2.7. Geri Kazanım	60
4.2.8. Tekrarlanabilirlik	60
4.2.9. Sağlamlık ve Tutarlılık	61
4.2.10. Spike Edilen Numunenin Analizi	62

<b>5. TARTIŞMA</b>	63
5.1. HPLC Yöntemi	65
5.1.1. Sabit Faz	66
5.1.2. Organik Çözücü Etkisi	66
5.1.3. Tampon Derişimi ve pH Etkisi	67
5.1.4. Akış Hızı Etkisi	67
5.1.5. Enjeksiyon Hacmi Etkisi	67
5.1.6. HPLC Yönteminin Validasyonu	68
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	72
<b>7. KAYNAKLAR</b>	73
<b>8. EKLER</b>	77
EK 1. Sertifika	
EK 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
EK 3. Korelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü	
EK 4. t – Testi	
EK 5. Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi	
EK 6. Orjinallik Ekran Çıktısı	
EK 7. Dijital Makbuz	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	85

## SİMGELER VE KISALTMALAR

% BH	: Yüzde Bağlı Hata
$\bar{X}$	: Aritmetik Ortalama
$\mu$	: Evren Ortalaması
$\mu\text{m}$	: Mikrometre
A	: Eddy Difüzyonu
ACN	: Asetonitril
B	: Boyuna Difüzyon Katsayısı
BSS	: Bağlı Standart Sapma
$C_M$	: Analitin Hareketli Fazdaki Molar Derişimi
$C_S$	: Analitin Sabit Fazdaki Molar Derişimi
DAD	: Dizi Diyot Dedektör
dk	: Dakika
F	: Hacimsel Akış Hızı
g	: Gram
GA	: Güven Aralığı
H	: Eşdeğer Teorik Tabaka Yüksekliği
$\text{H}_3\text{PO}_4$	: Fosforik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IR	: İnfrared
$k'$	: Kapasite Faktörü
KET	: Ketoprofen
L	: Kolonun Dolgu Boyu
LC	: Sıvı Kromatografisi
LOD	: Gözlenebilirlik Sınırı
LOQ	: Alt Tayin Sınırı
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar

N	: Teorik Tabaka Sayısı
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat
nm	: Nanometre
NSAID	: Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaç
PAO	: Pik Asimetri Oranı
r	: Korelasyon Katsayısı
$R^2$	: Tanımlayıcılık Katsayısı
RAKT	: Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı
RASD	: Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi
RKT	: Regresyon Kareler Toplamı
$R_s$	: Ayırıcılık
RSD	: Regresyon Serbestlik Derecesi
S / G	: Sinyal / Gürültü
SH	: Standart Hata
SS	: Standart Sapma
$t_R$	: Alıkonma Zamanı
u	: Hareketli Fazın Doğrusal Hızı
USP	: Amerikan Farmakopesi
UV	: Ultraviyole (Mor Ötesi)
UV/GB	: Ultraviyole/Görünür Bölge
$V_0$	: Ölü Hacim
$V_H$	: Kolondaki Hareketli Faz Hacmi
$V_R$	: Alıkonma Hacmi
$V_S$	: Kolondaki Sabit Faz Hacmi
W	: Pik Zemin Genişliği
YOAKT	: Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı
YOASD	: Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi
$\alpha$	: Seçicilik

## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Ultrafiltrasyon filtresi ve tüpü	4
2.2.	Kolon elüsyon kromatografisi ile A ve B bileşenlerinin ayrılmasının diyagramı	5
2.3.	Elüsyonun dedektör sinyali	6
2.4.	Normal faz ve ters faz kromatografide polarlık ile elüsyon süreleri arasındaki ilişki	9
2.5.	İyon değiştirme kromatografisinde iyon değişimi	10
2.6.	Alıkonma zamanı ve ölü zaman	14
2.7.	Van Deemter eğrisi	17
2.8.	Üç ayrı ayırma gücündeki kromatogramlar	18
2.9.	Temel izoterm şekilleri ve pik şekillerine etkileri	19
2.10.	Pik asimetri oranının hesaplanması	20
2.11.	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının bölümleri	22
2.12.	KET'in kimyasal yapısı	30
4.1.	KET'e ait UV spektrumu	45
4.2.	Asetonitril oranı ile $k'$ değişimi	47
4.3.	Asetonitril oranı ile $N'$ 'nin değişimi	47
4.4.	Tampon çözeltinin pH'ı ile $k'$ değişimi	48
4.5.	Tampon çözeltinin pH'ı ile PAO değişimi	49
4.6.	Tampon çözeltinin derişimi ile $k'$ değişimi	50
4.7.	Tampon çözeltinin derişimi ile PAO değişimi	50
4.8.	Hareketli faz akış hızı ile PAO ve $k'$ değişimi	51
4.9.	Hareketli faz akış hızı ile $N'$ 'nin değişimi	52
4.10.	Enjeksiyon hacmi ile $N'$ 'nin değişimi	53
4.11.	Enjeksiyon hacmi ile PAO'nun değişimi	53
4.12.	3.0 µg/mL standart çözelti kromatogramı	55
4.13.	İlaçsız plazma kromatogramı	55
4.14.	3.0 µg/mL KET içeren plazma çözeltisinin kromatogramı	56
4.15.	Hareketli faz kromatogramı	56
4.16.	KET için kalibrasyon grafiği	57

## TABLOLAR

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Membran tiplerine göre ultrafiltrasyon sistemleri	3
2.2. Farklı karşı iyonların uygulanabilirliği	12
2.3. Analiz yönteminin diğer kaynaklardaki yöntemlerle karşılaştırılması	36
3.1. Sistem uygunluğu test parametreleri	43
4.1. Organik çözücü miktarının KET kromatografik parametreleri üzerine etkisi	46
4.2. Hareketli fazdaki tampon çözeltinin pH'ının kromatografik parametrelere etkisi	48
4.3. Hareketli fazdaki tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi	49
4.4. Akış hızı değişikliğinin KET kromatografik parametrelerine etkisi	51
4.5. Enjeksiyon hacmi değişikliğinin KET kromatografik parametrelere etkisi	52
4.6. 6 Tekrarlı KET analizi için elde edilen sistem uygunluğu parametreleri	54
4.7. KET çözeltisinin kararlılıkları	54
4.8. KET analizine göre elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ve doğrusallıktan sapma önem kontrolü	57
4.9. KET analizi için elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait bulgular	58
4.10. KET analizi için gün içi ve günler arası analiz sonuçları	59
4.11. KET analizine ait 3 farklı derişimdeki geri kazanım değerleri	60
4.12. Yöntem ve enjeksiyon tekrarlanabilirliği verileri	60
4.13. Yönteme ait sağlamlık verileri	61
4.14. Geliştirilen HPLC yöntemine ait tutarlılık bulguları	62
4.15. Spike edilen KET analizine ait geri kazanım değerleri	62
5.1. Yapılan çalışmanın başka bir çalışmayla karşılaştırılması	64
5.2. KET'in insan plazmasında topikal, oral, ampul ve tablet formlarda C <sub>max</sub> değerleri	65



## 1. GİRİŞ

KET ((RS)-2-(3-benzoyilfenil) propanoik asit) NSAID (steroid olmayan antiinflamatuvar ilaç) grubuna ait olan; ateş düşürücü (antipiretik) ve ağrı kesici (analjezik) etkiye sahip bir ilaç etken maddesidir. Tablet, ampul, jel ve şurup formlarında mevcuttur. Çeşitli artritik hastalıkların, ağrılı kas ve iskelet sistemi bozukluklarının, periodontal hastalıkların tedavisinde, ameliyat sonrası ağrıların giderilmesinde ve menstrüal karın ağrılarının tedavisinde kullanılır.

Esas olarak KET'in S(+)-enantiyomeri siklooksijenaz inhibisyon aktivitesinden sorumluyken, R(-)-enantiyomeri prostaglandin sentezi inhibisyonundan bağımsız analjezik özelliklere sahiptir (1). Yani, S(+)-enantiyomeri in-vitro deneylerde farmakolojik etkiler sergilerken, R(-)-enantiyomerinin inaktif olduğu görülmüştür.

KET'in enantiyomerlerine ayrılması için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (2), kütle spektrometrisi ile birleştirilmiş gaz kromatografisi (3,4) veya kapiler elektroforez (5) dahil olmak üzere çeşitli yöntemler mevcuttur. Günümüzde hala rasemat karışımı halinde kullanıldığı ilaçlar olsa da ketoprofenin aktif olan enantiyomerini içeren formları daha fazla tercih edilmektedir.

Tablet ve ampul uygulamalarında biyoyararlanım %90 ve %100 düzeylerinde iken topikal uygulamadan sonra göreceli biyoyararlanımı ve maksimum plazma konsantrasyonu, eşdeğer bir dozun oral uygulamasına kıyasla genellikle %15'ten azdır (6,7). Sistemik dolaşıma giren KET miktarının tedavi için yeterli düzeyde olmasını takip etmek ve NSAID ilaçların kullanım süresine bağlı olarak yan etki olarak ortaya çıkabilen pıhtılaşma riski sebebiyle ilaç plazma konsantrasyonları ölçülmelidir. Bu nedenle, plazmada KET tayini için hassas bir analitik yöntem gereklidir (8).

Kaynaklarda farmasötik çalışmalarda KET'in analizi için analiz yöntemleri yer almaktadır. Bunlar, kapiler elektroforez (9), UV spektrofotometri (10), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (11-16), kemilüminesanslı akış enjeksiyon yöntemi (17, 18), misel elektrokinetik kromatografi (20), elektrokimyasal yöntemler (19, 21, 22), akış enjeksiyon analizi (23) gibi yöntemlerdir.

Ultrafiltrasyon uygulamalarında ise, çözünmüş maddeler ve partiküller membranlarla ayrılır. Gözenek boyutu, partiküllerin fiziksel olarak ayrılmasını sağlar.

Araştırmalar sonucu KET'in genellikle protein çöktürme ile numune hazırlama yöntemi ve ardından HPLC ile analiz edildiği görülmüş, ancak bu maddenin ultrafiltrasyon tekniği ile hazırlanan numunelerin HPLC ile analizine kaynaklarda rastlanmamıştır. Bu nedenle, KET içeren insan kan plazma numunelerinin ultrafiltrasyon tekniği ile hazırlanmasının ardından, analizi için HPLC yöntemi geliştirilecektir. Geliştirilen analiz yöntemi rutin analizlerde kullanmak üzere valide edilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ultrafiltrasyon

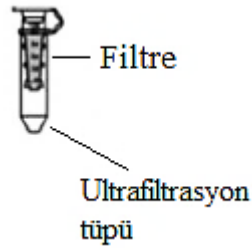
Ultrafiltrasyon, sıvı örneklerde yer alan büyük partiküller veya proteinler gibi makromoleküllerin seçici olarak ayrılması işlemidir. Ultrafiltrasyonda en önemli kısım membranlardır. Organik polimerlerden yapılmış membranlar ultrafiltrelerin içinde yer almaktadır.

Ultrafiltrasyon sistemleri membranın yapısına, morfolojisine ve boyutuna göre sınıflandırılır (24). Membran tiplerine göre ultrafiltrasyon sistemleri Tablo 2.1’de verilmektedir.

**Tablo 2.1.** Membran tiplerine göre ultrafiltrasyon sistemleri

Membran Tipi	Çeşitleri	
Yapısına Göre	Polimerik Membranlar	Plastiklerdir. En çok kullanılan türleri polisülfon, polivinil florür ve poliakrilonitrildir.
	Seramik Membranlar	Zirkonyum, titanyum ve alüminyumdan yapılmış membranlardır. Isıl dayanıklılıkları çok yüksektir.
	Kompozit Membranlar	Birden fazla malzemenin karıştırılmasıyla elde edilirler. Amaç yüksek performans elde etmektir. Genellikle seramik ile polimerik yapının karıştırılmasıyla elde edilir.
Morfolojisine Göre	Simetrik Membranlar	Homojen dağılmış gözenekli sistemden oluşur. Performansı düşüktür.
	Asimetrik Membranlar	Çeşitli katmanlardan meydana gelmiştir. Katmanların kimisi küçük gözeneklerden kimisi de büyük gözeneklerden meydana gelir. Seçiciliği yüksektir.
	Düşük Lifli Membranlar	İçerisinden ince ve geçirgen borular vardır. Yüzey alanı yüksektir. Endüstriyel tipte uygulamalarda kullanılır.
	Yassı Levha Membranlar	Düz katmanların birleşmesinden meydana gelir. Laboratuvar uygulamalarında kullanılır.
Boyutuna Göre	Molekül Ağırlığına Göre	Boyuta göre geçirgenliği sağlamak için kullanılır.
	Gözenek Boyutuna Göre	Gözenek geçirgenliğinin büyüklüğüne göre kullanılır.

Bir ultrafiltrasyon filtresi ve tüpü Şekil 2.1’de gösterilmektedir.



**Şekil 2.1.** Ultrafiltrasyon filtresi ve tüpü

Ultrafiltrasyon membranlarının gözenek boyutları genellikle 1 – 100 nm aralığında değişiklik göstermektedir. Bu teknikte kullanılan membranlar sayesinde makromoleküller seçici olarak kolaylıkla ayrılabilir, çünkü kullanılan bu membranlar, boyutlarına bağlı olarak moleküllerin içlerinden geçişini kontrol eden seçici bir bariyer görevi görmektedir. Belirli boyutlardaki moleküller bu membranlarda bulunan gözeneklerden geçebilirken, daha büyük moleküllerin geçişi ise engellenir. Çözeltinin ultrafiltrasyondan filtrelenmesi, uygulanan basınçla da ilgilidir. Belli bir miktarda basınç uygulanarak çözeltinin membran içinden geçirilmesi sağlanır.

Ultrafiltrasyon yöntemi ilaç analizleri, atık su arıtma sistemleri, biyoteknoloji, gıda endüstrisi gibi birçok endüstriyel alanda analiz edilecek numunelerin hazırlanmasında ve çözeltilerin saflaştırılmasında bir ayırma işlemi olarak uzun süredir kullanılmaktadır. Bu tekniğin kapasitesini belirleyen faktörler, çözünen molekülün boyutu, kullanılan membranın gözenek boyutu ve enstrümental konfigürasyonlardır.

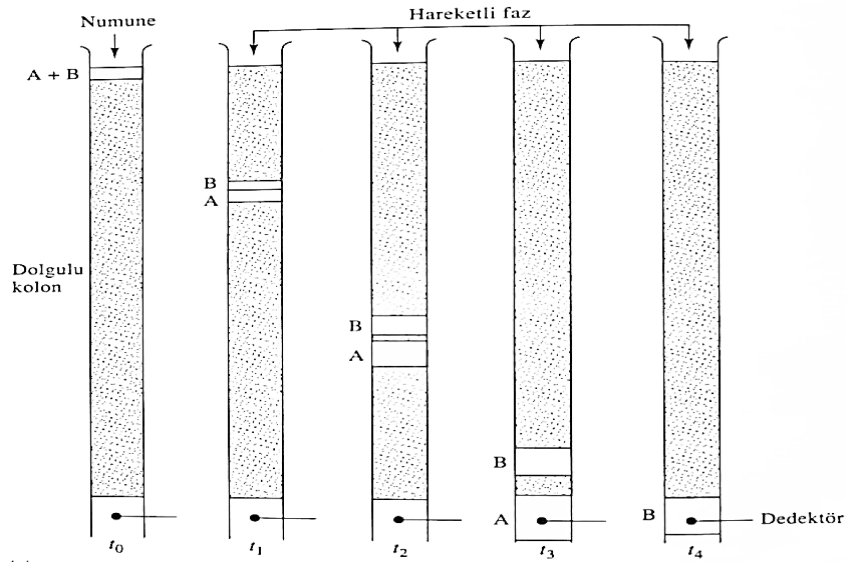
Ultrafiltrasyon tekniği 90'lı yıllarda numune hazırlama amacıyla sıklıkla kullanılmıştır (25). Bu teknik araştırmacılara biyolojik materyallerden tek adımlı ve kolay uygulanabilir bir numune hazırlama tekniği sunmaktadır (26).

İlaç analiz yöntemlerinin geliştirilmesinde ultrafiltrasyon bazlı ekstraksiyon uygulamalarını kullanan az sayıda çalışma vardır, bu yüzden ultrafiltrasyon bazlı ekstraksiyon yoluyla insan plazma örneklerinden KET'in belirlenmesi için basit, hızlı ve yenilikçi bir analiz tekniği geliştirmek ve doğrulamak bu tez çalışmasının başlıca amacıdır.

## 2.2. Kromatografi

Bir karışımdaki bileşenleri ayırmak için sabit ve hareketli faz olarak iki ayrı fazdan yararlanılarak bu bileşenlerin ayrılmasına kromatografik ayırma denir.

Kromatografik ayırımların hepsinde numune sıvı, süperkritik akışkan veya gaz gibi bir taşınabilir fazda çözülerek sabit faza gönderilir. Birbiriyle karışmayacak şekilde oluşturulan sabit ve hareketli faz bileşenleri ile numune bileşenleri arasında oluşacak etkileşimden dolayı, numuneyi oluşturan bileşenler taşınabilir ve sabit fazda farklı oranlarda dağılım sağlanacak şekilde ayarlanır. Numuneyi oluşturan bileşenler, sabit faz tarafından kuvvetli tutulurken hareketli faz sayesinde yavaş bir şekilde hareket ederler. Bunun tam tersi olarak, bileşenler sabit faz tarafından zayıf tutulurken hızlı hareket ederler. Hareketlerindeki bu farkın neticesinde, numuneyi oluşturan bileşenler birbirlerinden nitel ve/veya nicel olarak analiz edilebilen farklı kromatografik bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar (27). Kolon elüsyon kromatografisi ile A ve B bileşenlerinin ayrılmasının diyagramı Şekil 2.2'de gösterilmektedir.

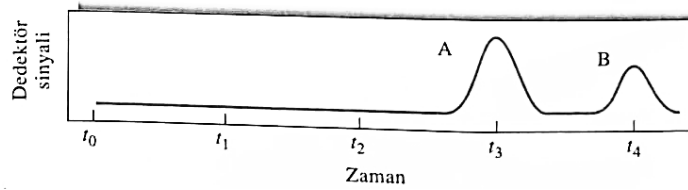


**Şekil 2.2.** Kolon elüsyon kromatografisi ile A ve B bileşenlerinin ayrılmasının diyagramı (27)

Kolon, inert bir katı madde ile doldurulmuş, dar ve ince bir borudan ibarettir. Hareketli faz, bu taneciklerin aralarındaki boşluklardan geçerek ilerlemektedir. Önce,

A ve B bileşenlerini içeren numunenin hareketli fazdaki bir çözeltisi, üst kısımdan kolona dar bir bant halinde uygulanır. (Şekil 2.2’de  $t_0$  zamanında). Burada her iki bileşen, sabit ve hareketli faz arasında dağılır. Ardından, taze hazırlanmış hareketli fazın devamlı ilave edilmesi ve numunedeki bileşenlerin kolondan geçtiği süre boyunca hareketinin sağlanmasıyla ayrılma gerçekleşir (28). Taze hareketli faz ilave edildikçe, hareketli faz ile daha az etkileşimde olan B bileşeni sabit faz tarafından kuvvetli tutulan bileşen olduğundan çok yavaş hareket eder. Aynı şekilde, hareketli faz kolondan geçtikçe hareketli faz ile daha çok etkileşimde olan A bileşeni de kolon tarafından zayıf tutulan bileşen için olduğundan çok hızlı hareket eder ( $t_1 - t_4$  aralığı).

İdeal olarak, hızlardaki bu farklılık neticesinde, karışımı oluşturan bileşenler kolon uzunluğu süresince bant şeklinde ayrılırlar ( $t_2$  zamanı). Hareketli faz kolondan yeteri kadar geçirildikten sonra bantların kolonun sonundan çıkması sağlanır (kolondan elüe edilir), ardından herbir bileşen dedekte edilir (27). Elüsyonun dedektör sinyali Şekil 2.3’te gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Elüsyonun dedektör sinyali

### 2.2.1. Kromatografi Çeşitleri

Kromatografi çeşitleri şu şekilde sınıflandırılır:

Kullanılan fazların tiplerine göre,

- Sıvı kromatografisi
  - Sıvı-katı kromatografisi
  - Sıvı-sıvı kromatografisi
- Gaz kromatografisi
  - Gaz-sıvı kromatografisi
  - Gaz-katı kromatografisi

Ayrılma sistemlerine göre

- Dağılma kromatografisi

- Adsorbsiyon kromatografisi
- İyon değiştirme kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Moleküler eleme kromatografisi
- Afinite kromatografisi

### 2.2.2. Faz Tiplerine Göre Kromatografi

#### Sıvı Kromatografisi (LC):

Tüm analitik ayırma metodlarında sıvı kromatografi en çok kullanılanıdır. Bunun başlıca nedenleri, duyarlılığı, doğru nicel tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, otomasyon kolaylığı, kolay bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve en önemlisi endüstriyi, bilimin birçok dalını ve insanları yakından ilgilendiren maddelere geniş bir ölçüde uygulanabilirliğidir. Bu maddeler proteinler, amino asitler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, pestisitler, ilaçlar, terpenoitler, antibiyotikler, steroidler ve anorganik bileşiklerdir (29).

Sıvı kromatografisinin esası, hareketli faz ve sabit faz arasındaki polarite farklılığına dayanır.

Sıvı kromatografisi, iki alt türe ayrılır. Bunlar, sıvı-katı kromatografisi ve sıvı-sıvı kromatografisidir.

#### Sıvı – Katı Kromatografisi

Kolondaki dolgu maddesinin sabit faz olduğu ve hareketli fazın da sıvı olduğu kromatografiye sıvı-katı kromatografi denir. Esası, ayrılacak olan bileşenin hareketli faz tarafından sabit faz boyunca taşınıp adsorbsiyonla tutunmasıdır.

Yüksek polariteye sahip bir dolgu maddesi sabit faz materyali olarak kullanılırken, hareketli faz polaritesi düşük bir sıvıdan oluşuyorsa bu normal faz sıvı kromatografisi; sabit faz apolar bir dolgu maddesinden ve hareketli faz polaritesi yüksek bir sıvıdan oluşuyorsa buna da ters faz sıvı kromatografisi denir.

### **Sıvı – Sıvı Kromatografisi:**

Kolondaki bir dolgu maddesine tutturulmuş bir sıvı filminin sabit faz olarak kullanıldığı ayırma yöntemine sıvı-sıvı kromatografi denir. Bu kromatografi çeşidinde, hareketli faz apolar özellikte iken dolgu maddesindeki sıvı filminin yapısı polar özellikte olur. Eğer sıvı filmi apolar özellikte tercih edilirse buna ters faz sıvı-sıvı kromatografisi denir. Sıvı-sıvı kromatografi sistemsel olarak ayrılacak maddenin fazlar arasındaki dağılımı esasına dayanır.

### **2.2.3. Ayrılma Sistemlerine Göre Kromatografi**

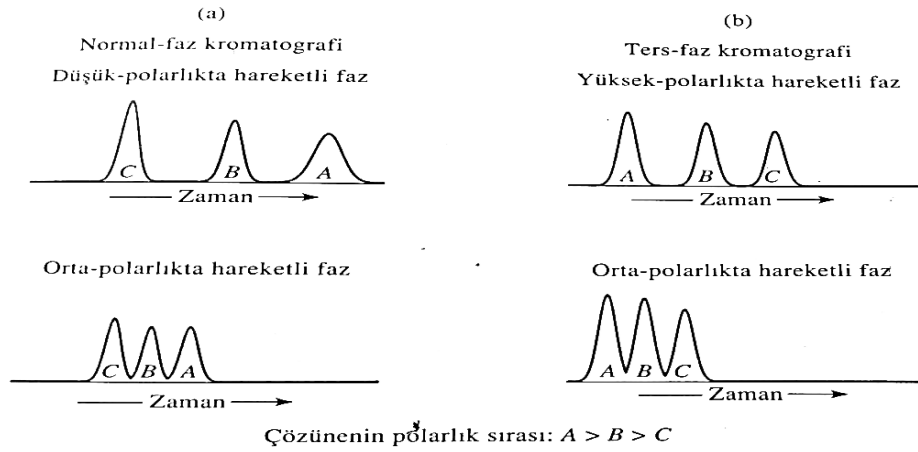
#### **Dağılma Kromatografisi**

En yaygın kullanılan HPLC tipi olup, sabit faz, hareketli faz ile karışmayan bir sıvıdır. Sıvı-sıvı kromatografi ve sıvı-bağlı faz kromatografisi olarak iki türü vardır. Sıvı-sıvı kromatografide, sabit sıvı fazı, yerinde sabit tutmak için fiziksel adsorpsiyondan yararlanır. Sıvı-bağlı faz kromatografide ise sıvı, tutunduğu yüzeye kimyasal bağlıdır ve böylece hareketli fazda çözünmeyen kararlı bir dolgu meydana gelmektedir (29).

Sıvı-bağlı faz dolgu maddeleri dağılma kromatografisinde kullanılır, bunların çoğundaki destek katıları rijit silis veya silis esaslı bileşimlerden oluşmaktadır (28).

Dağılma kromatografisi, hareketli ve sabit fazların polarlığına bağlı olarak iki türdür. Ters faz kromatografide sabit faz apolardır (çoğu zaman bir hidrokarbon); hareketli faz ise biraz daha polar (su, metanol, asetonitril gibi) bir çözücüdür ibarettir. Normal faz kromatografide ise sabit faz olarak oldukça polar çözücüler kullanılmaktadır. Normal faz kromatografide düşük polaritedeki bileşenler hareketli fazda nispeten çok çözündükleri için ilk önce kolonu terk ederler; hareketli fazın polaritesindeki artışla beraber terk etme süresi de kısalır. Bunun aksine ters faz kromatografi yönteminde, en polar bileşenler en önde yürür ve hareketli fazın polaritesindeki artış, terk etme süresini uzatır (30). Normal faz ve ters faz kromatografide polarlık ile elüsyon süreleri arasındaki ilişki Şekil 2.4'te gösterilmektedir.





**Şekil 2.4.** Normal faz ve ters faz kromatografide polarlık ile elüsyon süreleri arasındaki ilişki (27)

HPLC'lerin çoğunda ters faz dolgu maddesi ile doldurulmuş kolonlar kullanılmaktadır. Ters faz ayrımlarının daha çok tercih edilmesinin sebebi, hareketli faz olarak su kullanmanın mümkün olmasıdır. Suyun kolay ulaşılabilir olması, toksik olmaması, UV-geçirgenlik özelliği ve biyolojik türlere uygunluk gibi üstün yönleri vardır. Ayrıca, apolar sabit fazlarla iletiminin ve gradiyent ayırmadan sonra dengenin yeniden kurulmasının hızlı olması da bir avantajdır. Sabit faz dolgularındaki siloksanın R grubu, en yaygın olarak, bir  $C_8$  – (n-oktil) veya  $C_{18}$  – (n-oktadesil) zinciridir (27).

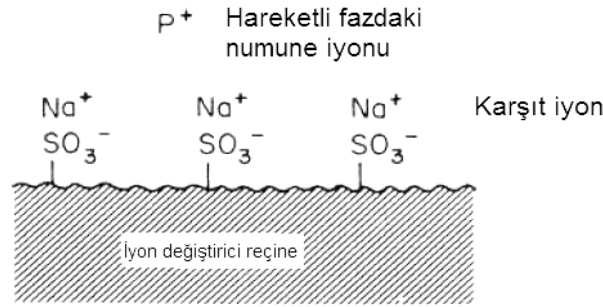
### Adsorbsiyon Kromatografisi

Bir karışımda bulunan gaz veya sıvı haldeki bileşenlerin katı fazda tutunarak moleküler etkileşimine adsorbsiyon denir. Katı fazı oluşturan adsorban malzemeler genellikle küçük partiküllü özel bir kimyasaldan oluşan malzemelerdir. Bu malzemeler belli bazı moleküllerin adsorbe edilebilmesi için tasarlanmıştır. Silika jel, sepiyolit, alümina, selüloz, makroporoz reçineler, aktif karbon en çok kullanılan adsorban malzemelerdir. Ayrılması istenen bileşen, adsorban malzemenin yüzeyindeki aktif bölgelere tutunarak adsorbe edilir ve içinde bulunduğu karışımdan ayrılmış olur. Örneğin, silika jel bazı protein bazlı bileşiklerin ayrılması için kullanılır. Sepiyolitler ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ilaç ayırma

malzemesidir. Aktif karbonlar, su arıtma ve ilaç uzaklaştırma amacıyla ilaç endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır.

### İyon Değişirme Kromatografisi

Bu kromatografide temel prensip çözeltinin içindeki iyonlarla yüksek mol ağırlıklı bir katının yüzeyindeki aynı işaretli iyonların değiş-tokuş dengesine dayanır. Kil ve zeolit gibi doğal iyon değiştiriciler uzun süredir kullanılmaktadır. İyon değiştiricilerin aktif uçları, kuvvetli bir asit olan sülfonik asit grubu ( $-SO_3^-H^+$ ) ve zayıf bir asit olan ( $-COO^-H^+$ )'dur. Anyonik iyon değiştiriciler, kuvvetli bir baz olan tersiyer amin grupları ( $-N(CH_3)_3+OH^-$ ) veya daha zayıf bir baz olan primer amin gruplarını ( $-NH_2+OH^-$ ) içermektedir (27). İyon değiştirme kromatografisinde iyon değişimi Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



**Şekil 2.5.** İyon değiştirme kromatografisinde iyon değişimi (31)

Hareketli fazın iyonları ile numunenin iyonları arasındaki rekabeti artırmak için:

- İyon değiştirici tipi
- Hareketli fazın pH'ı
- Hareketli fazın iyonik gücü (konsantrasyonu)
- Hareketli fazdaki karşı iyonların türünün iyi seçilmesi ve gerekirse bunların herhangi birinin veya tamamının değiştirilmesi gerekir (31).

## İyon Çifti Kromatografisi

İyon çifti kromatografisi genellikle iyon değiştirme kromatografisi yerine de kullanılabilir (27). Pek çok problem her iki yöntemle de çözülebilir, ancak iyon değişimi, belirli koşullar altında asit, baz ve nötr ürünlerin karışımlarını ayırmak için o kadar iyi değildir ve iyon çifti kromatografisinin asıl olarak devreye girdiği yer burasıdır. Ters fazların sabit faz olarak kullanılabilmesi, popülaritesine katkıda bulunmuştur (31).

İyon çifti kromatografisinin, iyon değiştirme kromatografisine birkaç üstünlüğü (32):

- Kullanılan kolonlar daha verimlidir.
- Aynı seri numaraya ait kolonlar sıklıkla üretilebilir.
- Kolonlar daha kararlı olma eğilimindedir.
- Kolon dolgu maddelerinin çeşitliliği sayesinde seçicilik çok yüksektir.

İyonik numuneler, seçilen pH ile belirlendiği şekilde, sadece zayıf asitler veya sadece ayrışmamış formda bulunan zayıf bazlar (nötr bileşiklere ek olarak) içermeleri koşuluyla ters fazlı kromatografi ile ayrılabilir; buna "iyon bastırma" denir. İyon çifti kromatografisi bu prensipten doğmuştur (31).

Bu teknikte, kolay iyonlaşabilen türler ters faz ilkesine göre işleyen kolonlar kullanılarak ayrılır. Bu kromatografi türünde, hareketli faza çok büyük boyutta karşıt iyonlar içeren bir organik tuz eklenerek, analitin bir iyon çifti oluşturması sağlanır (29). Yani, hem anyonik hem de katyonik bileşenler içeren numunede bunlardan biri karşı iyon tarafından "maskelenir" ve diğeri uygun bir pH seviyesi tarafından "bastırılır".

Buradaki organik tuzun kromatografik davranışı iyonik olmayan bir organik molekülünki gibidir (31):



Buradaki ayrılma süreci için iki mekanizma önerilmiştir. Birincide, hareketli fazdaki zıt yüklü analit iyonu, kullanılan karşıt iyon ile yüksüz bir iyon çifti haline gelir. Ardından bu iyon çifti, apolar sabit faz ile polar hareketli faz arasında dağılır. İyon çiftinin her iki faza olan ilgisi numune bileşenlerinin alıkonma özelliklerini farklandırır. İkinci mekanizmada ise, karşıt iyon, nötr sabit fazda kuvvetle tutunarak

bu fazı yüklü hale getirir. En sonunda, hareketli fazdaki zıt yüklü iyonlarla tersinir iyon çifti kompleksleri oluşur ve sabit fazla en iyi kompleksi oluşturan ayrılacak iyon en uzun süre alıkonulur. Bu esasa göre bir ayrılma gerçekleşir. Aynı numunede bulunan ve kimi iyonik olan kimi olmayan bileşiklerin, bu tip dağılma kromatografik yöntemlerle ayrılmasına ilişkin çok özel ayırmalar mümkün olabilmektedir (27).

İyonik analitleri ayırmak için iyon çifti kromatografisi kullanımının avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir (31):

- Ayırma için ters fazlı sistemler kullanılabilir.
- Asitlerin, bazların ve nötr ürünlerin karışımları ve ayrıca (bir katyonik ve bir anyonik gruba sahip olan) amfoterik moleküller ayrılabilir.
- Analitlerin pKa değerleri çok benzer ise iyon çifti kromatografisi de iyi bir seçim olabilir.
- Seçicilik, karşı iyonun seçiminden etkilenebilir.

İyon çifti kromatografisi tüm iyonik bileşikler için uygundur ancak tüm karşı iyonlar her durumda uygun bir şekilde kullanılmayabilir. Tablo 2.2, metanol-su veya asetronitril-su ile ters faz kromatografisi için uygun olan bazı karşı iyonları listelemektedir.

**Tablo 2.2.** Farklı karşı iyonların uygulanabilirliği (31)

<b>Karşı İyon</b>	<b>Uygulanabilirlik</b>
Kuartern aminler (örn, tetrametil-, tetrabütil-, palmitiltrimetil amonyum)	Kuvvetli ve zayıf asitler, sülfonatlı boyalar, karboksilik asitler
Tersiyer aminler (örn, trioktilamin)	Sülfonatlar
Alkil- ve arilsülfonatlar (örn, metan- ve heptansülfonat, kamforsülfonik asit)	Güçlü ve zayıf bazlar, benzalkonyum tuzları, katekolaminler
Perklorik asit	Birçok baz ile çok güçlü iyon çiftleri
Alkilsülfatlar (örn, laurilsülfat)	Sülfonik asitlere benzer, farklı seçicilik

## **Moleküler Eleme Kromatografisi**

Moleküler eleme kromatografisinde kullanılan dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüze olabileceği düzenli gözenek ağına sahip küçük silis veya polimer taneciklerinden oluşur. Gözenekler içinde moleküller etkin bir şekilde yakalanır ve hareketli fazın akışından etkilenmezler. Gözeneklerde kalma süresi, analit moleküllerinin büyüklüğüne bağlıdır. Dolgu maddesinin ortalama gözenek boyutundan daha büyük olan moleküller dışarıda kalır ve dolayısıyla alıkonmazlar. Bu tür moleküller ilk olarak ayrılır. Gözeneklerden daha küçük çaplara sahip moleküller ise gözeneklere kolayca nüfuz eder ve bu nedenle en küçük moleküller en uzun süre tutulur ve en son ayrılırlar. Orta büyüklükteki moleküller, dolgu maddesinin gözeneklerine yarıçaplarına bağlı olarak kısmen nüfuz ederler. Ayrıca, moleküler eleme kromatografisinde analit ve sabit faz arasında kimyasal ve fiziksel etkileşimler bulunmaz (28).

## **Afinite Kromatografisi (29)**

Afinite kromatografisinde, afinite ligandı denilen bir reaktif madde, katı bir desteğin çeperine kovalent olarak bağlanır. Numune kolondan geçerken, yalnızca, afinite ligandına seçimli olarak bağlanan moleküller alıkonur. Bağlanmayan moleküller, hareketli fazla birlikte kolondan geçer. İstenmeyen moleküller uzaklaştıktan sonra, analiz edilecek olan analitler, hareketli fazın bileşimi değiştirilerek ayrılabilir. Bu kromatografinin en güzel tarafı, olağanüstü seçiciliğidir. Preparatif çalışmalarda gerekli olan biyomoleküllerin hızlı izolasyonu amacıyla kullanılır.

### **2.2.4. Kromatografide Temel Parametreler**

#### **i. Alıkonma Zamanı ve Alıkonma Hacmi**

Numune cihaza enjekte edilmesinin ardından dedektöre belli bir sürede ulaşır, bu süreye alıkonma süresi ( $t_R$ ) denir. Bazen alıkonma süresi yerine alıkonma hacmini ( $V_R$ ) kullanmak daha yararlı olabilir. Eşitlik 2.1'de alıkonma süresi ile alıkonma hacmi arasındaki ilişki verilmiştir:

$$V_R = t_R \times F \quad (2.1)$$

F: Kolon içinde bir numunenin ortalama hacimsel akış hızıdır.

Aslında alıkonma hacmi, numunenin sabit fazdan geçmesi için harcanan hareketli faz miktarıdır. Alıkonma hacmi, kolon içerisindeki hareketli fazın hacmi ( $V_H$ ) ve sabit fazın hacmi ( $V_S$ ) arasındaki ilişki şu şekildedir:

$$V_R = V_H + KV_S \quad (2.2)$$

K: Dağılım katsayısı

K, sabit fazdaki analit konsantrasyonunun ( $C_S$ ) hareketli fazdakine ( $C_H$ ) oranı olarak şu şekilde gösterilir:

$$K = C_S / C_H \quad (2.3)$$

## ii. Kapasite Faktörü

Kolondan geçerken sabit fazla bir etkileşmeye girmeyen maddelerin elüe edilme hacmine ölü hacim (boş hacim) ( $V_0$ ) denilir. Maddenin alıkonma hacmi ve ölü hacim arasındaki ilişki de şu şekildedir:

$$k' = \frac{(V_R - V_0)}{V_0} \quad (2.4)$$

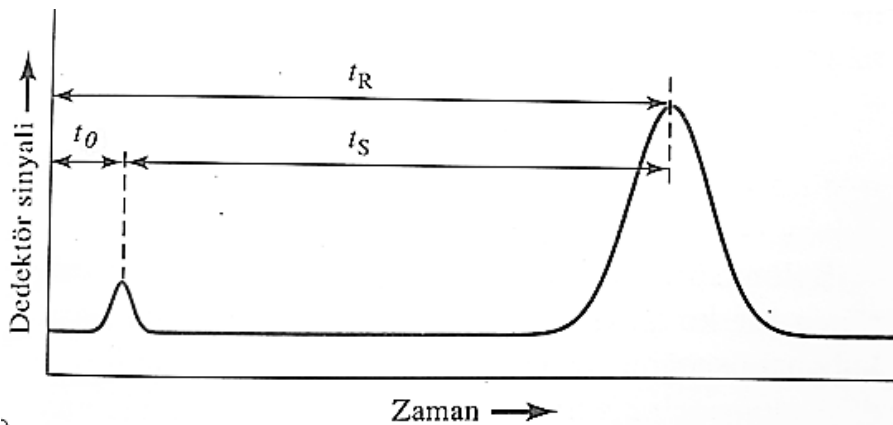
$k'$ : Kapasite faktörü

Sabit fazdan geçiş sırasında hacimsel akış hızı (F) sabit tutulursa eşitlik (2.4) şu şekilde de gösterilebilir:

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.5)$$

$t_0$ : Ölü zaman

Alıkonma zamanı ve ölü zaman Şekil 2.6'da gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Alıkonma zamanı ve ölü zaman

Eşitlik 2.2'den;

$$(V_R - V_H)/V_S = K \quad (2.6)$$

Dolayısıyla  $k'$  ve  $K$  arasındaki ilişki de şu şekilde gösterilebilir:

$$k' = K \times V_S / V \quad (2.7)$$

Burada;

$$V = V_R - V_H \quad (2.8)$$

$k'$ , maddenin sabit faz üzerindeki tutunmasını belirten bir değerdir.  $k'$ , sabit ve hareketli fazın türüne ve maddenin yapısına göre değişir. Bu sebeple  $k'$  maddenin kendisine özgü bir değerdir. Maddenin kolondan iyi ayrılması için  $1 < k' < 10$  aralığında olması gerekir. Eğer  $k' < 1$  durumunda analitin sabit fazda tutunması az,  $10 < k'$  iken analitin sabit fazda tutunması çok demektir, bu da analizin süresinin uzadığı anlamına gelmektedir.

### iii. Seçicilik (Özgünlük)

Analizi yapılan iki maddenin pikleri arasındaki ayrımın bir ifadesidir. Birbirini takip eden bu iki pike ait maddenin alıkonma faktörlerinin oranı, seçicilik ( $\alpha$ ) olarak tanımlanır ve şu şekilde ifade edilir:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{(t_R)_2 - t_0}{(t_R)_1 - t_0} \quad (2.9)$$

Buna göre,  $k'_2$  uzun alıkonma zamanlı maddenin alıkonma faktörü,  $k'_1$  ise kısa alıkonma zamanlı maddenin alıkonma faktörüdür. Ayırma işleminde maddelerin seçiciliğinin iyi olması ayırım gücünün iyi olduğunun bir göstergesidir.

### iv. Kolon Verimi

Kolonun verimi, ayrılacak maddenin kolon boyunca ilerlemesi esnasında oluşan pikin genişliği ile ilgilidir. Verimli kolonlarda pikler dar bir bant şeklinde oluşurlar ve bu kolonlarla maddeler kolay ayrılır. Yani, bantın dar olması ayırıcılığın çok iyi olduğunu gösterir.

Kolon verimini etkileyen iki parametre vardır:  $H$ , tabaka yüksekliği ve  $N$  ise tabaka sayısıdır. Bu parametreler arasında şöyle bir ilişki vardır:

$$H = L / N \quad (2.10)$$

L: Kolonun dolgu boyu

Kolonun çalışma performansının artması için, tabaka sayısının (N) artması ve tabaka yüksekliğinin (H) azalması gerekir. N ve H parametrelerinin kolon performansını etkileme ölçüsü, kullanılan kolonun türüne ve sabit ve hareketli fazların türlerine göre değişir.

N için ise şu formül kullanılır:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad (2.11)$$

Burada W, pikin taban genişliğidir (yani pikin yüksekliğinin %10'undaki genişliktir).

N değerini hesaplamak için kullanılan başka bir yöntemde ise,  $W_{1/2}$ 'nin yani pikin yüksekliğinin yarısı alınarak pikin genişliğinin tayinine bakılır. Burada N değeri şu şekilde verilir:

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2 \quad (2.12)$$

Bir kromatografide kolonun verimi, yaklaşık olarak şu eşitlikle ifade edilebilir:

$$H = A + \frac{B}{u} + C_S u + C_H u \quad (2.13)$$

u: Hareketli fazın doğrusal hızı

A: Çoklu yol etkisini (Eddy difüzyonu) ifade eden bir katsayı

B: Boyuna difüzyon katsayısı

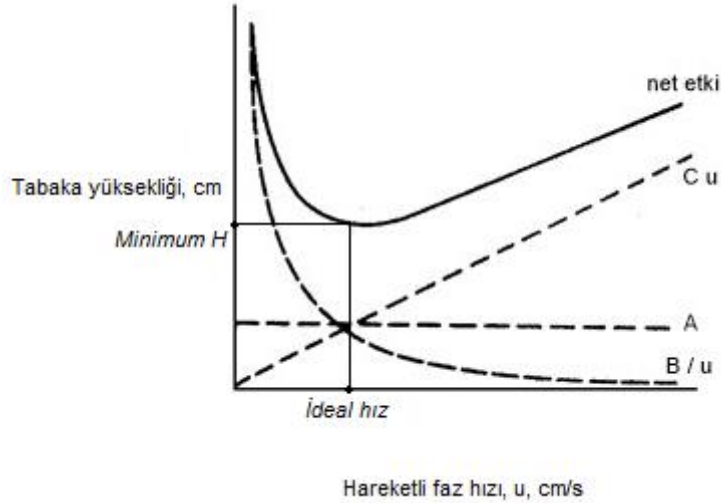
$C_S$ : Sabit fazın kütle aktarım katsayısı

$C_H$ : Hareketli faz için kütle aktarım katsayısı

Eşitlik 2.13, 1950'lerde Hollandalı kimya mühendisleri tarafından geliştirilen ve kromatografik verimi belirlemede sık kullanılan Van Deemter denkleminin eşdeğeri.



Eşitlik 2.13'ü incelediğimizde, kromatografik bir kolonda verimli bir çalışma elde etmek için hareketli fazın optimum akış hızının belirlenebilmesi gerekir. Şekil 2.7'ye göre kolonda bandın ne kadar genişleyeceği, hareketli fazın sabit fazla temasta kaldığı süreye; bu süre ise, hareketli fazın akış hızına bağlıdır.

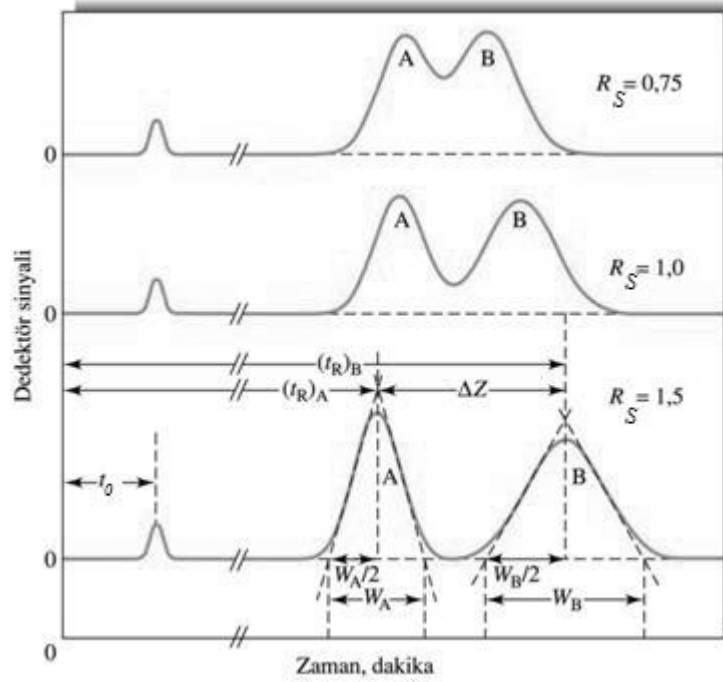


Şekil 2.7. Van Deemter eğrisi

Kolonun verimini artırmanın bir yolu,  $H$  değerini küçük tutmaya çalışmaktır. Maddenin molekülleri kolondan geçerken farklı büyüklükteki yolları izlemesi nedeniyle kolondaki molekül hızları da değişiklik gösterir. Moleküllerin hepsinin kolondan geçişi esnasında kromatografik bant genişlemesi oluşur. Bunun anlamı, çoklu yol etkisidir (A) (Eddy difüzyonu). Kolonun dolgu maddesi küçük tanecikli seçilirse akış hızı yükselir, hareketli fazın sabit fazla temasta kaldığı süre azalır, bant daralır ve madde moleküllerinin kolonda aldığı yollar azalır, dolayısıyla A değeri azalır, bu da kolonun verimini artırır. Kolon verimini artırmanın bir diğer yolu, kolon sıcaklığını düşük tutmaktır. Böylece, B (boyuna difüzyon katsayısı) sıcaklığa bağlı olarak düşer. B'nin değerini düşürmenin diğer yolları da, düşük akış hızlarında çalışmak veya kolon basıncını artırmak olabilir. Bazen de, kolonlarda yüksek akış hızlarında çalışıldığında, sabit ve hareketli faz arasındaki dağılım dengelerinde düzensizlik oluşur. Buna engel olmak için, C'nin (kütle aktarım katsayıları) küçültülmesi gereklidir, eğer yüksek akış hızlarında çalışmak zorunluysa bile, bunun çözümü ya hareketli fazın viskozitesini düşürmek, ya kolon sıcaklığını artırmak ya da sabit faz için sıvı film kalınlığı ince olan bir kolon seçimi yapmaktır.

## v. Ayırıcılık

Ayırıcılık ( $R_S$ ), analitlere ait bantlar arası mesafenin, genişliği türünden değeridir ve analitlerin kolondan ayrılma becerisinin bir göstergesidir. Üç ayrı ayırma gücündeki kromatogram Şekil 2.8'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.8. Üç ayrı ayırma gücündeki kromatogramlar**

Ayırıcılık için verilen eşitlik şu şekilde gösterilmektedir:

$$R_S = \frac{2 \times [(t_R)_2 - (t_R)_1]}{W_1 + W_2} \quad (2.14)$$

Alıkonma faktörü ve  $\alpha$  ayırma gücünü etkiler. Dolayısıyla, kolon ayırma gücü,  $k'$ ,  $\alpha$  ve  $N$  ile değişir:

$$R_S = \frac{N^{1/2}}{4} \times \left[ \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \right] \times \left[ \frac{k'}{(k'+1)} \right] \quad (2.15)$$

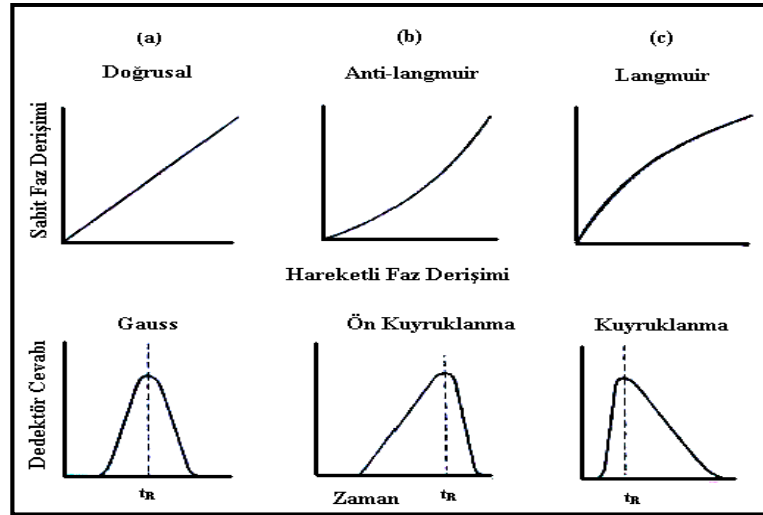
Buna göre,  $R_S = 0.75$  ve  $R_S = 1.0$  iken piklerin birbirinden ayrılması çok iyi değilken,  $R_S \geq 1.5$  olduğunda iki pikin ayrılması tam sağlanır.

Eşitlik 2.15'e göre,  $\alpha = 1$  olması pik çakışması olduğunu gösterir ve bu pikler kolondan birlikte ayrılır. Dolayısıyla  $\alpha > 1$  olmalıdır ve bu başarılı bir kromatografik ayırmanın göstergesidir.  $\alpha$ , 1'e yaklaştıkça pikler birbirine yaklaşılmaya başlar.  $\alpha$ 'nın değişimi hareketli faz, hareketli fazın akış hızı ve sabit faza bağlıdır.

Yine eşitlik 2.15'ten de görüldüğü gibi  $\alpha$  ile  $R_s$  doğru orantılıdır, ancak  $\alpha$  belli bir değere ulaştıktan sonra  $R_s$  değerinde herhangi bir değişim olmaz, bu noktada alıkonma faktörü devreye girer, yani farklı alıkonma zamanlarına ait maddeler sayesinde ayrılma gerçekleşir.

#### vi. Pik Simetrisi

Yapılan çalışmalarda daima simetrik pikler seçilmelidir. Analitin hareketli fazdaki derişimiyle ( $C_H$ ) sabit fazdaki derişimi ( $C_s$ ) grafiğe geçirildiğinde çeşitli sonuçlar ortaya çıkabilir. Buna göre temel izoterm şekilleri ve pik şekillerine etkileri Şekil 2.9'da gösterilmektedir.



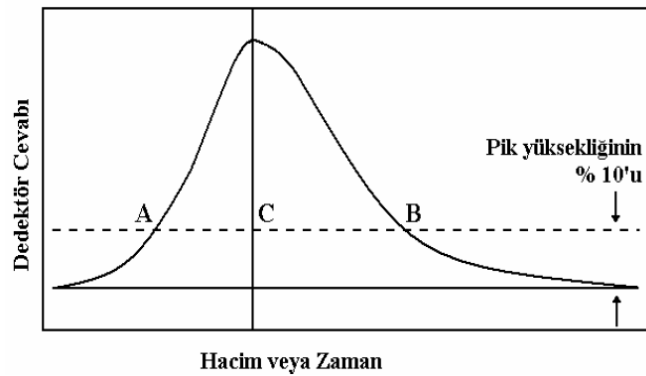
Şekil 2.9. Temel izoterm şekilleri ve pik şekillerine etkileri

Şekil 2.9 (a)'da görülen sabit faz izotermi doğrusaldır ve burada hesaplanan eğim dağılım katsayısına eşittir ( $K$ ). Burada tüm  $C_H$ 'larda  $K$ 'nın sabit olduğu düşünüldüğünde tüm derişimlerde bant hızı değişmez ve dedektör cevabına bakıldığında analit piki simetrik bir yapıda olur.

Şekil 2.9 (b)'de görülen sabit faz izotermi dışbükeydir ve kolonda maddenin çok tutunduğunu gösterir. Bu da K değerinin artmasına neden olur ve dedektör cevabına bakıldığında ise pikin önünde bir alan oluştuğu görülür. Bu oluşum ön kuyruklanma olarak adlandırılır. Burada maddenin derişimi ne kadar fazlaysa  $t_R$  de o kadar çok olacaktır.

Şekil 2.9 (c)'de izoterm içbükeydir ve kolonda maddenin az tutunduğunu gösterir. Bu durumda da K değerinin düşmesine ve pikin çıkışında alan oluşmasına neden olur. Bunda da maddenin derişimi arttıkça  $t_R$  azalır.

İzotermiler doğrusallıktan saptıkları zaman nicel analiz güçleşir, bu yüzden doğrusal izoterm ve simetrik pikler elde etmek için pik asimetri oranına (PAO) bakılır ve kromatografik koşullar buna göre düzenlenir. Pik asimetri oranının hesaplanması için verilen örnek grafik Şekil 2.10'da gösterilmektedir.



**Şekil 2.10.** Pik asimetri oranının hesaplanması

PAO şu şekilde hesaplanır:

$$PAO = \left(\frac{CB}{AC}\right) \quad (2.16)$$

CB ve AC aralıklarının uzunluk gösterimi Şekil 2.10'da belirtilmiştir.

Pik asimetri değeri için, tabandan pikin tepe noktasına kadar dik bir hayali çizgi çizilir ve bu çizginin %10'unda x-eksenine paralel bir çizgi çizilir. Piki kestiği noktalar arasındaki uzaklıklar AC ve CB olarak adlandırılır. Düzgün ve tam simetrik bir pik,  $PAO = 1$  olduğunda belirlenir. Düzgün varsayılan pikler için pratikte PAO değerinin 0.9 – 1.2 arasında olması beklenir.

Genellikle bir kromatogramda geç gelen pik önde gelen pike göre yayvan ve geniş olur. Burada  $t_R$ 'nın artırılması ise pik şeklini bozabileceğinden,  $t_R$  düşürülüp

hareketli fazın bileşimi veya akış hızıyla ilgili değişiklikler yapılarak ya da gradiyent akış geçirilerek pik şekli düzeltilebilir.

### **2.2.5. Hareketli Fazın İçeriğinin Kromatografik Ayrım Etkisi**

Sıvı kromatografide iyi bir ayırım olması için öncelikle uygun çözücüler seçilmelidir. Ayrılması istenen maddenin alıkonma faktörünü değiştirmek de bir diğer seçenektir. Ancak birden fazla madde ayrılmak isteniyorsa, tek bir alıkonma faktörü ile hareketli fazın seçiciliği yeterli olmaz. Bu noktada hareketli fazın bileşimini değiştirmek gerekir. Ayırımın daha iyi olması için hareketli faza ilave edilen maddelere düzenleyiciler denir. Hareketli faz olarak su ve organik çözücü karışımlarının kullanıldığı kromatografik sistem ters faz sıvı kromatografisidir. Organik düzenleyiciler genellikle asetonitril, metanol veya tetrahidrofuran gibi düşük polariteli çözücülerdir. Bazen bu şekilde hareketli fazın seçiciliğini düzenlemek de yeterli olmaz çünkü kullanılacak organik çözücüler sınırlıdır, o zaman organik düzenleyicinin türünü değiştirerek seçicilik ayarlanabilir. Bu durumda düzenleyici olarak tampon çözeltiler kullanılır ve hareketli fazın pH'ı ayarlanarak zayıf baz ve asitler için seçicilik düzenlemesi yapılmış olunur.

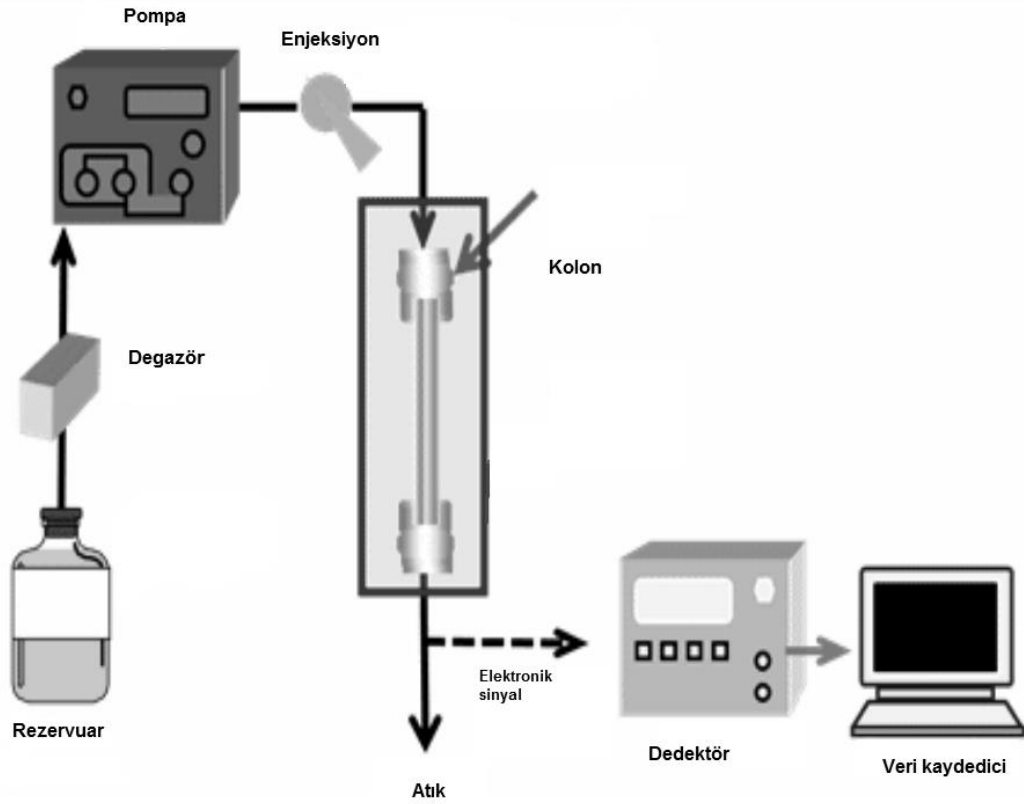
### **2.2.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

HPLC'de kullanılan hareketli faz yapısı sıvı, sabit fazın yapısı ise katı halde bir materyal veya katı bir materyal üzerine bağlanmış sıvı bir tabakadır. Hareketli faz kolona basınç yardımıyla iletilir. Kolon boyunca sıvının ilerlemesini sağlamak için de yüksek basınçlar gerekli olduğu için bu yöntem, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi de denmektedir.

Bu yöntemin yaygın kullanılmasının en önemli nedenleri, yüksek hızlı ve yüksek derecede ayırıcı bir yöntem olması, kullanıcıya yüksek kesinlik, yüksek duyarlılık ve yüksek seçicilik sunması, nicel analizlerin kolaylıkla uygulanabilir olması, kolay bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması, endüstrinin birçok alanında birçok bileşene uygulanabilirliğidir. Bu bileşenlere örnek olarak, ilaçlar, aminoasitler, proteinler, karbonhidratlar, hidrokarbonlar, nükleik asitler, çeşitli organik ve inorganik bileşenler verilebilir.

### 2.2.7. HPLC Cihazı Bölümleri

HPLC cihazının bölümleri hareketli fazın konulduğu rezervuar bölümü, degazör, pompa, enjeksiyon bölümü, kolon, dedektör, veri kaydedici ve atık bölümünden oluşur ve Şekil 2.11’de gösterilmiştir. HPLC sisteminde kullanılan kimyasalların korozif etkisi olabileceği için sistemdeki tüm malzeme korozyona dayanıklıdır.



Şekil 2.11. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının bölümleri

#### i. Hareketli Faz (Rezervuar Bölümü)

Bir HPLC sisteminde bir veya daha fazla hareketli faz kullanılabilir. Hareketli fazın görevi, analiz edilecek maddenin (analitin), enjektörle alınıp kolon boyunca ilerlemesini sağlamaktır. Hareketli faz genellikle tampon çözeltiler, su, asetonitril, metanol, organik çözücüler veya bunların karışımlarından oluşur. Hareketli fazlar sisteme yerleştirilmeden önce mutlaka ultrasonik sonikatör cihazlarında sonike

edilmeli; eğer tampon veya tuz çözeltisi ise, sistemde katı parçacıkların sebep olacağı tıkanma riskine karşı mutlaka hareketli faz filtrasyonu ile süzülmalıdır.

Hareketli fazın bileşimi ve pH değeri alıkonmayı ve seçiciliği etkiler. Bu yüzden geliştirilen metoda, kullanılan analite ve kolon tipine göre hareketli faz seçilmelidir.

Hareketli fazın sistem boyunca akış hızı ve bileşimi sabitse izokratik akış; akış hızı, bileşim içeriği ve oranları değişkense buna gradiyent akış denir.

## ii. Gaz Giderici

Gaz giderme işlemi, hareketli fazdaki çözülmüş gazları ortadan kaldırmak ve ayırma sırasında pompa veya dedektörde kabarcık oluşup tıkanma olasılığını azaltmak için kullanılır. Dedektörde kabarcık oluşumunu önlemek için, hareketli faz kuvvetlice karıştırılarak dolu rezervuara birkaç dakika vakum uygulanarak gaz giderme işlemi gerçekleştirilebilir (32).

## iii. Pompa

HPLC sisteminin en önemli bölümlerinden birisi pompadır. Sistem içerisinde hareketli fazın akışının sabit olmasını ve kolon boyunca ilerlemesini sağlar. İki tür pompa kullanılır:

**Sabit hacimli pompalar:** Genel olarak tatmin edici performansları nedeniyle, günümüzde HPLC uygulamalarında en yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu pompalar, çözücü akışını kolonun geri basıncına karşı yönlendirmek için ileri geri hareket eden pistonlara veya esnek diyaframlara sahip küçük hacimli (35 – 400 µL) hazneler kullanır. Bunlardan bazıları, akış titreşimini azaltan özel tahrik mekanizmalarına sahip, bazıları ise hassas akış dağıtımı için özel özelliklere sahip olan çeşitli tipte pistonlu pompalardır. Yaklaşık 10.000 psi'ye kadar çıkış basınçlarına sahip modeller mevcuttur, analitik uygulamalar için oldukça uygundur (32).

Pompa sabit hacim sağladığı için akış da izokratiktir, yani hareketli fazın bileşimi sabittir. Bu tip sistemlere izokratik sistem denir. Dolayısıyla sabit hacimli pompalar genellikle izokratik sistemler için kullanılır.

**Sabit basınçlı pompalar:** Sistemin analiz boyunca aynı basınçta çalışması prensibine göre tasarlanmış pompalardır.

Sabit basınçlı pompanın en basit biçiminde gaz basıncı, boru bobini gibi bir rezervuarda tutulan hareketli faza uygulanır. Bu tür pompalarla ilgili olası bir sorun, gazın yüksek basınç altında çözünmesi ve böylece rezervuar hacminin yalnızca üçte ikisinin kullanıma hazır olmasıdır; kalan solventteki çözülmüş gaz, dedektör hücresinde kabarcıklar oluşturacaktır (32).

Bu tip pompalarla hareketli fazın bileşimi zamanla değiştirilebilir, buna gradient sistemler denir. Pompa basıncı sabit tutulduğu için hareketli fazın akış hızını içeriğindeki orana veya bileşimindeki değişime göre ayarlar.

#### **iv. Enjektör**

HPLC’de kullanılan enjeksiyon sistemleri yüksek basınç altında çalışılabildiği için yüksek basınçtan etkilenmeyecek ve paslanmaz çelik yapıda olmalıdır. Enjektör sistemlerinde kullanılan hacim aralığı genellikle 0.1 – 100 µL arasında değişir. Bu aralık, enjektörün çeşidi değiştirilerek ayarlanabilir. Enjeksiyon kısmında görev alan önemli kısımlar şunlardır: Enjeksiyon iğnesi, çözücü iğnesi, enjeksiyon valfi, loop.

Enjeksiyon iğnesi, numune haznesindeki analiz edilecek analitin olduğu bölmeden, ayarlanmış miktarda numuneyi çekip enjeksiyon valfine gönderir. Çözücü iğnesi, enjeksiyon valfi kısmındadır ve analizde çeşitli taşınma ve kirlilik riskini azaltmak veya sıfıra indirmek için yıkama çözücüyle her analizde yıkanır. Enjeksiyon valfi, kolon ile dedektör arasında numunenin geçtiği bağlantıyı sağlar. Loop kısmı ise, enjeksiyon valfi içerisinde iğnenin çekebildiği maksimum numune miktarını barındırır. Burada, enjeksiyon için belirlenen analit miktarı, loop içerisinden alınarak analizlenmek üzere kolona gönderilir.

Enjeksiyon sistemleri iki çeşittir: Bunlar manuel enjeksiyon ve otomatik enjeksiyondur.

**Manuel enjeksiyon:** Analizci analizi kendisi kontrol eder, enjeksiyon miktarı her analizde değiştirilebilir. Analizci farklı hacimlerde numune bölmesi kullanabilir. Ancak tekrarlanabilirliği düşüktür.



**Otomatik enjeksiyon:** Herbir analizde aynı enjeksiyon miktarı olacağı ve istenildiği kadar analiz enjeksiyonu yapılabileceği için tekrarlanabilirlik yüksektir. Enjeksiyon miktarının tekrarlanabilirliği kesinliğin iyi olduğunu gösterir. Kesinliği iyi olan numunenin doğruluk parametresi düzgün çıkmaktadır.

#### v. Kolon

Sistemin birçok bölümü gibi kolon kısmının yapısı da olası korozif etkilere karşı paslanmaz çelikten olmalıdır. Kolon iç çapı genellikle 2 – 10 mm, uzunluğu 20 – 30 cm civarındadır. Dolgu maddelerinin çapı ise genellikle 3 – 20 µm civarındadır.

Ayrılmış numune bantlarının minimum genişlemesini sağlayan yüksek performanslı kolonlar, HPLC sisteminin kalbidir.

En yüksek kolon verimi şu şekilde elde edilir (32):

- Yoğun, sıkıca sıkıştırılmış ve düzgün bir kolon yatağı sağlayan kolon dolgusu kullanmak,
- İlave bir sabit faz katmanının gerekli olduğu durumlarda ince, geçirgen kaplamalar kullanmak,
- 5 – 10 µm çapında küçük parçacıklı dolgular kullanmak.

HPLC için kolon dolguları aşağıdaki özelliklere göre sınıflandırılabilir (32):

- Sert katılar (silika, alümina), sert jeller veya yumuşak jeller
- Gözenekli ve peliküler gözenekli parçacıklar
- Küresel veya düzensiz parçacıklar

Silika veya alümina yapısındaki sert katılar, günümüzde kullanılan çoğu HPLC kolon dolgu maddesinin temelini oluşturur. Bu tür dolgu maddeleri, küçük parçacıklardan oluşur ve nispeten yüksek basınçlara (10.000 – 15.000 psi) dayanabilir. Bu silika parçacıkları çeşitli boyutlarda, şekillerde ve değişen gözeneklilik derecelerinde olabilir. Ayrıca, çeşitli fonksiyonel gruplar veya polimerik katmanlar silika yüzeyine kolayca eklenebilir, böylece bu parçacıkların uygulamalardaki kullanımı genişletilebilir (32). Örneğin, silika ve alümina gibi bu sert katılar yapısındaki –OH grubu nedeniyle polar yapıda birer dolgu maddesidir. Normal faz sıvı kromatografisinde, bu tip dolgu maddeleri hareketli fazın apolar yapıda olduğu zaman kullanılır. Bir başka deyişle, polariteyi artıran –OH grubu yerine, apolar özellik kazandıran –C<sub>18</sub>H<sub>35</sub> grubuna sahip bir organik dolgu maddesi

kullanılırsa, yani sabit faz apolar hale getirilirse, hareketli fazın da polar yapıda bir çözücü ile değiştirilmesiyle sistem ters-faz sıvı kromatografisi olarak değiştirilmiş olur.

Gözenekli dolgu maddeleri preparatif uygulamalar için kullanılırken, peliküler dolgu maddeleri daha çok analitik uygulamalarda kullanılır. Peliküler dolgu maddeleri kolona yüksek verimlilik sağlar: Kolonun dengeye gelme hızı yüksektir dolayısıyla dolgu maddesi arasında kütle aktarımı hızlıdır.

## vi. Dedektör

HPLC sisteminde kolon çıkışında madde analizi gereksinimini sağlayan kısım dedektördür. İdeal bir dedektör şunlara sahip olmalıdır (32):

- Yüksek hassasiyete sahip olma
- Tüm çözünen maddelere yanıt verme ve öngörülebilir özgüllüğe sahip olma
- Geniş bir doğrusallık aralığına sahip olma
- Sıcaklık değişimi ve hareketli faz akışındaki değişikliklerden etkilenmeme
- Hareketli fazdan bağımsız olarak yanıt verme
- Sütun dışı bant genişlemesine katkıda bulunmama
- Güvenilir ve kullanımının rahat olması
- Çözünen madde miktarıyla doğrusal olarak artan bir tepkiye sahip olma
- Çözünen maddeye zarar vermeme
- Tespit edilen pik noktası hakkında niteliksel bilgi sağlama
- Hızlı yanıt verme

HPLC dedektörlerinin iki genel türü kullanılır:

**Madde ile İlgili Dedektörler:** Hareketli faz ve içindeki çözünenin bazı genel fiziksel özelliklerindeki değişikliği ölçer. En bilinen türleri şunlardır:

- Fotometrik (UV/GB dedektörler, fotometrik türündeki dedektörlere iyi bir örnektir)
- Ayrım sonrası tepkimeye girenler
- Elektrokimyasal
- Elektron yakalayıcılar

- Radyoaktivite
- Kütle spektrometre dedektörleri

**Cözelti ile İlgili Dedektörler:** Maddenin içinde çözündüğü ortamın özelliklerinin ölçülmesine yönelik dedektörlerdir. En çok kullanılan çeşitleri şunlardır:

- Yoğunluk
- Dielektrik sabiti
- Kondüktivite
- Refraktif indeks

Hangi dedektörün kullanılacağı geliştirilen yöntemeye göre değişir. Bu çalışmada tercih edilen dedektör UV/GB dedektörüdür.

### **UV/GB Dedektör**

HPLC’de sıklıkla yer alan organik bileşiklerin absorpsiyonları da yüksektir, bu yüzden UV/GB ışığı absorpsiyonu prensibine dayanan UV/GB dedektörüyle yüksek duyarlılıkta çalışılabilir. Bunun yanında, sıcaklık değişimlerine fazla duyarlı olmaması ve geniş bir doğrusal aralığa sahip olması sayesinde tercih edilebilir bir dedektör tipidir.

UV/GB dedektörlerinin bazıları sabit dalga boylu bazıları da değişken dalga boyludur. Sabit dalga boylu dedektörlerde, dalga boyunun tespit edilmesinde interferans filtreleri kullanılabilir. Ultraviyole kaynağı olarak civa lambası kullanılır. Dalga boyu değiştirilebilir dedektörlerde ise döteryum lamba (190 – 400 nm) veya kuartz – iyot lamba, volfram lamba (350 – 700 nm) kullanılır.

Önemli bir UV/GB türü olan DAD (dizi diyot dedektör), gelişmiş ultraviyole ve görünür bölge dedektör çeşididir. İçinde döteryum lambası kullanılır ve lambadan geçen ışık dedektörün içindeki akış kısmına gider. Optik ağ üzerinde dağılan bu ışık, içerisinde birçok diyot bulunan foto diyot dizisi üzerine düşer. Dolayısıyla, DAD’lar birden fazla dalga boyunda ölçüm alabilir, bu yüzden analizlenen maddelerin dalga boyları da birbirinden farklı olduğu için, kromatografide saflık tayininde sıklıkla kullanılır.

### 2.3. Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAID)

Bireyleri uykuya sokmadan ya da bilinçlerini kaybetmeden ağrı impulslarının algılanmasının azalması veya engellenmesi durumuna analjezi, bu ağrı hissiyatının bilinç düzeyinde algı eşiğini yükselten veya bu hissiyatı engelleyen ilaçlara da analjezik ilaç denir. Analjezik bileşiklerin genel anestezi etkileri yoktur. Analjezik ilaçlar narkotik analjezikler (opiooidler) ve steroid olmayan (nonsteroidal) antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID) veya narkotik olmayan analjezik ilaçlar olarak ikiye ayrılır.

NSAID'lerin kullanımını kısıtlayan faktörlerden biri midedeki prostaglandin inhibisyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan gastrointestinal (sindirim sistemi) yan etkilerdir. Bir organizmada hücrelerde oluşan ağrı ve iltihapta rolü olan kimyasallara "prostaglandin" denir. Vücutta ağrıyı artırma, iltihaplanmaya neden olma, kan akışını ve kan pıhtılaşmasını artırma gibi etkiler prostaglandinin görevlerinden sadece birkaçıdır. Siklooksijenaz enzimi (COX) prostaglandin oluşumundaki temel bir enzimdir ve NSAID'lerin primer çalışma prensibi bu COX enziminin inhibe olması temeline dayanır. Yani NSAID'lerin etki mekanizması aslında, bu endojen medyatörün sentezini inhibe etmektir.

İnsan vücudunda COX enzimi iki çeşitte bulunmaktadır.

1. COX-1 enzimi: Vücutta tüm dokularda kendiliğinden var olan ve gerekli durumlarda kullanılan bir enzimdir. Kan yoğunluğunun ayarlanması, mide içyapısının düzenlenmesi, çeşitli iç organların fonksiyonlarının düzenlenmesinde kullanılır.
2. COX-2 enzimi: Ağrı ve iltihaplanma sonucu prostaglandin medyatörünün sentezlenmesi için açığa çıkan bir enzimdir. COX-2 enzimine enflamasyonlu dokularda rastlanmıştır. COX-2 arttığı zaman prostaglandin miktarı artar ve vücutta ağrı hissedilmeye başlanır. NSAID'lerin asıl hedef noktası COX-2 enzimini azaltmaktır. Ancak kullanılmakta olan NSAID'lerin hepsi COX-1 ve COX-2 enzimlerinin ikisine karşı inhibisyon göstermektedir. Bu sebeple, NSAID'lerin ciddi yan etkileri bulunmaktadır.

### 2.3.1. NSAID'lerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması (33)

#### 1. Karboksilik asitler:

- a) Salisilik asit ve esterleri: Aspirin, diflunisal
- b) Antranilik asit türevleri: Flufenamik asit, mefanamik asit

#### 2. Asetik asitler:

- a) Fenilasetik asit: Diklofenak, fenklofenak
- b) Karbo ve heterosiklik asitler: İnfometazin, etodolak, sulindak, tolmetin

#### 3. Propanoik asit: İbuprofen, ketoprofen, flurbiprofen, suprofen, naproksen, fenoprofen, tiaprofenik asit

#### 4. Fenamik asitler: Flufenamik, mefanamik, meklofenamik

#### 5. Enolik asitler:

- a) Pirazolonlar: Fenilbutazon, oksifenbutazon, azapropazon
- b) Oksikamlar: Piroksikam, isoksikam, sudoksikam

#### 6. Nonasidik ajanlar: Prokuazom, tramid, pflunizol, naubmetan

### 2.3.2. NSAID'lerin Yan Etkileri

#### **Gastrointestinal yan etkiler:**

NSAID'lerin en sık karşılaşılan yan etkileri gastrointestinal yan etkilerdir. Gastrik asit miktarını artırır, mide mukoza seviyesini ve midede bikarbonat seviyesini düşürür; dolayısıyla, mide bulantısı, kusma, reflü, gastrik erezyon, hazımsızlık, kanama gibi sorunlara yol açabilir.

#### **Böbrekler üzerine yan etkileri:**

Prostaglandin sentezinin azalması vücutta sodyum artışına ve su tutulumuna sebebiyet verdiği için kilo alımı, ödem, potasyum dengesinde bozulma (hiperkalemi) gibi yan etkilere neden olabilir.

#### **Hepatotoksik etkiler:**

NSAID'lerin hemen hemen hepsinin hepatotoksik yan etkileri bulunmaktadır. Bunun sebebi COX inhibisyonu değil, ilacın yarılanma ömrü ve vücuttan atılma süresi ile ilgilidir.

### Merkezi sinir sistemi üzerine yan etkiler:

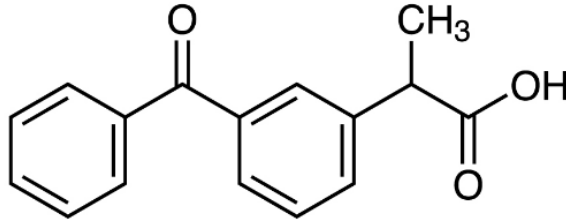
Baş ağrısı, baş dönmesi, sersemlik, tinnitus (kulakta çınlama, uğultu), işitme kaybı, konfüzyon (kafa karışıklığı, dikkat eksikliği) halüsinasyon görülebilmektedir.

## 2.4. Ketoprofen

Bu tez kapsamında, bir NSAID olan KET, HPLC'de insan plazmasından analizi için yöntem geliştirilmesi amacıyla incelenecektir.

### 2.4.1. Ketoprofenin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

KET, NSAID'lerin propanoik asit sınıfındandır. KET kimyasal olarak (RS)-2-(3-benzoylphenil) propanoik asit yapısındadır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. KET'in kimyasal yapısı

KET'in kimyasal yapı formülü  $C_{16}H_{14}O_3$ , moleküler kütlesi 254.281 g/mol'dür. Elementel analiz verilerine göre %68.25 C, %5.08 H, %26.67 O içerir. KET, 93 – 96 °C arasında eriyen, kokusuz, beyaz veya beyaza yakın kristalize toz halindedir. Aseton, etanol, metilen klorür ve güçlü alkali pH'ta çözünür. pH'a bağlı çözünürlük profili nedeniyle suda ve asidik koşullarda az çözünür. Zayıf çözünürlüğün genellikle biyoyararlanımda azalmaya yol açtığı ve ilaç formülasyonunda büyük bir zorluk oluşturduğu bilinmektedir (34).

### 2.4.2. Farmakodinamik Özellikleri

KET analjezik ve antipiratik özellikleri olan antiinflamatuvar bir ilaçtır. Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların propanoik asit grubuna dahildir. Prostaglandin sentezini inhibe ederek antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etki gösterir.

### 2.4.3. Farmakokinetik Özellikleri (35)

İnsan farmakokinetik çalışmaları, oral olarak uygulanan KET'in hızla emildiğini, metabolize edildiğini ve atıldığını göstermiştir. Emilim %90'dan fazladır. Çoğu kişide plazmada maksimum konsantrasyona 1 – 2 saat içinde ulaşılır. Toplam biyoyararlanım, 75 – 200 mg aralığında dozla orantılıdır. Yarı ömrü sağlıklı genç bireylerde yaklaşık 2 saattir ve plazmada maksimum konsantrasyona ulaştıktan yaklaşık 2 saat sonra yavaş yavaş azalır, yani dozlamadan 4 saat sonra plazma seviyelerini aşar. Kan akışında, KET proteine (çoğunlukla albümine) %99 oranda bağlanır.

KET vücuttan çoğunlukla idrarla atılır. Yaşlı deneklerde (65 yaş ve üstü) vücuttan atılımının daha uzun sürdüğü, dolayısıyla eliminasyon yarılanma süresinin 3 – 5 saate kadar çıktığı gözlemlenmiştir. Hatta romatoit artriti olan yaşlı hastalarda yarılanma ömrünün ilacın toksik birikimini önleyecek kadar kısa olduğunu ve bu kişilerde rutin bir doz ayarlamasının gerekli görülmediğini göstermektedir.

### 2.4.4. Antiinflamatuvar Özellikleri

İnflamasyon, birtakım zararlı kimyasalların, bazı çevresel faktörlerin veya bulaşıcı hastalıkların neden olduğu bir vücut tepkisidir. İltihaplanma olarak bilinir. KET, NSAID grubuna dahil ağrı kesici, ateş düşürücü ve inflamasyonu azaltıcı etkisi sebebiyle kullanılır.

#### **Klinik olarak:**

- Oral KET artrit ağrısı, osteoartrit, eklem sertliği, yumuşak doku romatizması ve spor yaralanmaları dahil olmak üzere kas ve eklemlerdeki

kas-iskelet ağrısı ve iltihaplanmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (36).

- Yüksek ateşi düşürmede,
- İnflamasyon durumunu yok etme veya azaltmada etkili olduğu için iltihaplı eklem hastalıklarının tedavisinde kullanılır (romatoit, osteoartrit gibi).

#### **2.4.5. Ketoprofenin Yan Etkileri (37, 38)**

NSAID ilaçların hepsinin yan etki yelpazesi hemen hemen aynıdır ve KET bireylerde diğer NSAID'leri kullanan bireylerdekine benzer yan etkiler gösterebilir. Ancak KET'in yan etkileri her ilaçta olduğu gibi bireyden bireye göre farklılık gösterebilir.

- En sık görülen yan etkiler, hastaların %13'ünde gözlenen bulantı ve kusmadır.
- 65 yaş üstü 314 hastada yapılan başka bir çalışmada yan etkilerin çoğunun sindirim sistemini (%28.2) etkilediği görülmüştür. Kalan oranlar da sırasıyla %4 oranda merkezi sinir sistemini, %3.2 oranda kardiyovasküler sistemi etkilediği saptanmıştır. Ülserasyon ve kanama gibi gastrointestinal yan etkiler %1.7 oranında bulunmuştur.
- KET'in genel yan etkileri;
  - o Kabızlık
  - o İshal
  - o Mide yanması
  - o Mide ağrısı
  - o Ağızda yaralar
  - o Baş ağrısı
  - o Baş dönmesi
  - o Sinirlilik
  - o Uyuşukluk
  - o Uykuya dalmakta veya uykuda kalmada zorluk
  - o Kulak çınlaması



#### 2.4.6. Endikasyonları

KET içeren ilaçlar;

- Osteoartrit ve romatoit artrit gibi eklem iltihapları
- Romatizmal ateş
- Bel, sırt, omurga ağrıları
- Boyun, baş, tendinit, burkulma ve diğer kas-iskelet sistemi ağrıları
- Diş ağrıları ve çeşitli periodontal ağrılar
- Soğuk algınlığı ve gribal enfeksiyonlara bağlı ateşli durumlar
- Menstrual ağrılar
- Migren ağrıları gibi durumlarda kullanılır.

#### 2.4.7. Kontrendikasyonları

KET, NSAID'lere karşı hipersensitivitesi olan kişilerde, mide ve bağırsak ülseri olanlarda, gastrointestinal kanama ve perforasyon geçmişi olanlarda, böbrek ve karaciğer yetmezliği olanlarda, kardiyovasküler hastalıkları ve kalp yetmezliği olan kişilerde, gebelikte, emzirme döneminde ve astımı olan kişilerde KET kontrendikedir ve kullanılmamalıdır.

#### 2.4.8. İlaç Etkileşimleri

Metatreksat ve sisplatin gibi kanser ilaçlarıyla birlikte alındığında plazma proteinlerinden ayrılma ve böbreklerin klirensindeki azalmadan dolayı hematolojik olarak toksik etkileri artırabilir ve bunun sonucunda ölümcül olabilir. Yüksek dozlarda salisilat ve diğer NSAID'lerle birlikte alındığında, gastrointestinal sistemde kanamalara neden olabilir. Lityumla birlikte alındığında plazmadaki lityum miktarını toksik değerlere kadar çıkarabilir. Bu yüzden, lityum dozu ayarlanarak KET kullanılmalıdır.

#### 2.4.9. KET'in Kaynaklarda Yer Alan Analiz Yöntemleri

Negru ve diğ. (1), asetonitril ve %1'lik trifloroasetik asit karışımı (55:45, h:h) ve Zorbax SB-C<sub>18</sub> kolonla kromatografik ayırım gerçekleştirmişlerdir. İnsan kan plazmasından KET'i protein çöktürme ekstraksiyon yöntemiyle ayırmışlardır.

HPLC’de ve UV dedektörde 257 nm’de analizlemişlerdir. Bu çalışmaya ait geri kazanım %96.5 – 103.6 arasında bulunmuştur.

Allegrini ve diğ. (8), pH’ı 3.5’a ayarlanmış asetonyril ve 0.01 M’lık potasyum dihidrojen fosfat karışımı hareketli fazı ve monolitik kolon ile kromatografik ayırma yapılmıştır. KET insan kan plazmasından metanol ve su (1:1, h:h) karışımı ile katı faz ekstraksiyonu yöntemiyle ayırım yapılmıştır. Analiz HPLC’de DAD dedektörde 254 nm’de tayin edilmiştir.

Kotthireddy ve Devi (15), pH değeri 6.5 olarak ayarlanmış 0.01 M derişimindeki, sodyum dihidrojen fosfat:metanol:asetonyril hareketli faz karışımını (4:3:3, h:h:h) oranında kullanarak, ODS kolon ile ayırımı sağlamışlardır. Koyun kan plazması üzerine standart KET çözeltisi ekleyip, dietil eter ve kloroform karışımı kullanarak (4:1) (h:h) sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ketoprofeni ayırmışlardır. RP-HPLC sisteminde, 265 nm’de UV dedektörü ile analizlemişlerdir.

Zafar ve diğ. (39), pH’ı fosforik asitle 3.3’e ayarlanmış metanol ve su (70:30, h:h) hareketli fazı ile Discovery HS C<sub>18</sub> kolonla kromatografik ayırım gerçekleştirmişlerdir. İnsan kan plazmasından KET’i asetonyril ile protein çöktürme ekstraksiyon yöntemiyle ayırmışlardır. Analiz RP-HPLC’de ve UV dedektöründe 260 nm’de analizlenmiştir. Bu çalışmada alt tayin sınırı 0.244 µg/mL olarak saptanmıştır. Geliştirilen yöntem yüksek kesinlik ve doğruluk değerleri içermektedir ve geri kazanımı %99’dur.

Tsvetkova ve Peikova (40), kromatografik ayırma işlemi için LiChrosorb C<sub>18</sub> kolonu kullanılmış ve metanol:0.1 M amonyum asetat tamponu (pH 6.9):asetonyril:tetrahidrofuran karışımını (73:20:5:2, h:h:h:h) hareketli faz olarak kullanmışlardır. KET hareketli faz karışımında çözülmüş ve HPLC sisteminde UV dedektörle 230 nm’de analizlenmiştir. Bu yöntemin geri kazanımını %99 olarak belirlemişlerdir. LOD değerini 0.5 µg/mL olarak saptamışlardır.

Hayball ve diğ. (41), KET’in kan plazmasından ekstraksiyonu için n-heksan, dikloro metan ve etil asetat ile türevlendirme yapmışlardır. Taşınabilir faz olarak asetonyril:asetat tamponu (10.0 mM derişiminde ve pH 3) (50:50, h:h) oranında ve silika içeren SGE cam astarlı HPLC kolunu kullanmışlardır. UV dedektörde 260 nm’de analizlemişlerdir.

Lopez ve diğ. (42), katı faz ekstraksiyonu yöntemini kullanmışlardır. Hareketli faz olarak heksan, etanol, asetik asit (93:7:0.5, h:h:h) karışımı ve kolon olarak da paslanmaz çelik kolon kullanmışlardır. HPLC ve UV dedektörde 254 nm'de analizlenmiştir. Geliştirilen bu yöntem çok yüksek geri kazanım değerleri içermektedir. Çalışmalarında ulaşılan LOQ değeri 0.25 µg/mL'dir.

Jamali ve diğ. (43), hareketli faz olarak heksan, izopropanol ve trifloroasetik asit karışımı (90:10:0.1, h:h:h) ve kiral kolon kullanmışlardır. Sıçan kan plazması kullanmışlar ve KET'i sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ayırmışlardır. KET, HPLC sisteminde UV dedektörle 254 nm'de analizlenmiştir.

Wanwimolruk ve diğ. (44), hareketli faz olarak asetonitril, metanol ve su karışımı (15:20:65, h:h:h) ve kolon olarak da C<sub>18</sub> mikrobör kolon kullanmışlardır. KET insan kan plazmasından sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ayrılmıştır. Analiz, UV dedektöründe 258 nm'de gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmadaki geri kazanım %85 olarak hesaplanmıştır.

Kaynaklarda yer alan analiz yöntemlerine ait bilgiler ve bulgular Tablo 2.3'te özetlenmektedir.

**Tablo 2.3.** Analiz yönteminin diğer kaynaklardaki yöntemlerle karşılaştırılması

Kaynak No.	Ayrırma Yöntemi	Hareketli Faz Bileşimi, Oranı, Tampon pH'ı	Akış Hızı (mL/dk)	Kolon	Dedektör Dalga boyu (nm)	Geri Kazanım %	Doğrusallık Aralığı (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	% BH gün içi	% BSS Gün içi
1	Protein çöktürme	Asetonitril:% 1'lik Trifloroasetik asit, 55:45	1.5	Zorbax SB C18 (100 mm x 4.6 mm i.ç., 3.5 µm)	257	96.5-103.6	0.15-19	0.15, -	2.3, 6	4.8, -
8	Katı faz ekstraksiyonu	Asetonitril:0.01 M Potasyum dihidrojen fosfat, 40:60, 3.5	5.0	Onyx monolitik C18 (100 x 4.6 mm i.ç.)	254	78.1	0.001-0.5	0.01, -	-	2.9-12.7, 3.5-10.2
15	Sıvı sıvı ekstraksiyon	Sodyum dihidrojen fosfat:Metanol: Asetonitril, 40:30:30, 6.5	0.5	Spherosorb ODS (100 mm x 4.6 mm i.ç.; 5µm)	265	-	0.1-1	-	-	-
39	Protein çöktürme	Metanol:Su, 70:30, 3.3	1.0	Discovery HS C18, (250 mm x 4.6 mm i.ç., 5 µm)	260	99.0	0.24-125	0.24, 0.12	0.3, 0.7	0.98-0.99, 0.98-0.99
40	Protein çöktürme	Metanol:0.1 M Amonyum asetat:Asetonitril: Tetrahidrofuran, 73:20:5:2, 6.9	1.0	LiChrosorb C18 (250 mm x 4.6 mm i.ç., 5 µm)	230	99.0	5-100	-	-	0.62, 1.32
41	Sıvı sıvı ekstraksiyon	İzopropil alkol: n-Heptan, 8:92	1.0	SGE (250 mm x 4 mm i.ç., 5 µm)	260	-	-	0.15, -	-	-
42	Katı faz ekstraksiyonu	Heksan:Etanol: Asetik asit, 93:7:0.5	1.5	Whelk O1 (250 mm x 4.6 mm i.ç., 5 µm)	254	108-115	0.25-12.5	0.25, -	12, -	11.0-14.5, 5.5-8.5
43	Sıvı sıvı ekstraksiyon	Heksan:İzopropanol:T rifloroasetik asit, 90:10:0.1	1.0	Chiralpak AD (250 mmx4.6 mm i.ç.)	254	-	0.05-5.0	0.03, -	0.7-2.0, 7.6-8.6	-
44	Sıvı sıvı ekstraksiyon	Asetonitril:Metanol:D isodyum hidrojen fosfat, 15:20:65	0.5	ODS Hypersil (100 mm x 2 mm i.ç., 5 µm)	258	85.0	0.05-10	0.05, -	-	-

### 3. GEREÇLER VE YÖNTEM

#### 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

##### 3.1.1. Cihazlar

HPLC sistemi:

- Pompa: Shimadzu LC – 20AB
- Oto örnekleyici: Shimadzu SIL – 20AC
- Kolon Fırını: Shimadzu CTO – 20AC
- UV Dedektör: Shimadzu SPD – M20A
- Data Analizörü: Shimadzu LC Solution Software

Hassas Terazı: Mettler Toledo AG 285

pH Metre: Mettler Toledo MA 235

Otomatik Mikropipet: Eppendorf (10-100/100-1000 µL)

Ultrasonik Banyo: Bandelin, Sonorex, RK514 BH

Santrifüj: Hettich, EBA 20

Vortex Karıştırıcı: IKA Vorteks Genius 3

Saf Su Sistemi: Barnstead NanoPure Diamond

Buzdolabı: Bosch

Manyetik Karıştırıcı: Hotplate Stirrer

##### 3.1.2. Kimyasal Maddeler

Ketoprofen: C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>

Metanol: CH<sub>3</sub>OH (Merck)

Etanol: CH<sub>5</sub>OH (Merck)

Asetonitril: C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N (Merck)

Disodyum hidrojen fosfat dihidrat: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck)

Fosforik asit: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)

##### 3.1.3. Sarf Malzemeler

Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm)

Otomatik pipet ucu: 100 ve 1000 µL

Vial: Cam, 1 mL

Mikro santrifüj tüpü: 2 mL

Ultrafiltre: 500 µL, < 3 kD (Microcon, EMD Millipore)

Balon joje: 1, 10, 250 ve 1000 mL'lik, payreks

Spatül: Metal

Tartım kabı: Plastik

Mezürler: 100 ve 1000 mL'lik

### 3.2. Deney Hazırlıkları

#### 3.2.1. Etken Maddenin Saflığı

KET etken maddesi Drogan İlaçları Sanayi ve Ticaret A. Ş. tarafından sertifikası (Bkz. Ek 1) ile sağlanmıştır.

#### 3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması

**KET Ana Stok Çözeltisi (1000 µg/mL):** 10.0 mg KET hassas ölçüm terazisinde tartılmış, ardından 10.0 mL'lik balon jojeye aktarıldıktan sonra, bir miktar etanol eklenip ultrasonik banyoda 5 dk bekletilip çözülmüştür. Ardından, etanol ilave edilerek hacmi 10.0 mL'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan KET ana stok çözeltisi, + 4 °C buzdolabında saklanıp kullanılacağı zaman laboratuvar sıcaklığına ulaşması beklenmiştir.

**KET İçeren Plazma Çalışma Standartları:** In vitro olarak, çalışma standartlarından alınan miktarlar spike yöntemiyle plazma örneklerine eklenerek hazırlanmıştır. Ependorf tüpe alınan 400'er µL insan plazması üzerine (Seri numarası: MFCD00131920) son derişimler 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0, 15.0 ve 25.0 µg/mL olacak şekilde KET stok çözeltisi eklenerek 1 dk süreyle vorteksenerek karışması sağlanmıştır. Daha sonra 500 µL ACN eklenerek hacmi 1 mL'ye tamamlanmış ve 10000 devir/dk'da 20 dk santrifüjlenerek proteinlerin çökmesi sağlandıktan sonra, santrifügattan alınan 500'er µL ultrafiltrasyon tüplerine alınıp 10000 devir/dk'da 2 kez 30'ar dk santrifüjlenmiştir. Bu şekilde doğrusallık aralığını sağlayan 7 farklı derişimde plazma çalışma standardı hazır hale getirilmiştir.

**Plazma Numunesi (3 µg/mL):** Ticari olarak satın alınan insan plazmasından (Seri numarası: MFCD00131920) 400 µL alınıp üzerine KET etken maddesi eklenerek oluşturulmuş spike numunelerinin hazırlanması için 100 µg/mL'lik KET ara stok çözeltisinden 30 µL eklenip 1 dk süreyle vortekslenerek karışması sağlanmıştır. Daha sonra hazırlanan sentetik numune üzerine 500 µL ACN ilave edilip 10000 devir/dk'da 20 dk santrifüjlenerek proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifügattan 500'er µL ultrafiltrasyon tüplerine alınıp 10000 devir/dk'da 2 kez 30'ar dk santrifüjlenmiş ve alınan miktarlar viallere konulup analizlenmiştir.

**40 mM Derişiminde Fosfat Tamponu (pH 6.0):** Hareketli fazın bileşimlerinden biri olan fosfat tamponunu hazırlamak için 1.78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O tartılmış, 250 mL hacmindeki balon jøjeye alınıp, biraz saf su eklenip sonra da ultra sonik banyoda 5 dk bekletilerek çözülmüştür. Sonrasında, hacmi saf su ilavesiyle 250 mL'ye getirilmiştir. Ardından tamponun pH'ı H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ile pH metrede 6.0'a ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon çözelti kullanılmadan önce süzölmüş ve degaze edilmiştir.

### 3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

#### 3.3.1. HPLC Deneyinin Yapılışı ve Kromatografik Koşulların Saptanması

Hareketli fazı oluşturan organik çözücünün oranı, tampon çözeltinin pH değeri, hareketli fazın akış hızı ve enjeksiyon hacmi kromatografik yöntemin optimizasyonu için incelenmiştir. Dedektörde okunan dalga boylarından en yüksek pik alanlarının gözlemlendiği dalga boyu çalışılacak dalga boyu olarak seçilmiştir. KET'in HPLC ile analizleri, ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) kolon ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli fazın bileşimi ve oranı asetonitril:fosfat tamponu 30:70 olarak kullanılmıştır. Çalışma boyunca yapılan her deneyden önce sistemden 20 dk boyunca 1 mL/dk akış hızında uygun su geçirilmiştir. Ardından sistemden 20 dk boyunca hareketli faz geçirilmiş, kromatogramda minimum gürültü seviyesinin ve sabitliğinin sağlandığı bir taban çigisi elde edildiğinde, kolonun ve dedektörün dengelendiğine karar verilerek analizlere başlanmıştır.

Hareketli faz bileşimlerinden biri olan asetonitrilin oranının saptanabilmesi için %25, %30 ve %35 oranları, diğeri bir bileşen olan fosfat tamponunun derişiminin

belirlenebilmesi için ise 36 mM, 40 mM ve 44 mM derişimleri denenmiştir. Bunun yanında, fosfat tamponunun pH'ının belirlenmesi için 5.8, 6.0 ve 6.2 pH değerlerinde tampon çözeltiler denenmiş ve optimum akış hızının saptanabilmesi için bu hareketli fazlar 0.8 mL/dk, 1.0 mL/dk ve 1.2 mL/dk şeklinde çeşitli akış hızlarında denenmiştir. Yöntemin optimize edilmesi için gereken parametreler kabul koşullarına göre denenip çalışılmış, buna göre optimum kromatografik koşullar belirlenmiştir.

### 3.3.2. Yöntem Validasyonu Çalışmaları

Yöntemin valide edilmesi kapsamında kararlılık, seçicilik, doğrusallık ve aralık, doğruluk ve geri kazanım, kesinlik, tekrarlanabilirlik, duyarlılık, sağlamlık ve tutarlılık parametreleri ile sistem uygunluk kriterleri araştırılmış (45-47) olup, bulunan sonuçlar istatistiksel hesaplamalarla gözden geçirilmiştir (48).

#### Kararlılık

KET referans çözeltilisinin kararlılık parametresini belirlemek için 3.0 µg/mL'lik standart çözeltiler hazırlanmıştır. Uzun dönem (2 aylık) ve kısa dönem (48 saatlik) için sağlanan kararlılık sonuçları gözden geçirilmiştir.

+ 4 °C'deki dolapta tutulan KET referans çözeltilerinin 2 aylık (uzun dönem) kararlılık araştırması kapsamında, 1000 µg/mL derişimindeki ana çözeltilerden hazırlanan 3.0 µg/mL'lik standart çözeltilerin analizleri yapılarak, taze hazırlanmış standart çözeltilerin analiz sonuçları ile kıyaslanmıştır.

KET stok çözeltilerinin kısa dönem kararlılık araştırması için, karanlıkta ve aydınlıkta olmak üzere 48 saat oda sıcaklığında ve + 4 °C dolapta bekletilen eşit derişimlerdeki standart çözeltilerin ve taze hazırlanmış standart çözeltilerin analizi yapıp kıyaslanmıştır. Bulunan alan değerlerinden % kalan miktar hesaplanarak, KET çözeltilerinin kısa dönem kararlılıkları tespit edilmiştir.

Kısa dönem kararlılık araştırması için standart çözeltiler, aydınlıkta, karanlıkta ve buzdolabında (+ 4 °C); 8 saat, 24 saat ve 48 saat boyunca tutulmuştur. Uzun süreli kararlılık araştırması, çözeltiler buzdolabında (+ 4 °C) 2 ay boyunca tutularak gerçekleştirilmiştir. Ardından, herbir süre sonunda bu stok çözeltilerinden hazırlanan 3.0 µg/mL derişimindeki KET çalışma standartları analizlenmiştir.



### **Seçicilik (Özgünlük)**

Seçicilik parametresi, sistemin analiti karışımdaki diğer bileşenler varlığında analiz edebilme yeteneğidir. Bunun için, hareketli faz, ilaçsız plazma, standart çözelti (3.0 µg/mL) ve numune (3.0 µg/mL derişimindeki plazma numunesi) analizlerine ait kromatogramlar karşılaştırılmıştır. Standart çözeltideki KET'in, diğer piklerle girişim yapıp yapmadığı araştırılmıştır.

### **Doğrusallık ve Aralık**

KET'in miktar tayini için doğrusallık aralığı 1.0 – 100.0 µg/mL aralığındaki derişimler denenmiştir. Plazmadan yapılacak analizleri için analitin düşük derişimleri inceleneceğinden dolayı aralık olarak doğrusallığın sağlandığı 1.0 – 25.0 µg/mL seçilmiştir. Kalibrasyonun doğrusal olduğu aralığı belirlemek için hazırlanan 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0, 15.0 ve 25.0 µg/mL kalibrasyon çözeltileri analiz edilip, kromatogramlar kaydedilmiştir. Kalibrasyon eğrileri KET derişimine karşı elde edilen alanın grafiğe geçirilmesiyle elde edilmiş ve elde edilen kalibrasyon doğrusunun doğrusallıktan ayrılışı istatistiksel olarak incelenmiştir.

### **Doğruluk ve Geri Kazanım**

Kromatografik metodun doğruluk çalışması için gün içi ve günler arası çalışmaların sonuçları bağıl hata (BH) cinsinden test edilmiştir. Gün içi doğruluk çalışması için, KET'in düşük, orta ve yüksek derişim olmak üzere 3 farklı noktadaki (1.0, 5.0 ve 15.0 µg/mL) çözeltileri 6 tekrarlı olarak hazırlanıp, aynı gün içinde analiz edilmiş ve bulunan sonuçların BH değerleri hesaplanmıştır. Günler arası doğruluk çalışması için ise, bu 3 farklı derişimdeki çözeltilerin peş peşe 6 gün boyunca hazırlanarak analizlenip bulunan sonuçların BH değerleri hesaplanmıştır.

Doğruluğu ifade etmek için geri kazanım çalışması için ise; 3 farklı derişimdeki plazma örneklerinin 6 tekrarlı analiz sonuçları incelenip plazmaya eklenmiş ve suya eklenmiş etken maddenin yüzde bağıl ve mutlak geri kazanım sonuçları olarak belirtilmiştir.

### **Kesinlik**

Kesinlik parametresi, analizlerin sonucunda bulunan değerlerin birbirine yakınlığını gösterir. Bu parametrenin ölçümü için, gün içi ve günler arası bulgularının bağıl standart sapmasından (BSS) yararlanılmıştır. Kesinlik parametresinin araştırılması için yine gün içi ve günler arası faktörlerine bakılarak KET'in düşük derişim, orta derişim ve yüksek derişim noktalarındaki (1.0, 5.0 ve 15.0 µg/mL), 6'şar çözeltinin analizi sonucu bulunan verilerin BSS değerleri hesaplanarak yapılmıştır.

### **Tekrarlanabilirlik**

Kesinliği ifade eden bu parametre hem yöntem için hem de enjeksiyon için ayrı ayrı incelenmiştir. Yöntem tekrarlanabilirliğinde, doğrusallık aralığındaki 3.0 µg/mL KET içeren 10 tane farklı plazma çözeltisi hazırlanıp analizlenmiştir. Enjeksiyon (cihaz) tekrarlanabilirliğinde ise, 3.0 µg/mL KET içeren plazma çözeltisi vialden alındıktan sonra 10 kez aynı vialden enjeksiyonu ile analizi gerçekleştirilmiştir. Bu iki tekrarlanabilirlik verilerinden hesaplanan pik alanlarının BSS değerleri çalışılarak tekrarlanabilirlik parametresi incelenmiştir.

### **Gözlenebilirlik Sınırı ve Alt Tayin Sınırı**

KET'in geliştirilen analiz yönteminde istenilen duyarlılıkta ölçüm yapılabilmesi için gözlenebilirlik sınırına (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) düzeyine bakılmıştır. Bu bilgi için iki şekilde değerlendirme yapılabilmektedir. Birincisi; Sinyal / Gürültü ( $S / N$ ) = 3 iken etken madde derişimi LOD'ye eşitken,  $S / N = 10$  iken KET değerinin de LOQ'ya eşit olduğu kabul edilir (42).

İkinci yöntemde ise, LOD ve LOQ değerlerinin saptanabilmesi için Eşitlik 3.1 ve 3.2'den de yararlanır:

$$LOD = 3.3 \times \left( \frac{SS}{S} \right) \quad (3.1)$$

$$LOQ = 10 \times \left( \frac{SS}{S} \right) \quad (3.2)$$

Bu denklemlerde,

SS: Elde edilen kalibrasyon grafiklerindeki y-kestirimlerinin standart sapmasıdır.

S: Elde edilen kalibrasyon grafiklerindeki eğimlerinin ortalamalarıdır.

Geliştirdiğimiz yöntem için ikinci yöntemde sunulan eşitlikler kullanılarak LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir.

### Sağlamlık ve Tutarlılık

Yöntemin sağlamlığının test edilmesi için analiz sonuçlarının yöntemde yapılacak birtakım değişiklikler ile etkilenip etkilenmediğine bakılmıştır. Bunun için, akış hızı, dalga boyu, tampon derişimi ve pH değeri parametrelerindeki küçük kasti değişikliklerin sonucu ne kadar etkilediği incelenmiştir. 3.0 µg/mL derişimde hazırlanan KET plazma çözeltisinin, belirtilen bu parametre değişikliklerinden sonraki analiz sonuçları, optimizasyon sonrasındaki analiz sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Yöntemin tutarlılığının test edilmesi için ise, ya farklı bir cihazda ya da farklı bir analizci ile çalışılıp sonuçlar optimum şartlarla karşılaştırılır. Bu çalışmada, analizci derişiminin analiz sonuçlarını nasıl etkilediğine bakılmıştır. Analizci A ve analizci B'nin her ikisi de, 3.0 µg/mL derişiminde KET plazma çözeltisi hazırlayıp (n = 6), bu çözeltileri ayrı ayrı analiz edilmelerinin ardından, elde ettikleri sonuçlar istatistiksel hesaplamalar yapılarak kıyaslanmıştır.

### 3.3.3. Sistem Uygunluğu Testi

Sistem uygunluğu testi cihazın, elektronik bileşenlerin, analitik prosedürlerin ve numunelerin birlikte değerlendirilmesine dayanır (49). Geliştirilen yöntemin sistem uygunluk testi için USP'deki kriterler göz önünde bulundurulmuştur (50) (Tablo 3.1). Sistem uygunluğunu test etmek için, standart çözeltinin 6 ölçüm ile gerçekleştirilen analizi neticesinde bulunan değerler kullanılmıştır.

**Tablo 3.1.** Sistem uygunluğu test parametreleri (50)

Test edilen parametre	Sınır değeri
Enjeksiyon kesinliği	$BSS \leq \% 1, n > 5$
Kapasite faktörü	$k' > 2$
Ayırıcılık	$R_s \geq 1.5$
Pik asimetri oranı	$PAO \leq 1.5$
Teorik tabaka sayısı	$N > 2000$

(BSS: Bağlı standart sapma, n: Enjeksiyon sayısı, k': Kapasite faktörü, R<sub>s</sub>: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı)

### **3.3.4. Geliştirilen Yöntemin Spike Edilen Plazma Numunelerine Uygulanması**

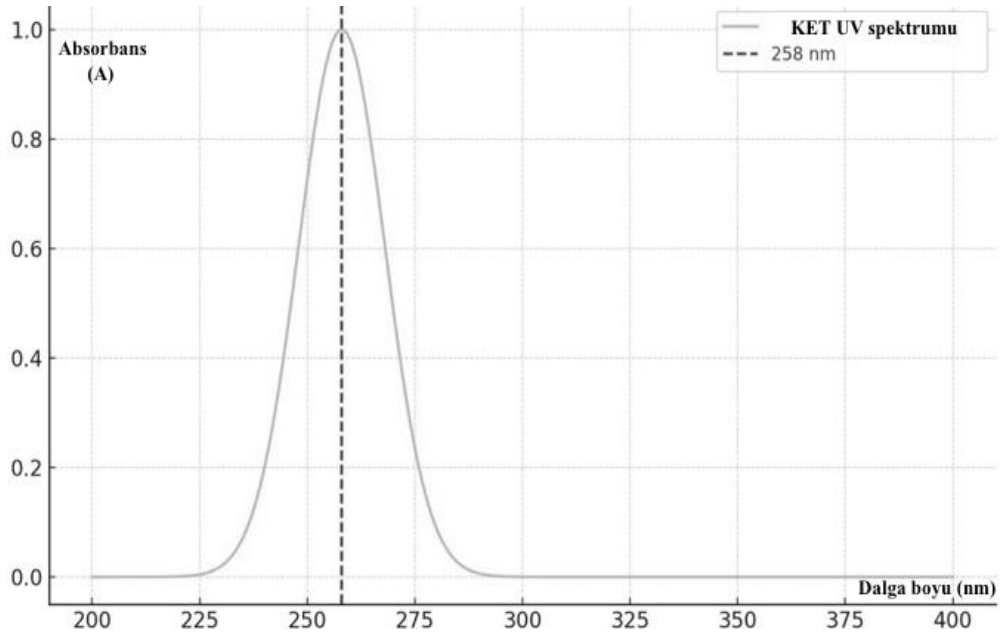
Standart KET stok çözeltisinden eklenerek hazırlanan sentetik plazma numune çözeltileri (Bkz. Bölüm 3.2.2) geliştirilip valide edilen yöntem ile analiz edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. HPLC Sisteminin Optimizasyonu

Bu tez çalışmasında, KET'in HPLC ile analizi için en ideal kromatografik koşulları tespit etmek amacıyla, çeşitli parametrelerin ayırma sürecine etkileri değerlendirilmiştir. Bu parametreler hareketli fazın türü ve miktarı, tampon çözeltinin derişimi ve pH'ı ve hareketli fazın akış hızıdır.

HPLC yönteminde dalga boyunun seçilmesine absorpsiyon spektrumu (Şekil 4.1) incelenerek karar verilmiştir.



Şekil 4.1. KET'e ait UV spektrumu

#### 4.1.1. Sabit Faz

KET'in analizlenmesinde HPLC'de C<sub>18</sub> InertSustain (150 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) ve Inertsil ODS (150 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) kolonları test edilmiş ancak yeterli bir ayırım sağlanamamıştır. Kolon boyunun 150 mm'den 250 mm'ye çıkması ile t<sub>R</sub>'nin arttığı ve pik şeklinin iyileştiği tespit edildiğinden ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) kolonunun sabit faz olmasına karar verilmiştir.

#### 4.1.2. Hareketli Fazın Belirlenmesi

Akış hızı, organik çözücü türü, hareketli faz bileşimi oranı, tampon derişimi ve pH faktörlerinin KET'in kromatografik ayırımına etkilerini inceleyerek, hareketli fazın bileşimi belirlenmiştir.

#### Organik Çözücü Türü ve Miktarının KET'in Ayırımına Etkisi

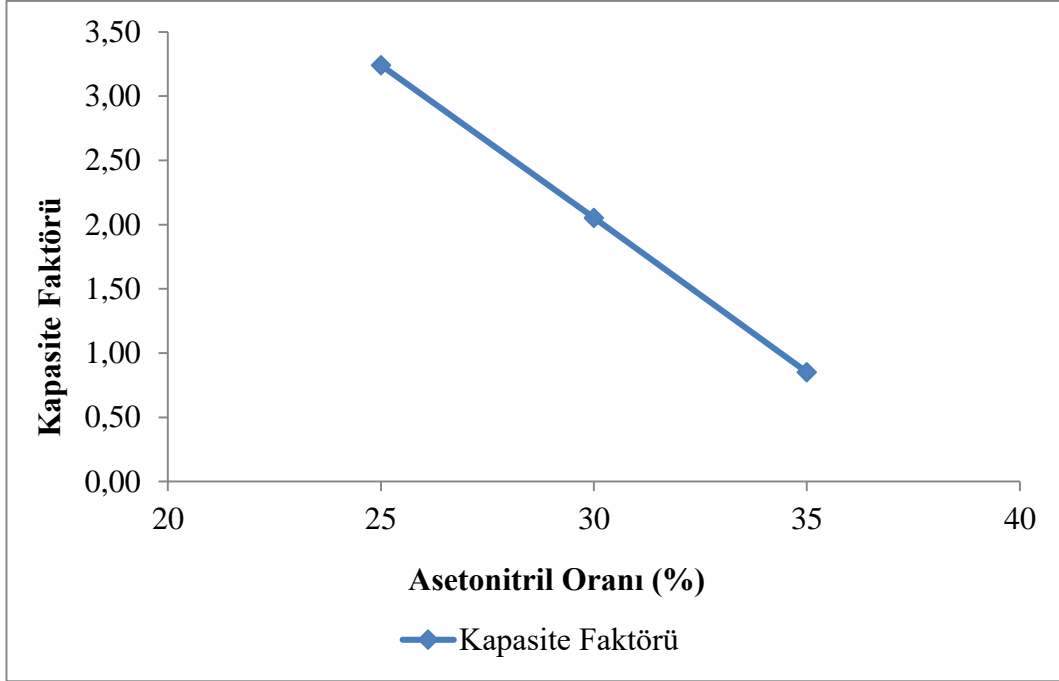
KET'in HPLC'de analizi için optimum koşulların sağlanabilmesi adına organik çözücü olarak kullanılan asetonitril %25, %30 ve %35 oranında hareketli faza eklenmiş ve KET'in kromatografik parametrelerine etkileri hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Organik çözücü miktarının KET kromatografik parametreleri üzerine etkisi

ACN (%)	KET			
	$t_R$ (dk)	$k'$	PAO	N
25	7.99	3.24	0.87	7689
30	5.75	2.05	1.12	7003
35	3.49	0.85	1.58	6797

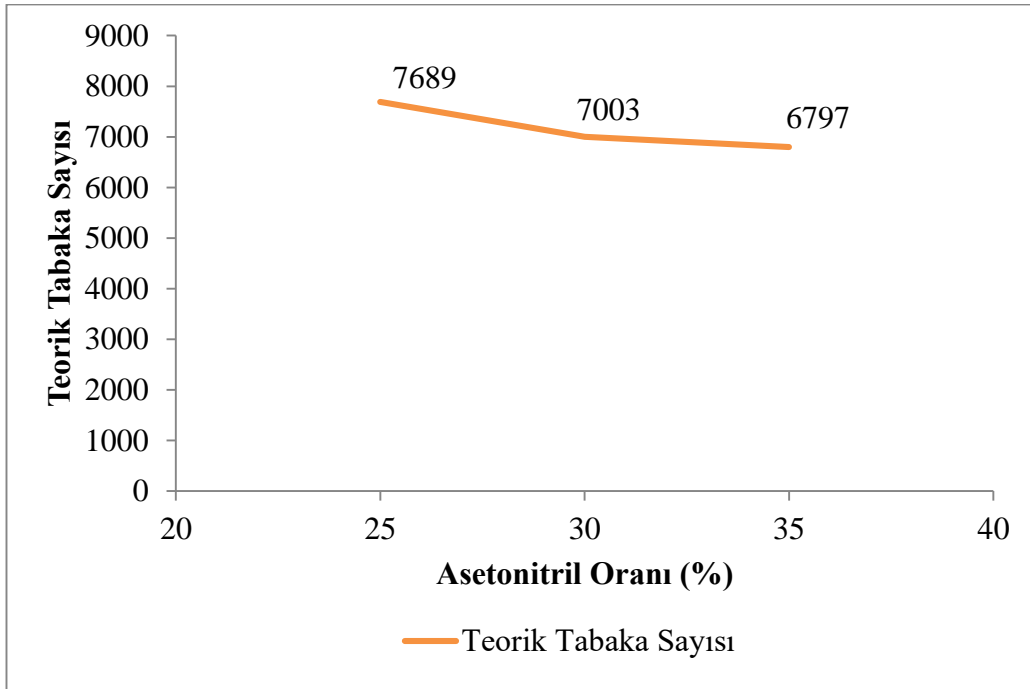
(ACN: Asetonitril,  $t$ : Alınma zamanı,  $k'$ : Kapasite faktörü,  $N$ : Teorik tabaka sayısı, PAO: Pik Asimetri Oranı)

Asetonitrilin hareketli fazdaki oranı arttıkça, KET'in sabit fazda  $t_R$  ve  $k'$  azalmakta, ayrıca asetonitril oranı hacimce %35 olduğunda,  $k'$  nün belirlenen sınırların dışında olduğu gözlemlenmektedir. Asetonitril oranları %25 ve %30 olduğunda,  $PAO \leq 1.5$  olduğu görülmüştür.  $N$  tüm oranlar için 2000'den büyük iken, hareketli fazda hacimce %30 asetonitril kullanıldığında benzer sonuçlar elde edilmesine rağmen analiz süresi daha fazla uzamadığı için bu oranın KET'in kromatografik ayırımı için uygun olduğuna karar verilmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3).



**Şekil 4.2.** Asetonitril oranı ile  $k'$  değişimi

(Kromatografik Koşullar: Asetonitril:40 mM fosfat tamponu (pH 6.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 258 nm)



**Şekil 4.3.** Asetonitril oranı ile  $N$ 'nin değişimi

(Kromatografik Koşullar: Asetonitril:40 mM fosfat tamponu (pH 6.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 258 nm)

### Tampon Çözeltinin pH'ının Belirlenmesi

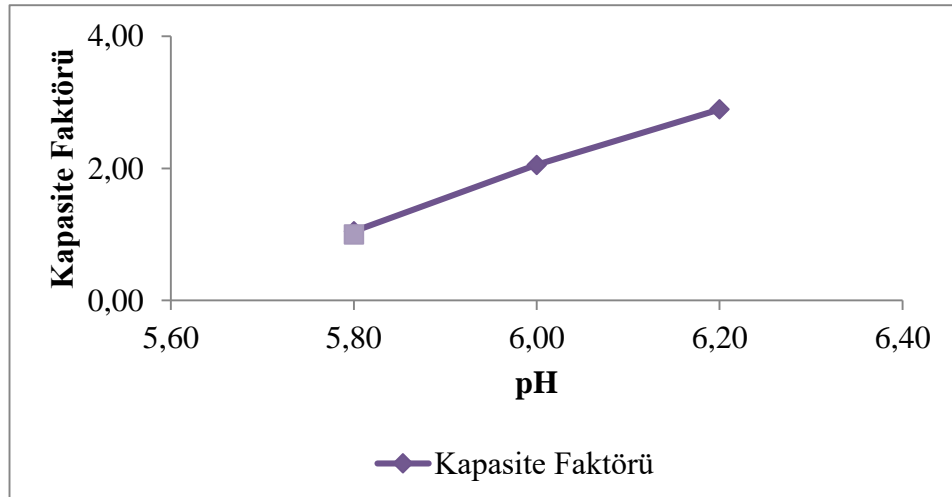
KET'in ultrafiltrasyon sonrası HPLC'de analiz edilmesi için hareketli fazda kullanılacak tampon çözeltinin pH değerinin kromatografik parametrelere etkilerinin incelenmesi için hareketli faz, asetonitril:40 mM fosfat tamponu olarak, 30:70, h/h oranında ve akış hızı 1.0 mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Doğru pH değerini belirlemek amacıyla hareketli fazın pH değeri sırasıyla 5.8, 6.0 ve 6.2 olarak ayarlanıp kromatografik parametreler hesaplanmıştır (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** Hareketli fazdaki tampon çözeltinin pH'ının kromatografik parametrelere etkisi

pH	KET			
	t <sub>R</sub> (dk)	k'	PAO	N
5.80	3.86	1.05	0.73	7291
6.00	5.75	2.05	1.12	7003
6.20	7.34	2.89	1.53	6834

(t: Alikonma zamanı, k': Kapasite faktörü, PAO: Pik Asimetri Oranı, N: Teorik tabaka sayısı)

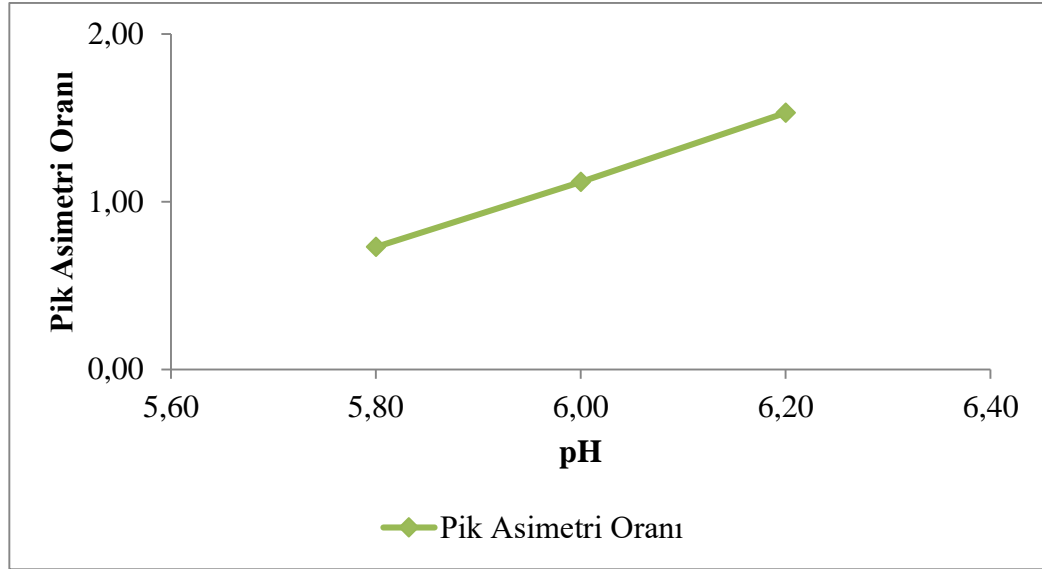
pH değeri arttıkça PAO'nun artış gösterdiği, buna karşılık N değerlerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. pH değerlerinin artmasıyla t<sub>R</sub> ve k'nün de arttığı görülmüştür. pH 6.2 ile çalışıldığında PAO ≤ 1.5 kriterlerini sağlamadığı için, ayrıca pH 5.8'de k' kriteri 2'ye çok yaklaştığı için pH 6.0 optimum pH olarak seçilmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5).



**Şekil 4.4.** Tampon çözeltinin pH'ı ile k' değişimi

(Kromatografik koşullar: Asetonitril:40 mM fosfat tamponu, Akış Hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 258 nm)





**Şekil 4.5.** Tampon çözeltinin pH'ı ile PAO değişimi

(Kromatografik koşullar: Asetonitril:40 mM fosfat tamponu, Akış Hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 258 nm)

### Tampon Çözeltinin Derişiminin Belirlenmesi

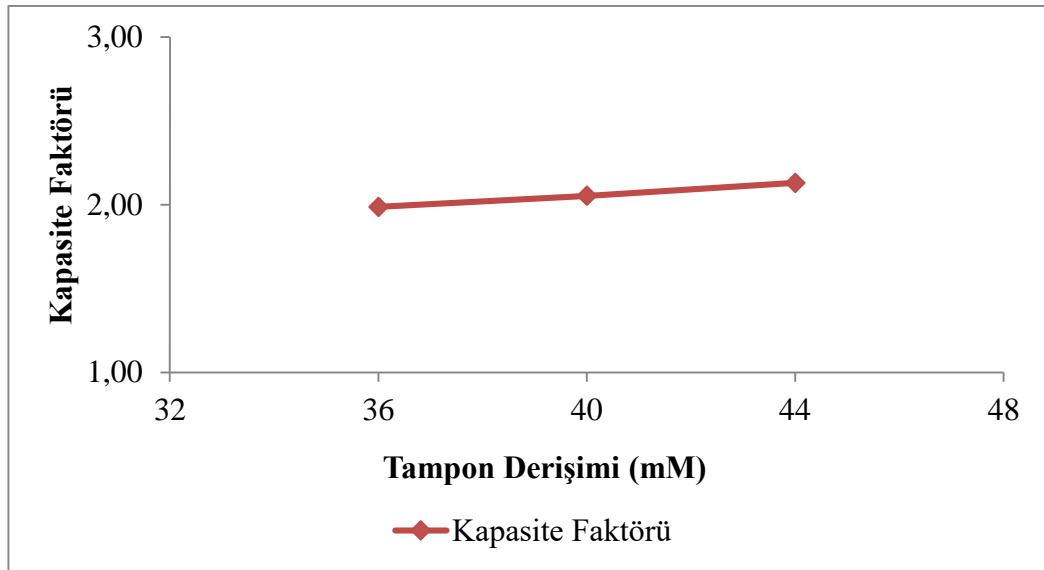
KET'in analizine fosfat tamponunun derişiminin etkilerini değerlendirmek amacıyla pH 6.0 olan, asetonitril: 36, 40 ve 44 mM derişimlerindeki fosfat tamponları (30:70, h/h) akış hızı 1.0 mL/dk seçilerek kullanılmış ve bu farklılıkların kromatografik parametrelere etkisi incelenmiştir (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** Hareketli fazdaki tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi

Tampon Derişimi (mM)	KET			
	t <sub>R</sub> (dk)	k'	PAO	N
36	5.63	1.99	0.79	7198
40	5.75	2.05	1.12	7003
44	5.90	2.13	1.52	6894

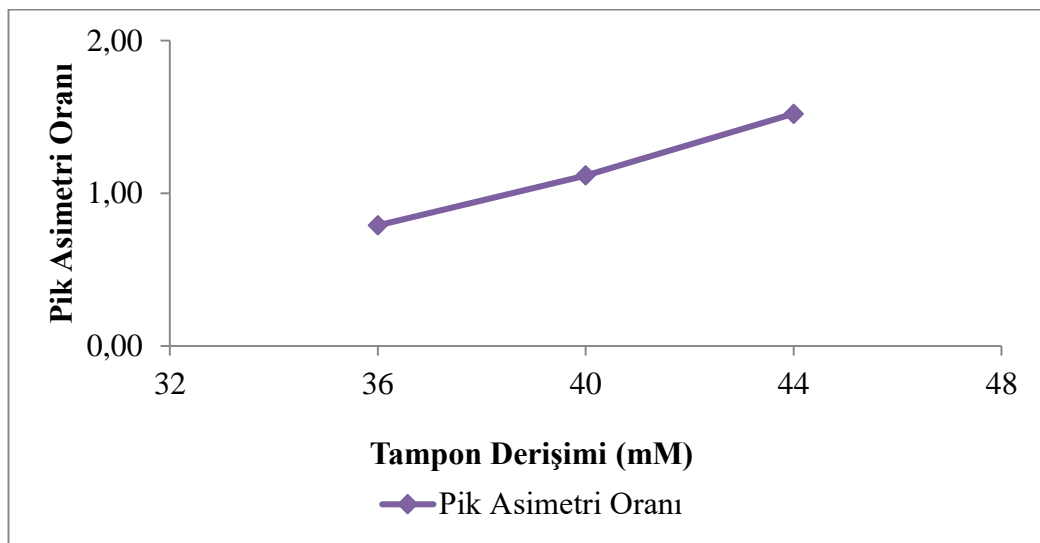
(t: Alınma zamanı, k': Kapasite faktörü, N: Teorik tabaka sayısı, PAO: Pik Asimetri Oranı)

Artan tampon derişimiyle k'nün ve PAO'nın arttığı, N'nin azaldığı gözlemlenmiştir. Tampon çözeltinin derişimi 40 mM olduğunda, PAO'nın ve k'nün kabul sınırları içinde olduğu görüldüğünden bu derişimde çalışma kararı alınmıştır (Şekil 4.6, Şekil 4.7).



**Şekil 4.6.** Tampon çözeltinin derişimi ile k' değişimi

(Kromatografik Koşullar: Asetonitril:Fosfat tamponu (pH 6.0) karışımı (30:70, h/h), Akış Hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 258 nm)



**Şekil 4.7.** Tampon çözeltinin derişimi ile PAO değişimi

(Kromatografik Koşullar: Asetonitril:Fosfat tamponu karışımı (30:70, h/h), pH 6.0, Akış Hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 258 nm)

### Hareketli Fazın Akış Hızının Belirlenmesi

KET'in analizine farklı akış hızlarında hareketli fazların etkilerini değerlendirirken, hareketli faz karışımı olarak, asetonitril:40 mM fosfat tamponu (pH 6.0) (30:70, h/h) kullanılmıştır. Kromatografik parametreler üzerinde akış hızının

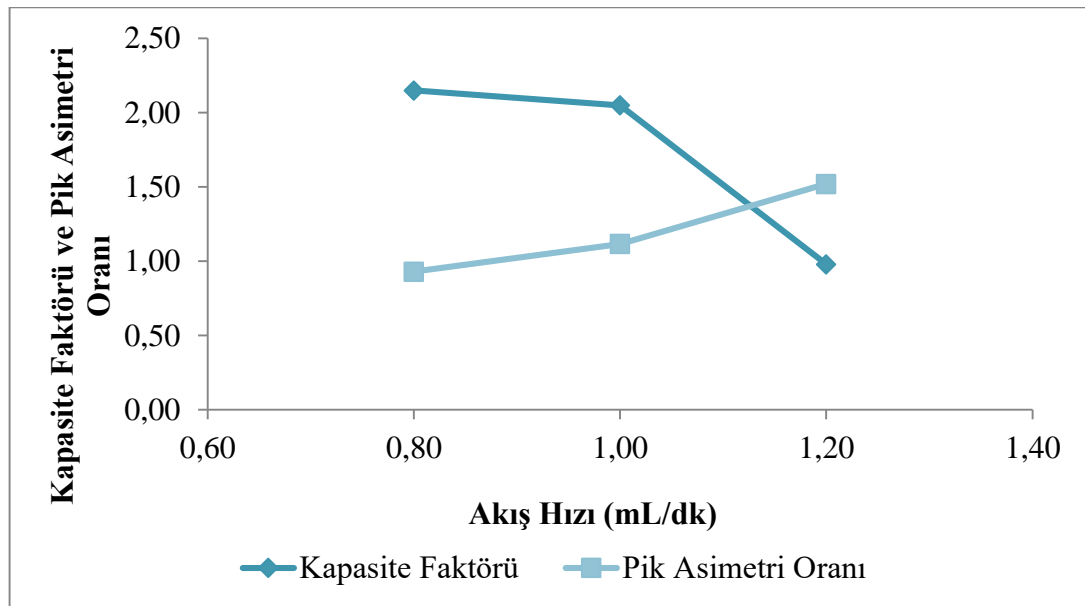
etkisini araştırmak için, hareketli fazın sırasıyla 0.8, 1.0 ve 1.2 mL/dk debilerinde taşınmasıyla KET'in analizlenebilirliği incelenmiştir (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4.** Akış hızı değişikliğinin KET kromatografik parametrelerine etkisi

Akış Hızı (mL/dk)	KET			
	$t_R$ (dk)	$k'$	PAO	N
0.80	7.67	3.07	0.93	8224
1.00	5.75	2.05	1.12	7003
1.20	4.74	1.51	1.52	6885

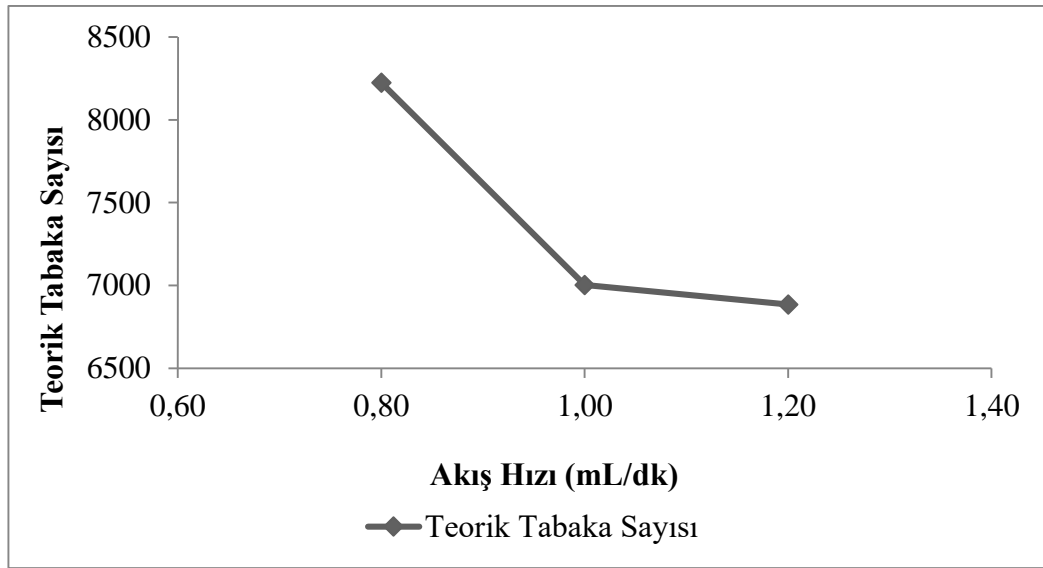
( $t$ : Alıkonna zamanı,  $k'$ : Kapasite faktörü,  $N$ : Teorik tabaka sayısı, PAO: Pik Asimetri Oranı)

Akış hızındaki artışla birlikte  $k'$ 'nün ve  $N$ 'nın azaldığı PAO'nın arttığı gözlenmiştir. PAO'nın kabul sınırları içinde olduğu,  $k'$ 'nün uygun değerde olduğu akış hızı olan 1.0 mL/dk sečilmiřtir (şekil 4.8, şekil 4.9).



**şekil 4.8.** Hareketli faz akış hızı ile PAO ve  $k'$  değişimi

(Kromatografik koşullar: Asetonitril:40 mM fosfat tamponu (pH 6.0) (30:70, h/h), Akış Hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 μm), Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 258 nm)



**Şekil 4.9.** Hareketli faz akış hızı ile N'nin değişimi

(Kromatografik koşullar: Asetonitril:40 mM fosfat tamponu (pH 6.0) (30:70, h/h), Akış Hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 258 nm)

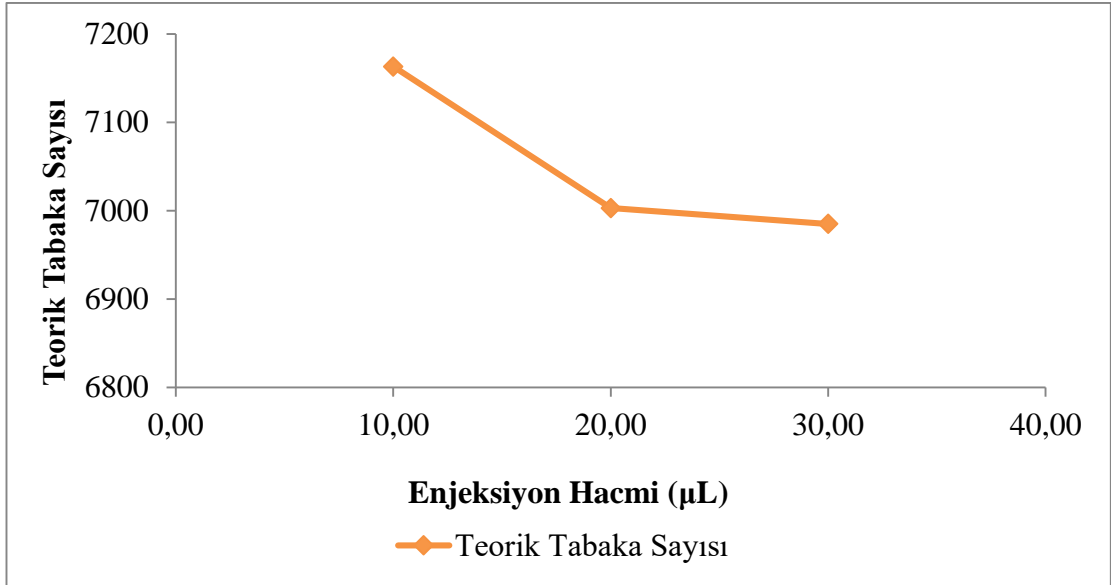
### Enjeksiyon Hacminin Belirlenmesi

Enjeksiyon hacminin KET analizine etkilerini incelemek için, asetonitril: fosfat tamponu (pH 6.0) (30:70, h/h) içeren hareketli faz, 1.0 mL/dk akış hızında geçirilmiştir. Enjekte edilme hacimleri sırasıyla 10 µL, 20 µL ve 30 µL olacak şekilde standart KET çözelti enjeksiyonları yapıp analiz sonuçları incelenmiştir (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** Enjeksiyon hacmi değişikliğinin KET kromatografik parametrelere etkisi

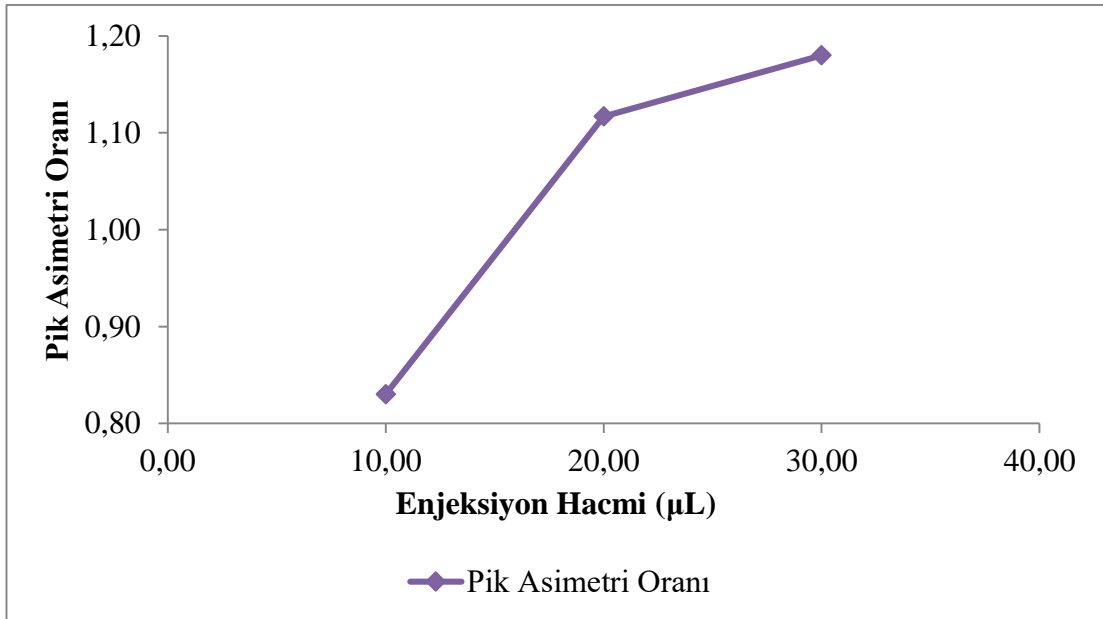
Enjeksiyon Hacmi (µL)	KET		
	t <sub>R</sub> (dk)	PAO	N
10.00	5.75	0.83	7163
20.00	5.75	1.12	7003
30.00	5.75	1.18	6985

Elde edilen verilere göre, düzgün varsayılan pikler için PAO değeri 0.9 – 1.2 arasında olması gerektiğinden, enjeksiyon hacmi daha az miktarda olan 20 µL olmasına karar verilmiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.11).



**Şekil 4.10.** Enjeksiyon hacmi ile N'nin değişimi

(Kromatografik koşullar: Asetonitril:40 mM fosfat tamponu (pH 6.0) (30:70, h/h), Akış Hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 258 nm)



**Şekil 4.11.** Enjeksiyon hacmi ile PAO'nun değişimi

(Kromatografik koşullar: Asetonitril:40 mM fosfat tamponu (pH 6.0) (30:70, h/h), Akış Hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 258 nm)

## 4.2. KET'in Geliştirilen Yönteminin Validasyonu

KET etken maddesinin FDA'nın biyoanalitik metot yönergesi (49) çerçevesinde valide edilmiştir.

### 4.2.1. Sistem Uygunluğu

KET analiz yönteminin sistem uygunluğunu değerlendirmek amacıyla 3.0 µg/mL standart çözeltinin 6 tekrarlı enjeksiyonuna bakılmış ve USP'de tanımlanan esaslara göre hesaplanmıştır (Tablo 4.6).

**Tablo 4.6.** 6 Tekrarlı KET analizi için elde edilen sistem uygunluğu parametreleri

Test Edilen Parametre	KET
Alıkonma Zamanı (dk)	5.75
Enjeksiyon Kesinliği (% BSS)	0.11
k'	2.10
PAO	1.18
N	6994

### 4.2.2. Analit Çözeltilerinin Kararlılığı

KET çözeltisinin kararlılığını belirlemek amacıyla Bölüm 3.3.2'de belirtilen şartlarda tutulan KET çözeltileri analiz edilmiş, ardından elde edilen bulgular, derişimi eşit olan taze çözeltinin (3.0 µg/mL) en az 8 saat oda sıcaklığında ışık altında ve en az 24 saat karanlıkta stabil olduğu belirlenmiş, buzdolabında (+ 4 °C) ise en az 48 saat stabil olduğu ve bu koşullarda en az 2 ay boyunca saklandığında belirgin bir bozunmaya uğramadığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$  olmalı, Tablo 4.7).

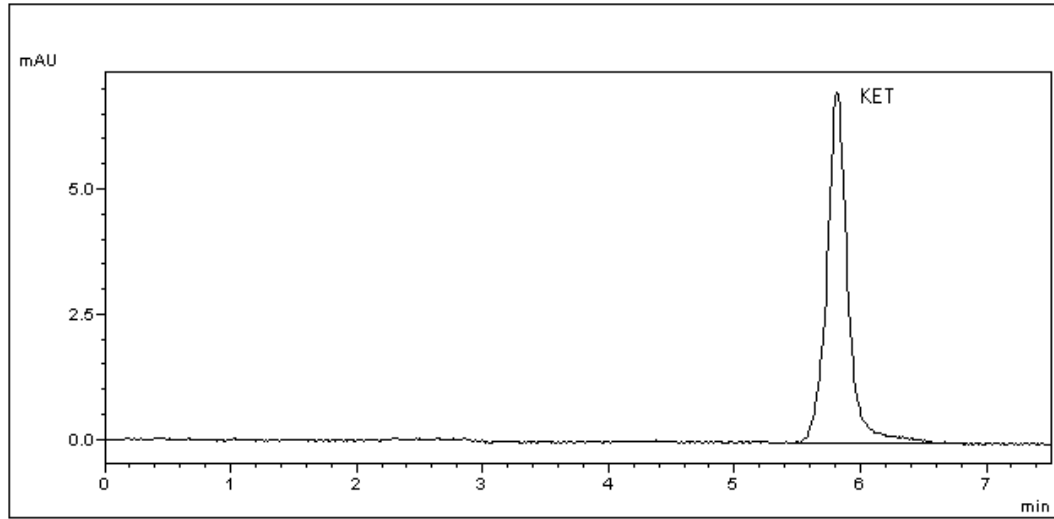
**Tablo 4.7.** KET çözeltisinin kararlılıkları

Süre (Saat)	KET			Süre (Ay)	Uzun Dönem (+ 4 °C) % Kalan
	Aydınlık % Kalan	Karanlık % Kalan	Buzdolabı (+ 4 °C) % Kalan		
0	100.00	100.00	100.00	0	100.00
8	99.57	99.71	99.99	2	99.24
24	97.64	98.62	99.96		
48	96.47	97.89	99.92		

İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek 2 ( $p < 0.05$ ).

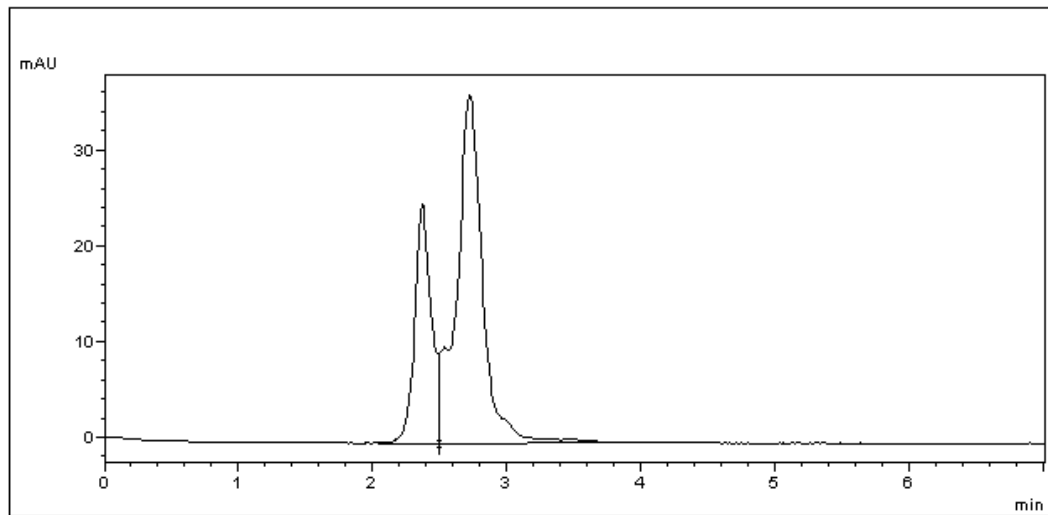
### 4.2.3. Seçicilik (Özgünlük)

KET'in seçiciliğinin araştırılması için, KET standart çözeltisi, ilaçsız plazma, 3.0 µg/mL KET içeren plazma ve hareketli faz numunelerine ait kromatogramlar alınıp karşılaştırılmıştır (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).



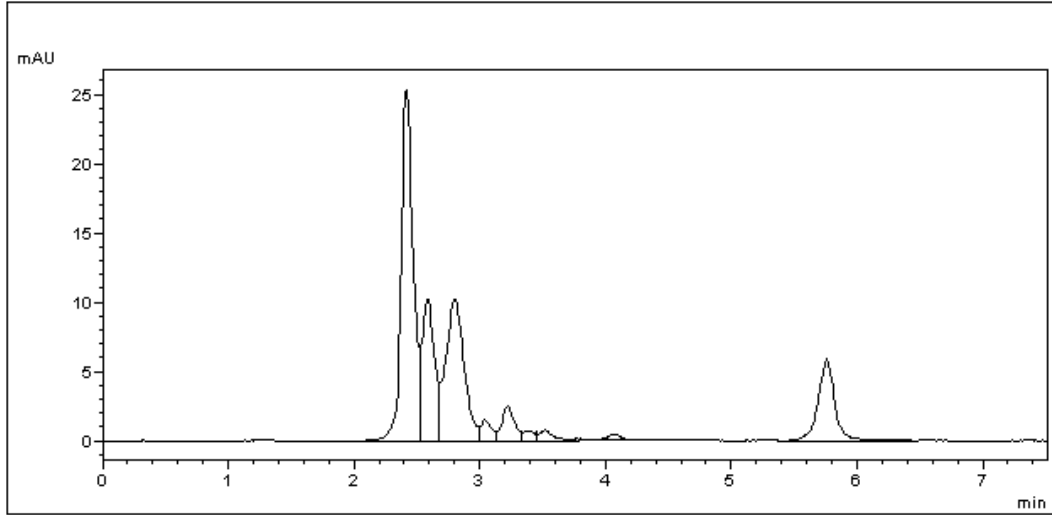
**Şekil 4.12.** 3.0 µg/mL standart çözelti kromatogramı

(Kromatografik koşullar: Asetonitril:40 mM fosfat tamponu (pH 6.0) (30:70, h/h), Akış Hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Dedektör: UV 258 nm)



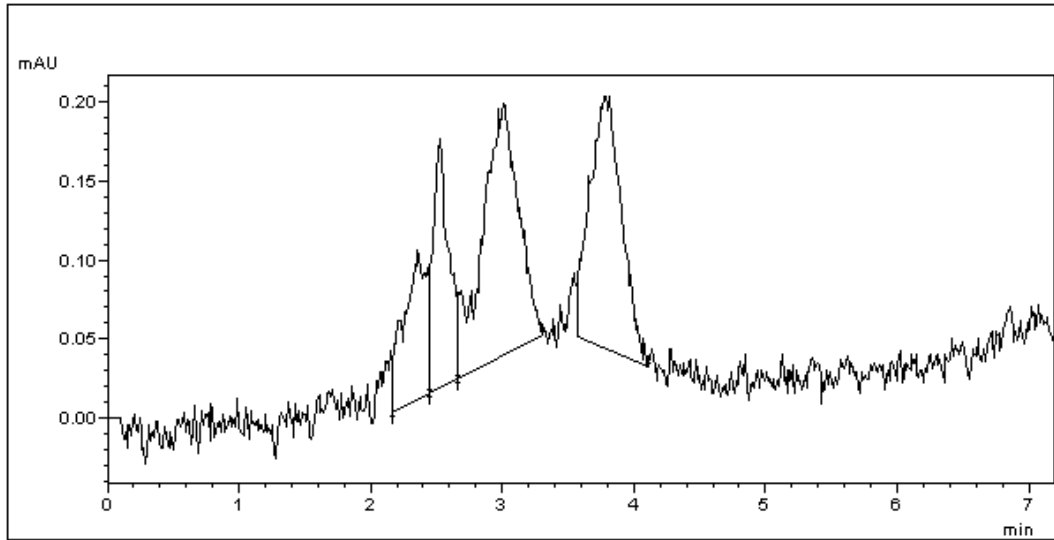
**Şekil 4.13.** İlaçsız plazma kromatogramı

(Kromatografik koşullar: Asetonitril:40 mM fosfat tamponu (pH 6.0) (30:70, h/h), Akış Hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Dedektör: UV 258 nm)



**Şekil 4.14.** 3.0 µg/mL KET içeren plazma çözeltisinin kromatogramı

(Kromatografik koşullar: Asetonitril:40 mM fosfat tamponu (pH 6.0) (30:70, h/h), Akış Hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Dedektör: UV 258 nm)



**Şekil 4.15.** Hareketli faz kromatogramı

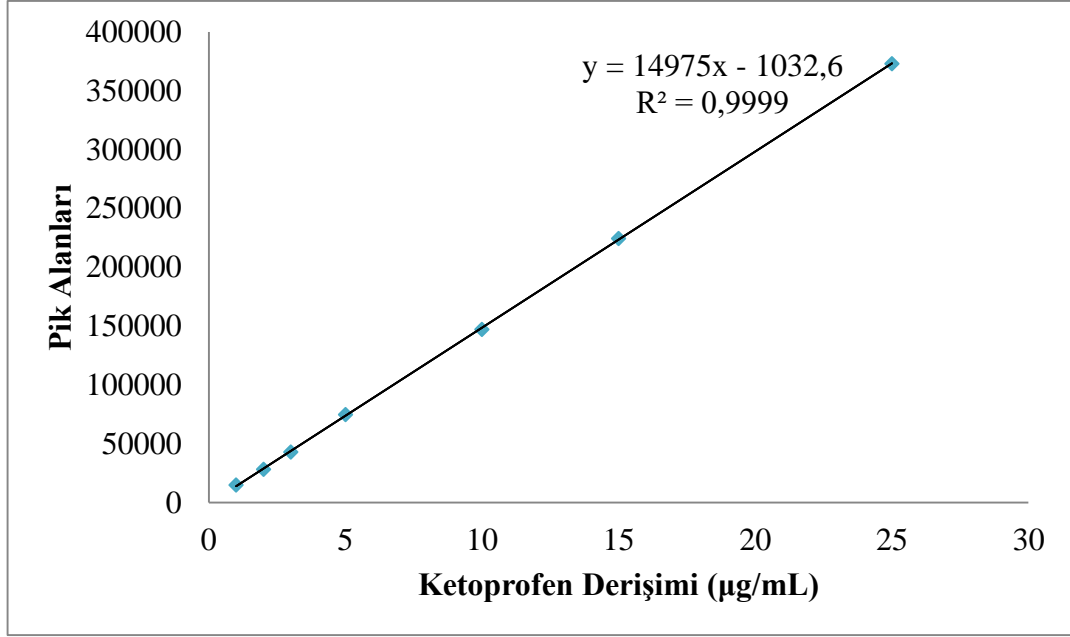
(Kromatografik koşullar: Asetonitril:40 mM fosfat tamponu (pH 6.0) (30:70, h/h), Akış Hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Dedektör: UV 258 nm)

Elde edilen bulgulardan, ultrafiltrasyon ile ekstraksiyonu yapılmış KET'in HPLC yöntemi ile analizlerinde, analit pikinin hareketli fazın piklerinden veya plazmadaki herhangi bir matriks bileşeninden etkilenmediği sonucuna varılmıştır.



#### 4.2.4. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı

KET'in derişimleri pik alanlarına karşı grafiğe geçirildiğinde, doğrusal bir kalibrasyon eğrisi 1.0 ile 25.0 µg/mL aralığında bulunmuştur (Şekil 4.16 ve Tablo 4.8).



Şekil 4.16. KET için kalibrasyon grafiği

KET eğrisinin doğrusallıktan sapmasının önemsiz olduğu, ayrıca korelasyon katsayılarının tesadüfi olmadığı istatistiksel açıdan belirlenmiştir (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8.** KET analizine göre elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ve doğrusallıktan sapma önem kontrolü

Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü					
n	r	S <sub>r</sub>	t <sub>H</sub>	t <sub>T</sub>	
6	0.9999	0.004	261.40	2.78	
t <sub>H</sub> > t <sub>T</sub> : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değer değildir (p < 0.05).					
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü					
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	FH	FT
83022500356	83026962163	4461806.37	1115452	74429.50	7.71
F <sub>H</sub> > F <sub>T</sub> : Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır (p < 0.05).					

*İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 3.*

KET'e ait analizler sonucu elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait bulgular Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

**Tablo 4.9.** KET analizi için elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait bulgular

Regresyon denklemi	*y = 14975x - 1032.6
Eğimin standart hatası	6113.39584
Kesişimin standart hatası	-421.54887
Korelasyon katsayısı (r )	0.9999
Tanımlayıcılık katsayısı (R <sup>2</sup> )	0.9999
Doğrusallık aralığı	1.0 - 25.0 µg/mL
Gözlenebilme sınırı (µg/mL)	0.33
Alt tayin sınırı (µg/mL)	1.00

\*y = ax + b; x: µg/mL biriminde derişim, y: Pik alanları, a: Eğim, b: Kesişim

#### 4.2.5. Doğruluk ve Kesinlik

1.0, 5.0 ve 15.0 µg/mL derişimlerinde hazırlanan 6'şar seri KET çözeltilerine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk araştırmaları yapılmış, çıkan sonuçlar Tablo 4.10'da gösterilmiştir. Doğruluk araştırması kapsamında % BH verileri, kesinlik araştırması kapsamında % BSS verileri değerlendirilmiştir.

**Tablo 4.10.** KET analizi için gün içi ve günler arası analiz sonuçları (n = 6)

KET Miktarı (µg/mL)	Gün İçi <sup>1</sup>		Günler Arası <sup>2</sup>	
	Bulunan Miktar	% BH	Bulunan Miktar	% BH
1.00	1.00	0.30	1.01	0.84
	1.02	1.75	0.99	1.48
	1.00	0.32	0.99	1.45
	1.02	1.59	1.01	1.11
	1.01	0.78	0.99	0.60
	0.99	0.96	0.98	1.60
<b>Ort X</b>	1.01 ± 0.00		0.99 ± 0.00	
<b>SS</b>	0.01		0.01	
<b>% BSS</b>	1.06		1.23	
5.00	4.98	0.46	5.01	0.17
	5.09	1.90	5.04	0.84
	5.05	0.97	4.99	0.16
	5.08	1.56	4.99	0.26
	5.03	0.58	5.00	0.08
	4.99	0.15	5.02	0.48
<b>Ort X</b>	5.04 ± 0.02		5.01 ± 0.01	
<b>SS</b>	0.05		0.02	
<b>% BSS</b>	0.92		0.41	
15.00	14.99	0.05	15.01	0.05
	15.00	0.02	15.06	0.37
	15.00	0.01	15.04	0.24
	15.11	0.75	15.00	0.01
	15.05	0.30	14.99	0.04
	15.02	0.10	15.03	0.19
<b>Ort X</b>	15.03 ± 0.02		15.02 ± 0.01	
<b>SS</b>	0.05		0.02	
<b>% BSS</b>	0.30		0.16	

<sup>1</sup>Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde 6 ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

<sup>2</sup>Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde 6 ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

$\bar{X}$ : Ortalama ± Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

#### 4.2.6. Duyarlılık

KET'in analiz yöntemine ait LOD 0.33 µg/mL ve LOQ 1.00 µg/mL şeklinde bulunmuştur.

#### 4.2.7. Geri Kazanım

KET'in geri kazanım değerlendirmesi için 1.0, 5.0 ve 15.0 µg/mL'lik plazma çözeltileri ve suda hazırlanmış çözeltiler analiz edilmiş ve hesaplanan geri kazanım sonuçları plazma çözeltileri için bağıl geri kazanım, suda hazırlanmış çözeltiler için mutlak geri kazanım şeklinde Tablo 4.11'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.11.** KET analizine ait 3 farklı derişimdeki geri kazanım değerleri (n = 6)

Analiz Edilen Etken Madde Miktarı (µg/mL)	Bağıl Geri Kazanım (%)	BSS (%)	Mutlak Geri Kazanım (%)	BSS (%)
1.0	100.53 ± 0.44	1.06	99.98 ± 1.07	1.17
5.0	100.73 ± 0.33	0.80	100.62 ± 0.23	0.91
15.0	100.19 ± 0.12	0.30	100.04 ± 0.34	0.52

$\bar{X}$ : Ortalama ± Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA: Güven aralığı (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

#### 4.2.8. Tekrarlanabilirlik

KET analizine ait yöntem ve enjeksiyon tekrarlanabilirliği için çıkan sonuçlar Tablo 4.12'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.12.** Yöntem ve enjeksiyon tekrarlanabilirliği verileri (Analiz edilen: 3.0 µg/mL, n = 10)

Bulunan Miktar (µg/mL)	
HPLC yönteminin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları	Enjeksiyon tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları
3.03	2.98
3.03	3.02
3.03	3.03
3.03	2.98
3.01	3.01
2.97	2.98
2.97	3.01
2.99	3.00
2.98	3.00
2.98	3.00
Xort: 3.00 ± 0.01 SS: 0.02 BSS: %0.82 GA: 2.98 - 3.02	Xort: 3.00 ± 0.01 SS: 0.02 BSS: %0.55 GA: 2.99 - 3.01

$\bar{X}$ : Ortalama ± standart hata, SS: Standart Sapma, BSS: % Bağıl Standart Sapma, GA: Güven Aralığı ( $\alpha : 0.05$ ) (Bkz. Ek 2)

#### 4.2.9. Sağlamlık ve Tutarlılık

Geliştirilen yöntemin sağlamlığının değerlendirilmesi için, yöntem parametrelerindeki küçük değişikliklerin analiz sonuçlarına etkileri incelenmiş ve veriler Tablo 4.13'te sunulmuştur.

**Tablo 4.13.** Yönteme ait sağlamlık verileri (Analiz edilen: 3.0 µg/mL KET, n = 3)

	KETOPROFEN		
	Bulunan (µg/mL)	BSS (%)	t <sub>hesap</sub>
<b>Optimum Koşullar</b>	3.01 ± 0.02	0.96	-
<b>Tampon Derişimi 36 mM</b>	3.00 ± 0.01	0.37	0.42
<b>Tampon Derişimi 44 mM</b>	3.01 ± 0.01	0.33	0.02
<b>Tampon pH'ı 5.8</b>	2.99 ± 0.01	0.38	0.58
<b>Tampon pH'ı 6.2</b>	3.02 ± 0.00	0.12	-0.71
<b>Akış Hızı 0.9 mL/dk</b>	3.01 ± 0.01	0.68	-0.05
<b>Akış Hızı 1.1 mL/dk</b>	3.00 ± 0.02	1.13	0.21
<b>Dalga Boyu 256 nm</b>	3.00 ± 0.01	0.35	0.31
<b>Dalga Boyu 260 nm</b>	3.00 ± 0.02	0.88	0.13

BSS: % Bağıl Standart Sapma, Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır:  $t_{tablo} = 2.78 > t_{hesap} (p > 0.05)$  (Bkz. Ek 4)

Tutarlılığının değerlendirilmesi kapsamında ise Tablo 4.14'te gösterilen ayrı iki analizcinin bulguları istatistiksel açıdan kıyaslanmıştır.

**Tablo 4.14.** Geliştirilen HPLC yöntemine ait tutarlılık bulguları (Analiz edilen: 3.0 µg/mL KET, n = 6)

Etken Madde Miktarı (µg/mL)	1. Analizci		2. Analizci	
	Bulunan Miktar (µg/mL)	% Geri Kazanım	Bulunan Miktar (µg/mL)	% Geri Kazanım
3.0	2.97	98.97	2.99	99.81
	2.99	99.57	2.94	97.92
	3.00	99.99	2.98	99.33
	2.98	99.45	2.99	99.77
	2.99	99.76	2.97	99.07
	2.99	99.56	2.93	97.66
Xort	2.99 ± 0.00	99.55 ± 0.14	2.97 ± 0.01	98.93 ± 0.38
SS	0.01	0.34	0.03	0.93
BSS (%)	0.34	0.34	0.94	0.94
GA	2.98-3.00	99.19-99.91	2.94-3.00	97.95-99.90
İki analizcinin bulgularına göre Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi sonuçları: $t_{\text{hesap}} = 5 > t_{\text{tablo}} = 2$ , $p > 0.05$				

$\bar{X}$ : Ortalama±standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma (Bkz. Ek 2);  $t_H$ : Hesaplanan t değeri,  $t_T$ : n = 6 serbestlik derecesindeki teorik t değeri, p: Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. Ek 5)

#### 4.2.10. Spike Edilen Numunenin Analizi

Birbirinden bağımsız 3.0 µg/mL KET içeren altı plazma çözeltilisinin analiz sonuçlarına göre bulunan geri kazanım değerleri Tablo 4.15'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.15.** Spike edilen KET analizine ait geri kazanım değerleri (n = 6)

Analiz Edilen Etken Madde Miktarı	Bulunan Miktar (µg/mL)	% Geri Kazanım
3.0 µg/mL	2.98	99.35
	2.99	99.52
	2.98	99.29
	2.99	99.66
	2.99	99.51
	3.00	99.99
	Xort: 2.99 ± 0.003	Xort: 99.56 ± 0.103
	SS: 0.01	SS: 0.25
	BSS: %0.25	BSS: %0.25
	GA: 2.98-2.99	GA: 99.29-99.82

$\bar{X}$ : Ortalama ± Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA: Güven aralığı (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

## 5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında öncelikle, KET'in asetonitril ile protein çöktürmesi ardından ultrasantrifüj yönteminin uygulanmasıyla, numune hazırlama basamağı tamamlanmıştır. Hazırlanan numuneler, geliştirilip valide edilen HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Numune hazırlama basamağında kullanılan asetonitril ile plazma proteinlerine bağlanmış olan ilaç etken maddesinin bağları kopararak serbest ilaç moleküllerinin açığa çıkması sağlanırken, ultrafiltrasyon tekniği ile plazma proteinlerinin ortamdan uzaklaştırılarak matriks etkisinin giderilmesi amaçlanmıştır. Uygulanan numune hazırlama tekniğinin verimi, suya ve plazmaya eklenen KET standart çözeltisinin geri kazanım sonuçlarından da görüleceği üzere (Tablo 4.11), çok yüksek verimle gerçekleşmiştir. Matriksin söz konusu olmadığı suya spike edilen ilaç etken maddesinin ve plazmaya spike edilen ilaç etken maddesinin geri kazanım değerlerinin çok yakın bulunması numune hazırlama basamağının ne kadar başarılı olduğunu göstermektedir. Ayrıca gerçekleştirilen biyoanalitik analiz ile elde edilen doğruluk ve kesinlik çalışmalarına ait düşük BH ve BSS değerleri ile yüksek geri kazanım değerleri; uygulanan numune hazırlama tekniğiyle biyoanalitik örnek için neredeyse farmasötik örnek analizi kalitesinde sonuçların elde edilmesine neden olmuştur.

Kaynaklarda protein çöktürme ile yapılan analizler de yer almaktadır. Ultrafiltrasyon tekniğinin numune hazırlama basamağına katkısı bu çalışmanın, yapılmış olan başka bir çalışmayla (39) karşılaştırma tablosu Tablo 5.1 olarak verilmiştir.

**Tablo 5.1.** Yapılan çalışmanın başka bir çalışmayla (39) karşılaştırılması

<b>Geliştirilen Yöntem</b>		<b>Diğer Yöntem (39)</b>
<b>Ayırma Yöntemi</b>	Protein çöktürme + Ultrafiltrasyon	Protein çöktürme
<b>Hareketli Faz Bileşimi</b>	Asetonitril:40 mM Didsodyum hidrojen fosfat	Metanol:Su
<b>Hareketli Faz Oranı</b>	30:70	70:30
<b>Tampon Çözelti pH'ı</b>	6.0	3.3
<b>Akış Hızı (mL/dk)</b>	1.0	1.0
<b>Kolon</b>	ACE C18 (250 mm × 4.6 mm i.ç., 5 µm)	Discovery HS C18 (250 mm × 4.6 mm i.ç., 5 µm)
<b>UV (nm)</b>	258	260
<b>Geri Kazanım %</b>	100.07-100.31	99.0
<b>t<sub>R</sub> (dk)</b>	5.75	9.4
<b>Doğrusallık Aralığı (µg/mL)</b>	1.0-25	0.24-125
<b>r<sup>2</sup></b>	0.9999	0.9999
<b>LOQ (µg/mL)</b>	1.00	0.24
<b>LOD (µg/mL)</b>	0.33	0.12
<b>% BH gün içi</b>	0.30-1.90	0.30
<b>% BH günler arası</b>	0.01-1.60	0.70
<b>% BSS Gün içi</b>	0.30-1.06	0.98-0.99
<b>% BSS Günler arası</b>	0.16-1.23	0.98-0.99

Sadece protein çöktürme yöntemi ile yapılan analiz sonuçlarının geliştirdiğimiz numune ultrafiltrasyon ve protein çöktürme kombine yöntemi ile elde edilen numunelerin analiz sonuçları karşılaştırıldığında gün içi ve günler arası çalışmalarda daha düşük BH ve BSS değerleri ile daha yüksek geri kazanım sonuçları elde edildiği görülmektedir.

KET'in insan plazmasındaki çeşitli uygulama yollarına ait C<sub>max</sub> değerleri Tablo 5.2'de verilmiştir. Her ne kadar topikal uygulama ile elde edilen maksimum plazma düzeyi diğer formlara göre çok düşük olsa da, geliştirilen yöntem ile doğrusallık aralığı oral, ampul ve tablet formlarının analiz edilmesinde ve terapötik düzeylerinin izlenmesinde uygulanabilecek düzeydedir. Bu tezde analiz edilen



sentetik plazma numuneleri için belirlenen 3 µg/mL derişim düzeyi KET'in farklı formlarını da kapsayacak şekilde seçilmiştir.

**Tablo 5.2.** KET'in insan plazmasında topikal, oral, ampul ve tablet formlarda  $C_{max}$  değerleri (51,52)

Uygulama Yolu	$C_{max}$ (µg/mL)
<b>Topikal</b>	0.1-0.2
<b>Oral</b>	4.0-6.0
<b>Ampul</b>	20.0-30.0
<b>Tablet</b>	3.0-9.0

Numune hazırlama basamağının ardından, geliştirilip valide edilen HPLC yöntemi ile hazırlanan spike numuneleri analiz edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında amaç, ilaç sektöründe geniş bir kullanıma sahip olan NSAID ilaç olan KET'in, ultrafiltrasyon ile ayrılmasının ardından basit, güvenilir ve valide edilmiş bir HPLC yöntemi geliştirmektir. HPLC analiz yöntemleri kısa zamanda doğru sonuçlar verdiğinden ve uygulaması kolay olduğundan kalite kontrol laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, ultrafiltrasyon tekniği ile yüksek verimlilikte, yüksek saflıkta ve hızlı bir şekilde plazma numuneleri hazırlandıktan sonra optimize edilip, FDA (49) standartlarına göre valide edilen HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir.

### 5.1. HPLC Yöntemi

HPLC, birçok farklı numunenin belirlenmesi ve miktarlarının tespit edilmesi amacıyla, numunelerin sabit bir fazdan hareketli bir fazla geçirilerek ayrılmasını temel alan, yüksek hassasiyet ve ayırım sağlayan; farmasötik, gıda, çevre ve kimya endüstrisinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

Analiz için DrogSan İlaçları Sanayi ve Ticaret A. Ş.'den temin edilen KET etken maddesi kullanılmış, saflığı üreticiler tarafından iletilen sertifika ile doğrulanmıştır (Bkz. Ek 1).

KET analizleri, UV spektrumunda kaydedilen KET'in en yüksek absorpsiyon yaptığı (Şekil 4.1) dalga boyu olan 258 nm'de gerçekleştirilmiştir.

Cihazdaki belirsizlikleri önlemek ve bu belirsizliklerin sonuçlara etkisini minimize etmek için kullanılan iç standart kalibrasyon tekniğine, bir biyoanalitik

yöntemle analize göre çok düşük BSS ve BH değerleri kaydedildiğinden dolayı başvurulmamıştır. Pik normalizasyonu gerekmeksizin doğrudan kalibrasyon tekniği ile analizler yapılmıştır.

### 5.1.1. Sabit Faz

Kolonun uzunluğu 150 mm'den 250 mm'ye arttıkça, KET'in kolon içinde geçirdiği zaman artmış, uzun kolonlarda daha fazla teorik tabaka olduğundan N değerleri yüksek çıkmıştır. Analiz yöntemi geliştirme çalışmalarında, sabit faz olarak C<sub>18</sub> yapıda ve 250 mm uzunluğunda, hidrofobik bir özellik gösteren ACE C<sub>18</sub> (250 mm x 4.6 mm i.ç., 5 µm) ve hareketli faz olarak da daha polar bir özellik gösteren asetonitril ve tampon çözelti karışımının kullanımıyla ters faz sıvı kromatografisi geliştirilmiştir.

C<sub>18</sub> kolon yapısı hidrofobik olduğundan apolar bir sabit faz olarak kullanılırken, hareketli fazdaki sulu bileşene ilave edilen asetonitril ile hareketli fazın polaritesini azaltarak etken maddenin kolonda belirli bir süre tutunduktan sonra dedektöre ulaşması sağlanmıştır. Böylece, incelenen kolonlar arasında uygun t<sub>R</sub> elde edilen kolon seçilerek çalışmanın devamında kullanılmasına karar verilmiştir. Ters faz sıvı kromatografisinde organik çözücünün cinsi ve derişimi maddenin alıkonma zamanına etki eden temel bir parametredir.  $\alpha$  ve k'nün en yüksek olduğu, en iyi pik şekillerinin elde edildiği ve en kısa analit süresine sahip kromatografik şartlar göz önünde bulundurularak HPLC yöntemi geliştirilmiştir.

### 5.1.2. Organik Çözücü Etkisi

Asetonitrilin hareketli fazdaki derişiminin %25'ten %35'e derişimi sırasında KET maddesinin t<sub>R</sub> ve k' azalmış, %35 asetonitril oranında, k'nün kabul sınırları dışına çıktığı görülmüştür (iyi bir sistem uygunluğu optimizasyonu için k' > 2 olmalı). %35 asetonitril oranında, KET'in N'nın azalmış olduğu ancak kabul edilen aralıkta yer aldığı tespit edilmiştir (N > 2000). PAO'nın, hareketli faza %25 ve %30 oranlarında asetonitril eklendiğinde 1.5'tan küçük olduğu görülmüştür (PAO ≤ 1.5). %30 derişimde asetonitril içeren hareketli fazın k' değeri 2'nin üstünde olduğu için, bu orandaki hareketli faz KET'in kromatografik ayırım kriterlerini sağlamaktadır (Tablo 4.1).

### 5.1.3. Tampon Derişimi ve pH Etkisi

Hareketli fazdaki tampon pH'ı bazı etkileşimler sebebiyle analitin kromatografik matrisini etkilediği için, pH'taki değişimler  $t_R$ 'yi değiştirir, bundan dolayı pH değişimi önemli bir faktördür. Analit molekülleri pH değişiminden etkilenip hemen iyonize olabilir. Çalışmada tampon çözeltinin pH'ını ayarlamak için kullanılan  $H_3PO_4$  miktarı arttıkça,  $H_3PO_4$  molekülü daha fazla  $H^+$  iyonunu serbest bırakıp iyonlaşacağı için tampon çözeltinin pH'ı düşer ve analitin iyonizasyonu artar. Analiz esnasında tampon pH'sı 5.8, 6.0 ve 6.2 şeklinde değiştirilmiş ve cihaz optimizasyonu için sonuçlar incelenmiştir, pH 5.8 değerinde  $H^+$  iyonu daha fazla arttığından, KET molekülü kromatografik matrise daha az bağlanmış ve  $t_R$ 'nin de azaldığı görülmüştür. pH değerleri arttıkça  $t_R$ 'ler artmış, dolayısıyla  $k'$  artmış ancak pH 6.0 ve 6.2 iken kabul sınırları içinde kalmıştır. PAO'lar pH ile artmış ancak pH 6.2'de kabul sınırı dışına çıkmış, pH 6.0'da ise en düzgün oranı verdiği için tampon çözelti pH'ı 6.0 olarak seçilmiştir (Tablo 4.2).

Tampon çözeltinin hareketli fazdaki derişiminin artmasıyla  $k'$  nın arttığı ancak 40 mM ve 44 mM derişimlerde kabul sınırında olduğu; PAO'nun arttığı ancak 40 mM derişimlerde kabul kriterlerini sağladığı görülmüştür. N değerleri ise azalmıştır; ancak kabul sınırları içindedir. PAO'nun ve  $k'$  nın kabul sınırları içinde olduğu 40 mM tampon derişimi olarak seçilmiştir (Tablo 4.3).

### 5.1.4. Akış Hızı Etkisi

Akış hızının kromatografik faktörler üzerindeki rolünü araştırmak amacıyla denenen akış hızları 0.8, 1.0 ve 1.2 mL/dk'dır. Akış hızı artırıldıkça  $t_R$ 'nin ve  $k'$  nın azaldığı, hatta 1.2 mL/dk olduğunda  $k'$  nın sınır dışına çıktığı gözlenmiştir. N'ler akış hızı artışıyla azalmış, PAO'nun da artmakta olduğu görülmüştür, ancak PAO 1.2 mL/dk akış hızında kabul kriterleri dışındadır. Dolayısıyla 1.0 mL/dk akış hızı tercih edilmiştir (Tablo 4.4).

### 5.1.5. Enjeksiyon Hacmi Etkisi

Madde derişimi sabitken sistemdeki kütle miktarını enjeksiyon hacmi belirler. Enjeksiyon hacmindeki artış, kütle miktarında artışa dolayısıyla kolondan geçen

madde miktarında yüklenmeye sebep olur, buna bağlı olarak, kromatografide kuyruklanma olması beklenir. Bu çalışmada enjeksiyon hacminin artmasıyla  $t_R$ 'lerde bir değişim olmadığı ve dolayısıyla  $k'$  ların değişmediği görülürken, enjeksiyon hacmi 10  $\mu\text{L}$  ve üzerine çıktığında PAO'da artma, N'de ise azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak, 10  $\mu\text{L}$  enjeksiyon hacminde PAO kabul sınırları içinde olmasına rağmen, düzgün varsayılan pikler için belirtilen 0.9 – 1.2 aralığında değildir. Buna ek olarak, enjeksiyon hacmi artışıyla ortaya çıkan N'deki azalmanın PAO'ya belirgin biçimde yansımadığı da görülmüştür. Dolayısıyla, en iyi PAO'nun ve N'nin elde edildiği 20  $\mu\text{L}$  ve 30  $\mu\text{L}$  enjeksiyon hacimlerinden minimum olanının seçilmesi uygun bulunmuştur (Tablo 4.5).

### 5.1.6. HPLC Yönteminin Validasyonu

Çalışılan HPLC yönteminde sistem uygunluk testi için gerekli parametreler incelenmiştir ( $k' > 2$ ,  $N > 2000$ ,  $BSS \leq \%1$ ,  $PAO \leq 1.5$ ). Test için aynı standart çözeltinin 6 tekrarlı enjeksiyon sonuçları kullanılmış ve bu sonuçların kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu görülmüştür (Tablo 4.6). Ardından FDA Biyoanalitik Yöntem Validasyonu kılavuzuna göre kararlılık, seçicilik, doğrusalılık ve aralık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, tekrarlanabilirlik, duyarlılık, geri kazanım, sağlamlık ve tutarlılık faktörleri araştırılmıştır.

Yöntemi valide etmeden önce kararlılık parametresine bakılmış, standart çözeltinin kararlılığı belirlenmiş ve sonuçlar doğrultusunda çözeltinin hangi ortamda ne kadar süre muhafaza edilmesi gerektiği tespit edilmiştir.

### Kararlılık

Tüm çalışmalar boyunca her gün çalışma standart çözeltileri hazırlanmıştır. KET stok çözeltisinin aydınlık ortamda, karanlık ortamda ve buzdolabında sırasıyla 8 saat, 24 saat ve 48 saatlik kısa dönem ve yine buzdolabında 2 aylık uzun dönem kararlılık çalışmaları yapılmış ve bunun sonucunda KET maddesinin analiz sonuçlarındaki değişimler incelenmiştir (Tablo 4.7). Yapılan deneylerin sonuçlarına göre yüzde kalan miktarlar hesaplanmış, KET stok çözeltisinin + 4 °C buzdolabında kararlı olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla standart çözelti hazırlandıktan sonra buzdolabında 2 ay boyunca saklanabilmiş ve yeni standart çözelti 2 ay sonunda

hazırlanmıştır. Bunun yanında, her gün günlük olarak hazırlanan çalışma çözeltileri de 2 ay boyunca analiz için kullanılabilmiş, her deney öncesinde stok çözeltiden seyreltilerek hazırlanmıştır.

### **Seçicilik (Özgünlük)**

Seçicilik, KET'in analizi yapılırken ortamdaki diğer maddelerin varlığına rağmen analiz edilebilme yeteneğidir. KET standart çözeltisi, aynı derişimde plazma numunesi, ilaçsız plazma, hareketli faz numunelerine ait kromatogramlar karşılaştırılmış, analit pikinin hareketli fazın piklerinden veya plazmadaki herhangi bir matriks bileşeninden etkilenmediği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15).

### **Doğrusallık**

Geliştirilen yöntemde KET'in pik alanları derişime karşı grafiğe geçirildiğinde bulunan kalibrasyon eğrilerinin doğrusal olduğu derişim aralığının 1.0 – 25.0 µg/mL olduğu,  $t_H = 261.40$ ,  $t_T = 2.78$  olarak bulunduğu ve  $t_H > t_T$  olduğu için korelasyon katsayılarının öneminin belirgin olduğu istatistiksel hesaplamalarla saptanmıştır (Şekil 4.16, Tablo 4.8 ve Tablo 4.9,  $p < 0.05$ ). Ayrıca,  $F_H = 74429.50$ ,  $F_T = 7.71$  olarak bulunduğu ve  $F_H > F_T$  olduğu için ( $p < 0.05$ ) derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır. Bunlara ek olarak, eğrilerin tanımlayıcılık katsayılarının ise 1.0000 değerine çok yakın olan 0.9999 şeklinde tespit edilmesi, oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin doğrusallığını kanıtlamaktadır (Tablo 4.8).

### **Doğruluk ve Kesinlik**

Gün içi ve günler arası doğruluk araştırmaları için KET numuneleri 1.0, 5.0 ve 15.0 µg/mL şeklinde 3 ayrı konsantrasyonda 6'şar tekrarlı analizlerle çalışılmıştır. Buna göre metodun gün içi analiz sonuçlarından ulaşılan % BH verileri, 0.30 – 1.90 arasında değişmektedir. Günler arası analiz sonuçlarından bulunan verilere dayanarak % BH değerleri 0.01 – 1.60 arasında saptanmıştır (Tablo 4.10). Burada en yüksek % BH değerinin 2'yi geçmemesi (45, 46) şartı dikkate alındığında önerilen yöntemin doğru olduğu belirlenmiştir.

Yöntemin kesinlik araştırması için ise gün içi ve günler arası kesinlik deneylerine ek olarak cihazın ve yöntemin tekrarlanabilirlik araştırmaları için deneyler yapılmıştır. Kesinlik sonuçların tekrarlanabilirliğinin bir göstergesidir ve % BSS ile ifade edilir. Gün içi ve günler arası araştırmalarda denenen 3 ayrı konsantrasyon düzeyinde 6'şar çözeltiler analizlenmiş ve bulguların % BSS değerleri saptanmıştır. Gün içi analizlerden ulaşılan % BSS verileri 0.30 ile 1.06 aralığında iken, günler arasında bu 0.16 ile 1.23 aralığında bulunmuştur (Tablo 4.10). % BSS değerinin 2'yi geçmemesi (45, 46) şartı dikkate alınarak, yöntemin kesin olduğu kanıtlanmıştır.

### **Tekrarlanabilirlik**

Tekrarlanabilirlik araştırmasında, 3.0 µg/mL'lik 10 ayrı KET çözeltileri analizlenmiştir (Tablo 4.12). Saptanan % BSS değerleri 0.82 olup, %2'den az bulunması (46) sonuçların tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunun bir kanıtıdır.

Cihazın tekrarlanabilirlik çalışması, 3.0 µg/mL'lik KET çözeltilerinin aynı günde aynı vialden 10 kez enjeksiyonu sonucunda gerçekleştirilmiştir. KET'in pik alanı için % BSS değerinin 0.55 olarak bulunması %1'den (47) küçük olduğunu kanıtlayarak, cihazın tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

### **Duyarlılık**

Kalibrasyon eğrisinin eğim ve kestirimi kullanılarak hesaplanan LOD değerleri 0.33 µg/mL, LOQ değerleri ise 1.00 µg/mL olarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisi de LOQ değerinden başlayacak şekilde oluşturulmuştur. Bulgulara göre geliştirilen yöntem plazmadan KET analizi için yeterli duyarlılıktadır (45, 47).

### **Geri Kazanım**

Geri kazanım plazmada hazırlanan KET çözeltilerinin analizleri sonucunda, bağlı ve mutlak yüzde geri kazanım olarak ifade edilmiştir. Geri kazanım araştırması kapsamında 3 tane derişimde hazırlanan 6 ayrı çözeltiler analizlenmiştir. KET'in en düşük bağlı geri kazanım yüzdesi, 0.30 % BSS ile  $100.19 \pm 0.123$  şeklinde bulunmuştur. En düşük mutlak geri kazanım yüzdesi ise, 1.17 % BSS ile  $99.98 \pm 1.07$  şeklinde hesaplanmıştır (Tablo 4.11).

### Sağlamlık ve Tutarlılık

Yöntemin sağlamlık çalışması kapsamında hareketli fazdaki tampon çözeltinin derişimi, tampon çözeltinin pH'ı, hareketli fazın debisi ve çalışılan dalga boyu gibi bazı parametrelerde gerçekleştirilen değişikliklerin KET'in kantitatif tayinine etkisi araştırılıp değerlendirilmiştir. İstatistiksel inceleme neticesinde  $t_{\text{hesap}} < t_{\text{tablo}} = 2.78$  ( $p > 0.05$ ) olarak saptanmış ayrıca bu değişimlerin elde edilen sonuçları etkilemediği görülmüştür (Tablo 4.13).

Yöntemin tutarlılık çalışması kapsamında ise farklı iki analizcinin hazırladığı 6'şar ayrı çözeltinin analiz bulgularının istatistiksel açıdan kıyaslaması yapılmış,  $t_{\text{hesap}} > t_{\text{tablo}}$  ( $p > 0.05$ ) şeklinde bulunmuştur (Tablo 4.14). Buna göre, iki analistin bulduğu deneysel sonuçlar arasında önemsiz bir fark olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada, HPLC analizi ve FDA kriterlerine uygun olarak gerçekleştirilen kapsamlı validasyon, KET'in analiz sonuçlarının doğruluğunu, hassasiyetini, seçiciliğini, LOQ ve LOD değerlerini ve yöntem dayanıklılığını başarıyla teyit etmiştir. Bu bulgular, geliştirilen yöntemin güvenilir olduğunu ve araştırma amaçlı uygulamalarda güvenle kullanılabileceğini göstermektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İlaç endüstrisi ve birçok endüstride numunelerin belirlenebilmeleri, aynı zamanda yeni analiz metodlarının oluşturulabilmesi, analitik kimyanın araştırma alanına girmektedir. Ultrafiltrasyon tekniği ise birçok endüstriyel alanda çözeltilerin saflaştırılmasında bir ayırma işlemi olarak uzun süredir kullanılmaktadır. HPLC analizleri öncesinde numune hazırlama işlemini daha kısa tutabilmek ve zaman kazanabilmek adına araştırmacılara kullanması önerilen ultrafiltrasyon tekniğinin, birçok endüstriyel alanda üretim verimliliğini artırdığı görülmüştür.

Bu tez çalışmasında, bir NSAID olan KET'in ultrafiltrasyon tekniği ile insan plazmasından ayrımı yapılmış, ardından HPLC'de analizi için yöntem geliştirilmiş ve FDA Biyoanalitik Yöntem Validasyon kılavuzuna göre valide edilmiştir. Bu yöntemde tüm analizler ACE C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) kolon ile yapılmıştır. İyi bir kromatografik ayırma için hareketli faz olarak 40 mM derişiminde fosfat tamponu çözeltisi (pH 6.0) ve asetonitril 70:30 h/h oranında karıştırılmış, akış hızı ise 1.0 mL/dk şeklinde saptanmıştır. UV dedektör ile 258 nm'de çalışılmıştır. FDA Biyoanalitik Yöntem Validasyon kılavuzuna göre yöntem seçicilik, kararlılık, doğrusallık ve aralık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, tutarlılık, sağlamlık, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım parametrelerine göre valide edilmiş, yöntemin güvenilirliği kanıtlanmıştır.

Bu tez çalışmasında kullanılan ultrafiltrasyon tekniği araştırmacılara, kan plazması gibi birçok biyolojik materyallerden tek adımlı, kolay uygulanabilir, basit ve yenilikçi bir numune hazırlama seçeneği sunmaktadır.



## 7. KAYNAKLAR

1. Negru, J., Popa, D. S., Vlase, L., Iacob, D., Achim, M., Dorneanu, V. (2015). High-throughput HPLC method for rapid quantification of ketoprofen in human plasma. *Farmacia*, 63, 5.
2. Lovlin, R., Vakily, M., Jamali, F. (1996). Rapid, sensitive and direct chiral high performance liquid chromatographic method for ketoprofen enantiomers. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, 679, 196 – 198.
3. Jack, D. S., Rumble, R. H., Davies, N. W., Francis, H. W. (1992). Enantiospecific gas chromatographic – mass spectrometric procedure for the determination of ketoprofen and ibuprofen in synovial fluid and plasma: application to protein binding studies. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, 584, 189 – 197.
4. Paik, M. J., Nguyen, D. T., Kim, K. R. (2004). Enantioseparation of flurbiprofen and ketoprofen in patches and in urine excretions by achiral gas chromatography. *Archives of Pharmacal Research*, 27 (12), 1295 – 1301.
5. Głowka, F. K., Łada, M. K. (2008). CE Determination of ketoprofen enantiomers in clinical samples of plasma, synovial fluid and urine. *Chromatographia*, 67, 97 – 105.
6. Hawkey, C. J. (2000). Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology*, 119, 521 – 535.
7. Heyneman, C. A., Lawless – Liday, C., Wall, G. C. (2000). Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases. *Drugs*, 60 (3), 555 – 574.
8. Allegrini, A., Nuzzo, L., Zucchelli, M., Scaringi, A. T., Felaco, S., Giangreco, D., Pavone, D., Toniato, E., Mezzetti, A., Martinotti, S., Comuzio, S., Di Grigoli, M. (2009). Fast HPLC method for the determination of ketoprofen in human plasma using a monolithic column and its application to a comparative bioavailability study in man. *Arzneimittelforschung*, 59 (3), 135 – 140.
9. Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S., Pérez-Maseda, C. (1998). Chiral and nonchiral determination of ketoprofen in pharmaceuticals by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, 799, 301 – 307.
10. Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, Alaoui – Ismaili, S. (1997). UV – Spectrophotometric determination of ketoprofen and paraben in a gel preparation by partial least – squares calibration. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 357, 967 – 972.
11. Dvořák, J., Hájková, R., Matysová, L., Nováková, L., Koupparis, M. A., Solich, P. (2004). Simultaneous HPLC determination of ketoprofen and its degradation products in the presence of preservatives in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, 625 – 629.
12. Nováková, L., Matysová, L., Solichová, D., Koupparis, M. A., Solich, P. (2004). Comparison of performance of C18 monolithic rod columns and conventional C18 particle – packed columns in liquid chromatographic

- determination of estrogel and ketoprofen gel. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, 813, 191 – 197.
13. Bempong, D. K., Bhattacharyya, L. (2005). Development and validation of a stability – indicating high – performance liquid chromatographic assay for ketoprofen topical penetrating gel. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, 1073, 341 – 346.
  14. Mannucci, C., Bertini, J., Cocchini, A., Perico, A., Salvagnini, F., Triolo, A. (1992). High performance liquid chromatography simultaneous quantitation of ketoprofen and parabens in a commercial gel formulation. *Journal of Liquid Chromatography*, 15 (2), 327 – 335.
  15. Kotthireddy, K., Devi, B. R. (2016). Development of RP - HPLC method for the estimation of in vitro and in vivo samples of ketoprofen in bulk drug and transdermal dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7 (5), 2152 – 2156.
  16. Naid, T., Syukur, W. R., Ilyas, A., Dali, S., Hamzah, B. (2013). Validation of analysis method for determining ketoprofen concentration in pharmaceutical dosage form using high performance liquid chromatography. *European Journal of Chemistry*, 4 (1), 58 – 60.
  17. Zhuang, Y., Cao, G., Ge, C. (2012). Flow injection analysis of ketoprofen based on the order transform second chemiluminescence reaction. *Spectrochimica Acta Part A*, 85, 139 – 144.
  18. Zhuang, Y., Song, H. (2007). Sensitive determination of ketoprofen using flow injection with chemiluminescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 824 – 828.
  19. Emara, K. M., Ali, A. M. M., Abo-El Maali, N. (1994). The polarographic behaviour of ketoprofen and assay of its capsules using spectrophotometric and voltammetric methods. *Talanta*, 41 (5), 639 – 645.
  20. Šafra, J., Pospíšilová, M. (2008). Separation and determination of ketoprofen, methylparaben and propylparaben in pharmaceutical preparation by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 452 – 455.
  21. Amankwa, L., Chatten, L. G. (1984). Electrochemical reduction of ketoprofen and its determination in pharmaceutical dosage forms by differential – pulse polarography. *Analyst*, 109, 57 – 60.
  22. Kormosh, Z., Hunka, I., Bazel, Y., Matviychuk, O. (2010). Potentiometric determination of ketoprofen and piroxicam at a new PVC electrode based on ion associates of rhodamine 6G. *Materials Science and Engineering*, 30, 997 – 1002.
  23. Aboul – Enein, H. Y., Dal, A. G., Tuncel, M. (2003). A validated method development for ketoprofen by a flow – injection analysis with UV – detection and its application to pharmaceutical formulations. *Il Farmaco*, 58, 419 – 422.

24. Pabby, A. K., Rizvi, S. S. H., Sastre, A. M. (2015). Handbook of Membrane Separations: Chemical, Pharmaceutical, Food, and Biotechnological Applications. CRC Press.
25. Zwang, L., Blijenberg, B. G. (1992). Validation of the ultrafiltration technique for creatinine analysis by HPLC: A comparison with direct serum injection. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 30, 861 – 866.
26. Çelebier, M. (2021). Ultrafiltration – based sample preparation for pharmaceutical analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*, 17, 951 – 959.
27. Skoog, D., Holler, F.J., Crouch, S.R., (1998). Enstrümantal Analiz İlkeleri. Bilim Yayınları.
28. Krstulovic, A.M., Brown, P.R. (1982). Reversed-Phase High- Performance Liquid Chromatography. New York: John Wiley and Sons.
29. Hamilton, R.J., Sewell, P.A. Introduction To High Performance Liquid Chromatography (2 bs.). London: Chapman and Hall.
30. Gündüz, T. (1988). İstrümantal Analiz. Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları.
31. Meyer, V. R. (2010). Practical High Performance Liquid Chromatography. John Wiley and Sons Ltd.
32. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. (1979). Introduction to Modern Liquid Chromatography. John Wiley and Sons Ltd.
33. Haşçelik, Z. (2001). Nonsteroid Antiinflatuvar İlaçlar. Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi. <https://www.ttb.org.tr/sted/sted0101/5.html>
34. Rençber, S., Karavana, S. Y., Özyazıcı, M. (2009). Bioavailability file: Ketoprofen. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34, 203 – 216.
35. Kantor, T. G., (1986). Ketoprofen: A review of its pharmacologic and clinical properties. *Pharmacotherapy*, 6 (3), 93 – 103.
36. Coaccioli, S. (2011). Ketoprofen 2.5 % gel: a clinical overview. *European Review of Medical and Pharmacological Sciences*, 15, 943 – 949.
37. Carbone, C., Rende, P., Comberiat, P., Carnovale, D., Mammi, M., De Sarro, G. (2013). The safety of ketoprofen in different ages. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 4, 99 – 103.
38. Ketoprofen. National Library of Medicine. <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a686014.html>
39. Zafar, F., Shoaib, M. H., Naz, A., Yousuf, R. I., Ali, H. (2013). Determination of ketoprofen in human plasma by RP – HPLC. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4, 252 – 257.
40. Tsvetkova, B., Peikova, L. (2013). HPLC determination of ketoprofen in tablet dosage forms. *Trakia Journal of Sciences*, 1, 55 – 59.

41. Hayball, P. J., Nation, R. L., Bochner, F., Le Leu, R. K. (1991). Enantiospecific analysis of ketoprofen in plasma by high – performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 570, 446 – 452.
42. López – Munoz, F. J., Gama, N. V., Soria – Arteche, O., Pena, M. H., Domínguez – Ramírez, A. M., López, J. R. M. (2013). HPLC method with solid – phase extraction for determination of (R) – and (S) – ketoprofen in plasma without caffeine interference: Application to pharmacokinetic studies in rats. *Journal of Chromatographic Science*, 1 – 7.
43. Lovlin, R., Vakily, M., Jamali, F. (1996). Rapid, sensitive and direct chiral high – performance liquid chromatographic method for ketoprofen enantiomers. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, 679, 196 – 198.
44. Wanwimolruk, S., Wanwimolruk, S. Z., Zoest, A. R. (1991). Sensitive HPLC assay for ketoprofen in human plasma and its application to pharmacokinetic study. *Journal of Liquid Chromatography*, 14 (20), 3685 – 3694.
45. Ermer, J. (2001). Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 755 – 767.
46. Green, J. M. (1996). A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry News and Features*, 68, 305A – 309A.
47. Shabir, G. A., Lough, W. J., Arain, S. A., Bradshaw, T. K. (2007). Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30 (3), 311 – 333.
48. Alpar, R. Spor Bilimlerinde Uygulamalı İstatistik. Nobel Yayın Dağıtım.
49. Food, Administration, D. (2007) Guidance for industry: bioanalytical method validation (2001). Available from the website: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.
50. The United States Pharmacopeia, USP 24: The National Formulary, NF 19. (2005). United States Pharmacopeial Convention.
51. Drenth, B. B., (1984). Pharmacokinetics of ketoprofen following intravenous, intramuscular and oral administration to man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 27 (1), 125-129.
52. Medication Guide for Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs). Medsource Pharmaceuticals. <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/medguide.html>

## 8. EKLER

## EK 1. Sertifika

3.2.S.4.4 Seri Analizleri (Ketoprofen – Zhejiang Jiuzhou Pharmaceutical Co., Ltd.)

**ANALİZ SERTİFİKASI**

Ürün:	Ketoprofen	Kod No:	2014-0009
Seri No	8130201	Standard	EP 7.0
Ambalajlama	15	Üretim Tarihi	2013-02
Miktar	575.3 kg	Retest Tarihi	2018-01

Test	Özellik	Sonuç	
Görünüm	Beyaz ya da beyazımsı kristal toz	Beyaz kristal toz	
Tanımlama	A.Erime Noktası	94-97 °C	95.0 °C
	B.UV	255 nm (Maks. 255 nm) $E_{1cm}^{1\%} = 615-680$	255 nm (Maks. 255 nm) $E_{1cm}^{1\%} = 668$
	C. IR	Referans spektrum ile uyumlu	Referans spektrum ile uyumlu
	D. TLC	Referans $R_f$ ile uyumlu	Referans $R_f$ ile uyumlu
Çözelti Görünümü	Berraklık	Berrak	Berrak
	Renk	$\leq Y_6$	$< Y_6$
İlgili Bileşikler	İmpürite C	$\leq 0.2\%$	$\leq 0.05\%$ (Saptanmadı)
	İmpürite E	$\leq 0.2\%$	$\leq 0.05\%$ (Saptanmadı)
	İmpürite B	$\leq 0.2\%$	$\leq 0.05\%$ (Saptanmadı)
	İmpürite D	$\leq 0.2\%$	$\leq 0.05\%$ (0.03 %)
	İmpürite A	$\leq 0.2\%$	$\leq 0.05\%$ (Saptanmadı)
	İmpürite F	$\leq 0.2\%$	$\leq 0.05\%$ (Saptanmadı)
	İmpürite G	$\leq 0.10\%$	$\leq 0.05\%$ (Saptanmadı)
	Bilinmeyen İmpürite	$\leq 0.10\%$	$\leq 0.05\%$ (0.03 %)
	A ve C haricinde toplam impürite	$\leq 0.4\%$	$\leq 0.05\%$ (Saptanmadı)
Ağır metaller	$\leq 10$ ppm	$< 10$ ppm	
Kuruma Kaybı	$\leq 0.5\%$	0.40 %	
Sülfat Külü	$\leq 0.1\%$	$\leq 0.02\%$	
Miktar Tayini (Kuru baz)	99.0-100.5 %	100.1 %	
Artık Çözücüler	Benzen	$\leq 0.0001\%$ (1 ppm)	0.1 ppm
	Klorobenzen	$\leq 0.01\%$ (1 ppm)	23 ppm
<b>SONUÇLAR</b>		<b>EP 7.0 İLE UYUMLU</b>	

## EK 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

### **Bağıl Standart Sapma Hesaplanması**

$$\text{Bağıl Standart Sapma (BSS)} = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$$

SS: Standart sapma

$\bar{X}$ : Aritmetik ortalama

### **% Bağıl Hata Hesaplanması**

$$\% \text{ Bağıl Hata (\% BH)} = \frac{|\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar}|}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

### **Standart Hata Hesaplanması**

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

SS: Standart sapma

n: Ölçüm sayısı

### **% Geri Kazanım Hesaplanması**

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

### **Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması**

$$\mu = \bar{X} \pm (\text{SH} \times t) \quad \text{veya} \quad \bar{X} - \text{SH} < \mu < \bar{X} + \text{SH}$$

$\mu$ : Evren ortalaması

$\bar{X}$ : Örneklem ortalaması

SH: Standart hata

t: Seçilen yanılma düzeyi  $\alpha$  ile  $n - 1$  serbestlik derecesindeki t tablosundaki değer

### EK 3. Korelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

Bulunan korelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu test edilmiştir.

Testin yapımındaki işlemler:

1.  $H_0$ : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ( $r = 0$ ).
2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$t_{\text{hesap}} = \frac{r}{S_r}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}} \text{ (Korelasyon katsayısının standart hatası)}$$

3. Yanılma olasılığı olarak  $\alpha = 0.05$  seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi =  $n - 2$
5.  $\alpha = 0.05$  düzeyinde ve 4. maddede bulunan serbestlik derecesinde tablo t değerine bakılır.
6. Karşılaştırma: Eğer  $t_{\text{hesap}} > t_{\text{tablo}}$  ise  $H_0$  hipotezi reddedilir,  $t_{\text{hesap}} < t_{\text{tablo}}$  ise kabul edilir.
7. Karar: Korelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir ( $p < 0.05$ ) veya korelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir ( $p > 0.05$ ).

### Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamı bulunur:
  - a. Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

$$RKT = \frac{\left[ \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n} \right]^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

- b. Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

$$YOAKT = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

- c. Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı  $\rightarrow$  RAKT = YOAKT – RKT

2. Serbestlik dereceleri bulunur:
  - a. Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1
  - b. Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi  $\rightarrow$  YOASD = n - 1
  - c. Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi  $\rightarrow$  RASD = YOASD - RSD
3. Kareler Ortalamaları Bulunur:
  - a. Regresyon Kareler Ortalaması = RKT / RSD
  - b. Regresyondan Ayrılış Kareler Ortalaması  $\rightarrow$  RAKO = RAKT / RASD
4.  $H_0$  = Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.
5. Yanılma olasılığı  $\alpha = 0.05$  olarak seçilmiştir.
6.  $F = RKO / RAKO$
7.  $p = 0.05$  düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.
8. Karşılaştırma: Eğer  $F_{hesap} > F_{tablo}$  ise  $H_0$  hipotezi reddedilir,  $F_{hesap} < F_{tablo}$  ise kabul edilir.
9. Karar: Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır ( $F_{hesap}, p < 0.05$ ) veya doğrusal değildir ( $F_{hesap}, p > 0.05$ ).

### **Kesişimin Sıfırdan Ayrılışının Önem Kontrolü**

1.  $S_{yx} = \frac{\sum y^2 - (\sum x)^2/n}{n-1} \times \left[ \frac{(1-r)^2(n-1)}{n-2} \right]^{1/2}$
2.  $S_{H(a)} = (S_{yx})^2 \left[ \left( \frac{1}{n} \right) + \left( \frac{\bar{X}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right) \right]$
3.  $H_0$  = Kesişim değeri (a), sıfıra eşittir.
4. Yanılma olasılığı  $p = 0.05$  seçilmiştir.
5.  $t_H = a / S_{H(a)}$
6.  $\alpha = 0.05$  düzeyinde  $t_T$  değeri bulunur.
7. Karşılaştırma: Eğer  $t_{hesap} > t_{tablo}$  ise  $H_0$  hipotezi reddedilir,  $t_{hesap} < t_{tablo}$  ise kabul edilir.
8. Karar: Kesişim değeri sıfıra eşittir ( $t_H =$  Hesapla bulunan,  $p > 0.05$ ) veya kesişim değeri sıfırdan farklıdır ( $t_H =$  Hesapla bulunan,  $p < 0.05$ ).



#### EK 4. t – Testi

İki ortalama arasında fark olup olmadığını test eder.

$$s^2 = \frac{[(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2]}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$n_1$ : 1. yöntemin ölçüm sayısı

$n_2$ : 2. yöntemin ölçüm sayısı

$s_1$ : 1. yöntemin standart sapması

$s_2$ : 2. yöntemin standart sapması

$\bar{X}_1$ : 1. yöntemin ortalaması

$\bar{X}_2$ : 2. yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi =  $n_1 + n_2 - 2$

1.  $H_0 =$  İki ortalama arasında fark yoktur.
2.  $\alpha = 0.05$  yanılma düzeyinde ve  $n_1 + n_2 - 2$  serbestlik derecesindeki  $t_{\text{tablo}}$  değerine bakılır.
3. Karşılaştırma: Eğer  $t_{\text{hesap}} > t_{\text{tablo}}$  ise  $H_0$  hipotezi reddedilir,  $t_{\text{hesap}} < t_{\text{tablo}}$  ise kabul edilir.
4. Karar:
  - a. Ortalamalar arasında fark yoktur ( $t_{\text{hesap}}, p > 0.05$ ).
  - b. Ortalamalar arasında fark vardır ( $t_{\text{hesap}}, p < 0.05$ ).

### **EK 5. Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi**

Aynı örneklerin değişik iki durumdaki ölçüm sonuçları arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde  $n < 25$  ise uygulanan önemlilik testidir.

$H_0$  = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha=0,05$  yanılma düzeyi seçilmiştir.

#### **Test istatistiğinin hesaplanması:**

İki yöntemden elde edilen sonuçlar iki sütun şeklinde yanyana yazılır. Sağda yeni bir sütuna satırlar arasındaki farklar +/- işaretleriyle birlikte yazılır. Daha sonra bulunan farklar küçükten büyüğe doğru sıralanıp ve herbirinin karşısına sıra numarası yazılır. Sıra numaralarının önüne farklardaki +/- işaretleri yazılır. + ve - işaretli sıra numarası grupları arasında işareti sayıca fazla olan grup toplanır. Elde edilen değer, hesapla bulunan t değeridir ( $t_{\text{hesap}}$ ).

Ölçüm sayısı (n) serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.

Karar: a)  $t_{\text{hesap}} > t_{\text{tablo}}$  ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur ( $t_{\text{hesap}}$  = Hesaplanan t değeri,  $p < 0.05$ ).

b)  $t_{\text{hesap}} < t_{\text{tablo}}$  ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark vardır ( $t_{\text{hesap}}$  = Hesaplanan t değeri,  $p > 0.05$ ).

## EK 6. Orjinallik Ekran Çıktısı

### ULTRAFİLTASYON TEKNİĞİ KULLANILARAK KETOPROFEN'İN İNSAN PLAZMASINDAN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

#### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>17</b>	% <b>16</b>	% <b>8</b>	% <b>2</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>openaccess.hacettepe.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>5</b>
<b>2</b>	<b>acikbilim.yok.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>4</b>
<b>3</b>	<b>nek.istanbul.edu.tr:4444</b> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>4</b>	<b>openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>5</b>	<b>www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>6</b>	<b>acikerisim.sakarya.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<b>slideplayer.biz.tr</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>8</b>	<b>docplayer.biz.tr</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

## EK 7. Dijital Makbuz



### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: AYCAN DEMİR  
Ödev başlığı: ULTRAFİLTRASYON TEKNİĞİ KULLANILARAK KETOPROFENİN ...  
Gönderi Başlığı: ULTRAFİLTRASYON TEKNİĞİ KULLANILARAK KETOPROFENİN ...  
Dosya adı: Aycan\_Yu\_ksek\_Lisans\_Tezi\_V22\_SON.docx  
Dosya boyutu: 2.13M  
Sayfa sayısı: 87  
Kelime sayısı: 15,616  
Karakter sayısı: 102,170  
Gönderim Tarihi: 03-Tem-2024 09:50ÖÖ (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 2396051818



## 9. ÖZGEÇMİŞ