ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
ANALİTİK KİMYA
ANABİLİM DALI

FARMASOTİK PREPARATLARDA VE PLAZMADA ETODOLAK MİKTAR ANALİZİ

Pınar DEMİRCİ İNSUYU

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM 2008

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'un danışmanlığında, **Pınar DEMİRCİ İNSUYU** tarafından hazırlanan bu çalışma 26/09/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Analitik Kimya Programında bilim uzmanlığı tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU *imza*

Üye : Doç. Dr. İnci GÜL *imza*

Üye : Doç. Dr. Ufuk ÖZGEN *imza*

Üye : Doç. Dr. Zuhal GÜVENALP *imza*

Üye : Yrd. Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ *imza*

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(*imza*)

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. İsmail CEYLAN

İÇİNDEKİLER I
TEŞEKKÜR III
ÖZET IV
SUMMARY V
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Etodolak 3
2.1.1. Farmakolojik Özellikleri 3
2.1.2. Farmakokinetik Özellikleri 3
2.1.3. Endikasyonları 4
2.1.4. Kontrendikasyonları 4
2.1.5. Etodalak'ın İlaç Etkileşimleri 5
2.2. Etodalak İle İlgili Yapılan Çalışmalar 5
2.3. Spektrofotometre 9
2.3.1. Işığın Özellikleri 9
2.3.2. Spektroskopi 10
2.3.3. Işığın Absorplanması 10
2.3.4. Atomik Absorpsiyon Spektrumları 11
2.3.5. Moleküler Absorpsiyon Spektrumları 11
2.3.6. Geçirgenlik 11
2.4. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri 13
2.4.1. Tek Işınlı Spektrofotometreler 13
2.4.2. Çift Işınlı Spektrofotometreler 14
2.4.3. Spektroskopinin Kullanım Amaçları 14
2.4.3.1. Nitel Analiz: 14
2.4.3.2. Nicel Analiz: 14
2.4.5. Türev ve Çift Dalga Boylu Spektrofotometri 15
3. MATERYAL VE METOD 16
3.1. MATERYAL 16
3.1.1. Kimyasal Maddeler 16
3.1.2. Cihazlar 16
3.2. METOD 17
3.2.1. Spektrofotometrik Metodlar 17
3.2.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması 17
3.2.1.2. Spektrofotometrik Yöntem Şartları 17
3.2.3. Ekstraksiyon Prosesi 18
3.2.4. Yöntemin Analitik Validasyonu 18
3.2.4.1. Stabilite 19
3.2.4.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi 19
3.2.4.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik 19
3.2.5. İn Vivo Çalışmalar 19
3.2.5.1. Tabletlerin Hazırlanması 20
4. BULGULAR 21
4.1. UV-Visible Spektrofotometri Yöntemi 21
4.1.1. İn Vitro Koşullardaki Çalışmalar ve Validasyonu 21
4.1.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması 21
4.1.1.2. Yöntem Validasyonu 22
4.1.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri 22

4.1.1.2.2. Doğrusallık. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik....23
4.1.1.3. Yöntemin Farmasötük Preparatlara Uygulanması....24
4.1.1.3.1. Etol fort....24
4.1.1.3.2. Tadolak fort....26
4.1.1.3.3. Tadolak....28
4.1.2. Plazmadan Geri Kazanım Çalışmaları....30
4.1.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması....30
4.1.2.2. Yöntem Validasyonu....33
4.1.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri....33
4.1.2.2.2. Doğrusallık Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik....36
4.1.3. Etodolak'ın Plazma Çözeltilerinin Stabilitesi....37
5. TARTIŞMA VE YORUM....39
6. KAYNAKLAR....41
7. EKLER....45

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU yöneticiliğinde Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.B.D.'da gerçekleştirilmiştir.

Başta çalışmalarım esnasında beni yönlendiren, yardımlarını esirgemeyen her türlü desteği sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU olmak üzere,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında ve tezimin yazımında destek ve sabrından dolayı Sayın Arş. Gör. Fatma DEMİRKAYA'ya,

Çalışmalarımın sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş.Gör.Murat ÖZTÜRK ve Sayın Arş. Gör. Alptuğ ATİLA'ya,

İlgi ,yardım ve manevi desteklerini gördüğüm ablam Sayın Dr. Kimyager Demet DEMİRCİ GÜLTEKİN ve Sayın yüksek kimyager Bahar DEMİRCİ DUYMUŞ'a,

Tezimin yazımında büyük emeği olan kardeşim işletmeci Sayın M.Emrah DEMİRCİ'ye,

Çalışmalarım sırasında ortak zamanımızı almamı anlayışla karşılayan eşim Barış Varol İNSUYU'na,

Bildiğim bütün iyi şeyleri kendisinden öğrendiğim sevgili babam Remzi DEMİRCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Erzurum, 2008 Pınar DEMİRCİ İNSUYU

ÖZET

FARMASOTİK PREPARATLARDA VE PLAZMADA ETODOLAK MİKTAR ANALİZİ

Non-steroid antiinflamatuar olan etodolak'ın hem farmasotik preparatlarda hem de plazmada miktar analizi için UV Görünür Bölge Spektrofotometrisi, Birinci Türev Spektrofotometrisi, İkinci Türev Spektrofotometrisi yöntemleri geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı.

UV Görünür Bölge Spektrofotometrisi yönteminde etodolak 277 nm dalga boyunda absorbans göstermektedir. İn-Vitro çalışmada gün-içi günler-arası değerleri, bağıl standart sapması (RSD) ve geri kazanım değerleri ölçüldü.

Birinci Türev Spektrofotometri yönteminde, 285 nm'de minumum, 293 nm'de maksimum pik değerleri elde edildi. Bu çalışma iki pikin absorbans verdiği dalga boylarında gerçekleştirildi. İn-Vitro çalışmada gün-içi günler-arası değerleri, bağıl standart sapması (RSD) ve geri kazanım değerleri ölçüldü.

İkinci Türev Spektrofotometri yönteminde, 287 nm'de minumum, 300 nm'de maksimum iki pik değerleri elde edildi. Bu çalışma iki pikin absorbans verdiği dalga boylarında gerçekleştirildi. İn-Vitro çalışmada gün-içi günler-arası değerleri, bağıl standart sapması (RSD) ve geri kazanım değerleri ölçüldü.

Anahtar Kelimeler: Etodolak, U.V.-Görünür Bölge Spektrofotometrisi, Plazma

SUMMARY

BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION OF ETODOLAC

For the analysis of Etodolac of nonsteroidal anti-inflammatory in both pharmaceutical preparations and in plasma, UV-Visible Spectrophotometer, First Derivate Spectrophotometry, Second Derivate Spectrophotomery methods were developed and varidated.

In UV-Visible Spectrophotometry methods, Etodolac showed absorbance in 277 nm wavelength. Relative standard deviation (RSD) of intra-day inter-day values and values of recovery were determinated.

In the First Derivate Spectrophotometry method, two peaks were observed as one minumum at 285 nm, and one maximum at 293 nm. The study was carried out on the wavelenghts where the two peaks gave absorbance. Relative standard deviation (RSD) of intra-day inter-day values and values of recovery were determinated.

In the Second Derivate Spectrophotometry method, two peaks were observed as one minumum at 287 nm, and one maximum at 300 nm. The study was carried out on the wavelenghts where the two peaks gave absorbannce. Relative standard deviation (RSD) of intra-day inter-day values and values of recovery were determinated.

Key Words: Etodolac, U.V.-Visible Spectrophotometry, Plasma

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tarihin en eski ve üzerinde en fazla çalışılmış problemlerinden biri ilaç kullanarak ağrıdan kurtulmaktır. Merkezi sinir sistemine etki eden ve ağrıyı dindirmekte kullanılan ilaçlar genel olarak analjezikler diye isimlendirilir. İnsanlar en eski medeniyet çağlarından beri ağrıyı dindirmek için bitkilerden elde ettikleri maddeleri kullanıyorlardı.[1]

Antiinflamatuar ilaçlar enflamasyonu azaltarak alerji belirtilerini gidermek üzere tasarlanmışlardır. Pek çoğu tüm mevsimsel alerji belirtilerini etkin bir biçimde tedavi etmelerine rağmen bu ilaçların en etkili yönü nazal tıkanıklığı gidermeleridir.

Analjezik veya daha basit bir ifadeyle *ağrı kesici*, ağrı dindirmek ve *analjeziye* (acı yitimine) yol açmak için kullanılan her türlü ilaca verilen isim. Yunanca *an-* (olmadan) ve *-algia* (ağrı) kelimelerinden türemiştir. Analjezik ilaçlar periferik ve merkezi sinir sistemine etki eder.

Başlıca kullanım yerleri olarak; artritler, romatizmal ateş, reiter sendromu, iskelet-kas sistemi ile ilgili artrit dışı durumlarda infeksiyon hastalıklarında, ateş düşürülmesi için, antitrombositik olarak çeşitli ağrılı durumlardır. Etkisiz olduğu durumlar ise, ilaç ateşi, malign hipertermi, nöroleptik malign sendrom, güneş çarpmasıdır.

Antiinflamatuar; iltihapla savaşan ilaçlardır. Herhangi bir maddenin iltihap azaltıcı özelliğine verilebilecek isim. Analjeziklerin neredeyse yarısını oluşturan antiinflamatuarlar enflamasyon yani iltihaplanmayı azaltarak ağrıyı azaltırlar. İltihap; fiziksel, kimyasal ya da biyolojik herhangi bir saldırıya karşı dokuların gösterdiği özgül tepkidir. Bu durum, kullanılmakta olan antiinflamatuar maddelerinin sayıca çokluğunu çeşitliliğini açıkladığı gibi, bunların etki tarzları arasındaki farklılıkları da açıklar.

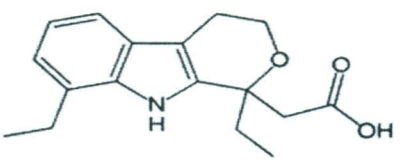
Kortizonlu antiinflamatuarlar önce damar tonusunu artırırlar, sonra lökosit istilasını yavaşlatır ve özellikle fibroblast ve granülasyon dokusunun oluşumunu engellerler. Salisilatlı olanlar iltihabın başlangıç devresinde etkilidirler. Ödem üstündeki etkilerine bir de ağrı kesici etkileri eklenir.

Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar, kısaca NSAİİler, analjezik, antipiretik ve antiinflamatuar etkili ilaçlardır. Ağrı, ateş ve enflamasyonu azaltırlar. "Non-steroidal" terimi bu ilaçları benzer etkileri olan (çok daha geniş etki alanları vardır) steroidlerden ayırmak için kullanılır. NSAİİ'ler narkotik değildirler. NSAİİ'ler bazen NSAİA (sondaki A-Analjezik kısaltması) olarak da adlandırılırlar.

Bu çalışmada; analjezik ve antiinflamatuar ilaç grubundan olan etodolak etken maddesinin insan plazması ve ticari preperatlardaki miktar analizi için, UV-Görünür Bölge Spektrofotometrik ve türev spektroskopi yöntemi geliştirilerek geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etodolak



Şekil 2.1: Etodolak'ın kimyasal yapısı

Molekül yapısı: $C_{17}H_{21}NO_3$, 1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropiran-[3,4-b]indol-1-asetik asit[2]

Etodolak indol türevi bir non-steroid antiinflamatuar ilaçtır.

2.1.1. Farmakolojik Özellikleri

Etodolak antiinflamatuar, analjezik ve antipiretik özellikler gösterir. Etodolak enflamasyonlu dokuda prostaglandin sentezini inhibe eder. Böylece ağrı reseptörlerinin, enflamasyonun mediatörleri olan histamin, serotonin ve kininlere karşı duyarlığını azaltır, önler.[1]

2.1.2. Farmakokinetik Özellikleri

Etodolak oral yoldan alındığında iyi absorbe olur ve yaklaşık bir saatte plazma pik derişimine ulaşır. Plazma pik derişimi 18,6 mcg/ml'dir. İlaç yüksek oranda proteinlere bağlanır, serbest fraksiyon ise % 1,2 - % 4,7 arasında değişir. Biyoyararlılığı 68 mcg/ml/saat, ortalama yarı ömrü 7 saat, dağılım hacmi 0,4 lt/kg, plazma klerensi 41 ml/saat/kg'dır. Etodolak'ın biyoyararlanımı gıda ve antiasitlerle değişmez.[1, 3]

2.1.3. Etodolak'ın İlaç Etkileşimleri

Etodolak yüksek oranda proteinlere bağlandığından birlikte kullanımları sırasında proteinlere yüksek oranda bağlanan diğer ilaçların (antikoagülanların) dozlarında ayarlama yapmak gerekir.[1]

Etodolak'ın glyburide(glibenclamide) ile birlikte kullanımında belirgin bir farmakokinetik ya da farmakodinamik etkileşme görülmemiştir.

Etodolak'ın, diğer NSAİ ilaçlar gibi, renal prostaglandinler üzerine olan etkileri nedeniyle; siklosporin, digoksin, lityum ve metotreksat ile birlikte kullanımı, söz konusu ilaçların eliminasyonunda değişikliğe yol açabilir ve sonuçta bu ilaçların serum düzeylerinde oluşan yükselmeler toksisite artışına neden olabilir. Siklosporin, digoksin, lityum ve metotreksat ile birlikte etodolak ya da başka bir NSAİ ilaç kullanan hastalar (özellikle böbrek fonksiyonları bozulmuş olanlar), söz konusu ilaçlara bağlı spesifik toksisite gelişmesi açısından gözlenmelidir. Kardiyak, renal veya hepatik yetmezliği olan, diüretik kullanan hastalarda etodolak dikkatle kullanılmalıdır.[1]

Etodolak aşağıdaki ilaçlarla birlikte kullanıldığında aditif etkileşmeye neden olur. Tiklopidinin trombositler üzerindeki antiagregan etkisini artırır. Birlikte kullanım sırasında kanama zamanı takip edilmelidir. Diğer non-steroidal antiinflamatuar ajanlarla birlikte kullanıldığında ülser ve hemoraji riski artar. Etodolak'ın fenitoin ile birlikte kullanımında belirgin bir farmakokinetik etkileşme görülmemiştir.

2.1.4. Kullanım Şekli ve Dozu

Romatizmal hastalıklarda; genel olarak günde 2 kez 400 mg dozunda, akut enflamatuvar ve ağrılı olgularda ise; günde 3 kez 400 mg dozunda kullanılır.

2.1.5. Ticari Takdim Şekli

- Etol fort (Nobel) tablet 400 mg
- Tadolak (Saba) tablet 200 mg
- Tadolak (Saba) tablet 200 mg

2.2. Etodolak İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Yılmaz ve arkadaşları[4] karbon elektrot kullanmak suretiyle etodolak'ın oksidasyonunu farklı voltametrik tekniklerle incelemişlerdir. Bu amaçla etodolak'ın optimize şartlarının belirlenmesi için bazı parametreler esas alınarak çalışılmıştır. Akım ve potansiyel şiddeti üzerine pH, derişim ve kullanılan tamponun özellikleri tartışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en uygun şartların Britton-Robinson tamponu (pH=2,15) olmak üzere, lineer voltametri tekniğine göre $2x10^{-6}$ – $8x10^{-5}$ M, puls voltametri tekniğine göre $6x10^{-6}$- $8x10^{-5}$ M derişim aralığında denemeler yapılmıştır.

Garcia ve arkadaşları[5] etodolak'ın belirlenmesi için 2,2'azinobis(3-etil benzothıazine-6 sülfonik asit) ($ABTS^+$) radikalindeki 734 nm'de alınan absorbans değerlerinde gözlenen değişime dayanan bir yöntem önermişlerdir. $ABTS^+$ etodolak reaksiyonu için uygun değerler 0,205 ml $ABTS^+$ ve 0,329 ml etodolak olduğu durumda gözlenmiştir.

Ak ve arkadaşları[6] etodolak'ın belirlenmesi için kapiler bir elektroforetik yöntem geliştirmişlerdir. Etodolak ve bir internal standart (IS), erişmiş bir silika kapileri kullanılarak pH'sı 9,3 olan 10 mM borat varlığında çalışma yürütülmüştür. Ayırım 25 kV uygulanarak, absorbans ölçümleri ise 226 nm'de gerçekleştirilmiştir. Buna göre, ortalama göç zamanı etodolak ve IS için sırasıyla 7,1 ve 8,3 dakika olarak ölçülmüştür. Ayrıca pik alanları ve pik normalizasyon oranları belirlenmiştir. $1x10^{-5}$-$2x10^{-4}$ M derişim aralığında çalışılmıştır.

Davis ve arkadaşları[7] etodolak'ın atlar üzerinde farmakokinetiğini belirlemişlerdir. Üç haftalık süre ile atlara 20 mg/kg oranında etodolak verilmiş ve daha sonra alınan plazma örneklerinde etodolak miktarı UV ve HPLC ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, etodolak'ın plazma yarı ömrü ($t_{1/2}$) 2,67 saat, dağılım hacmi (V_d) 0,29 l/kg ve temizlenme işlemi de 234,87 ml/saat.kg olarak belirlenmiştir.

El Kousy[8] etodolak ve aceclofenak'ın miktar analizinde spektrofotometrik ve spektroflorometrik yöntemlerini uygulamışlardır. İlk yöntemde etodolak ve p-dimetilaminobenzaldehit (PDAB) sülfürik asit ve demir klorür varlığında reaksiyona sokulması sonucunda renkli bir kompleks elde edilerek spektofotometride analizi gerçekleştirilmiştir. İkinci yöntemde ise, etodolak'ın etanol içerisinde 235 nm'de uyarılma dalga boyuna karşılık 345 nm'deki floresans değerleri ölçülmüştür.

Strickman ve arkadaşları[9] ve Strickman ve Blaschke[10] kapiler yüksek performans sıvı kromatografisi (kapiler HPLC), basınç destekli kapiler elektrokromatografi (pCEC) ve kapiler elektrokromatografisi (CEC) tekniklerini kullanarak pik verimliliği ve ayırma gücünü kıyaslamışlardır. Bu amaçla çalışmada etodolak (ET-1), 6-hidroksi etodolak (6-OH-ET), 7- hidroksi etodolak (7-OH-ET,3) ve 8-(1'-hidroksi etil etodolak (8-OH-ET, 4) örnek olarak seçilmiştir. Ürün tespiti; elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi (ES-MS) ile CEC'in birlikte kombine edilmesiyle yapılmıştır. Bu şekilde ticari cihazlarda gözlenen bazı teknik dezavantajların elimine edildiği belirlenmiştir.

Pablos ve arkadaşları[11] yaptıkları çalışmada farklı biyolojik aktivite ve farmokokinetik profiline sahip etodolak enantiomerlerinin ayrımlarını, kapiler elektroforezde iyi bir kiral seçici olan 2-hidroksi probil- β-siklodextrin (HP- β- CD) varlığında incelemişlerdir. Kapiler sıcaklık ve ayırım voltajı gibi enstrümental

parametreler ile birlikte, CD'nin derişimi ile tampon derişimlerinin enantiomerler üzerine etkisi çalışılmıştır. Etodolak enantiomerlerinin en yüksek kararlılığı 360 nm'de, referans dalga boyu olmak üzere 225 nm'de ölçülerek 2,5 olarak belirlenmiştir. Bu ölçümler 100 mM fosfat tamponu (pH = 7,0) ve 20 mM HP- β- CD kullanılarak yapılmıştır.

Fanali ve arkadaşları[12] farmasötik öneme sahip kiral anyonik bileşiklerin (etodolak, karprofen, flubifrofen, ketoprifen, naproksen) ayrılması ve analizi için kiral bir selektör olarak vankomisin kullanarak kapiler elektroforez-elektosiprey kütle spektrometri (CE-ESI-MS) yöntemi kullanmışlardır.

Shi ve arkadaşları[13] tavşanlarda etodolak enantiomerlerinin farmakokinetik özelliklerini ters faz HPLC yöntemiyle incelemişler ve enantiomerlerin farmakokinetik özelliklerinin farklı olduğunu tespit etmişlerdir.

Gouda ve Hassan[14] farmasötik preparatlarda etodolak miktar tayini için bipridil ya da o-fenantroline (o-phen) varlığında Fe^{3+} ile etodolakın oksidasyonuna dayanan spektrofotometrik bir yöntem önermişlerdir. Oksidasyon reaksiyonu üzerine pH, tampon çözeltilerin etkileri incelenmiştir.

Lee ve arkadaşları[15] -80^0C'deki depoladıkları ve işlemden önce oda ısında getirilen plazma örneklerine butilasetat ilave edilerek santrifüj ederek organik kısmı ayırıp kalıntıyı asetonitrilde çözmüşler ve kütle spektrometri (MS) yöntemini kullanmışlardır.

Boni ve arkadaşları[16] hazırladıkları farklı konsantrasyondaki etodolak standart çözeltilerini insan plazmasına uygulayarak HPLC yöntemiyle etodolak'ın geri kazanımını %85-%94,8 aralığında bulmuşlar.

Corlett ve Chyrstyn[17] siklofosfamit enantiomerlerinin analiz edilerek serum konsontrasyonu ölçümleri ile kiral-akiral çifti HPLC yöntemiyle belirlemişlerdir. Hastalardan alınan 0,30 ile 0.75 gm^{-2} intravenüz rasemik siklofosfamit örnekleriyle serum enantiomer konsantrasyonlarında ölçmüşlerdir.

Mao ve arkadaşları[18] standart solüsyona plazma örneklerini ilave ederek LC-MS/MS yöntemini kullanmışlardır. Tavşan üzerinde seçici ve duyarlı olan HPLC ve LC-MS/MS yöntemiyle direk enjeksiyon metodunu kullanmışlardır.

Walker ve Kanfer[19] kesin doğru duyarlı seciçi HPLC metodu ile inaktif metodonun belirlenmesi yötemini geliştirmişlerdir.

Giuliano ve arkadaşları[20] tavşanlarda non-steroid antiinflamatuar ilaçların sikleogenez 1 ve 2'de hücre dışı aktivitesini denemişlerdir. Bu çalışmada gönüllü deneklerle yapılmıştır. Gönüllü sağlıklı denekler 5 gün oral yolla etodolak almışlardır. Gönüllü deneklerden ilk alınan kan örneklerinden 24 saat sonra tekrar kan örnekleri alınmıştır. Etodolak ilave edilen plazma örneklerinde sikleogenez-2'nin seçiciliğini araştırmışlardır.

Costa ve arkadaşları[21] klinik ölçümlerde bir non-steroid antiinflamatuar ajan olarak kullanılan etodolak Friedel-Crafts reaksiyonunda 7-etilpropil ve β-ketoester ile hidroliz edilmiştir. (+)-(S) enantiomeri kimyasal reaksiyonlarla elde edilmiştir.

Duymuş ve arkadaşları[22] bazı non-steroid antiinflamatuar ilaçların komplekslerini etadolak ve naproksen gibi elektron dönörleri ve bazı π-alıcılarının 21^0C'de kloroformla spektrofotometrik yöntemle araştırmışlardır.

Lin ve arkadaşları[23] sikleoksigenaz (COX-2) proteinini canlı kanser hücrelerine vererek tümörün büyümesini rapor etmişlerdir. Etodolak gibi non-steroid antiinflamatuar ilaçların kanserin önlenmesinde COX-2'nin rol oynayabildiği

belirtilmiştir. Bu çalışma COX-2 inhibitörlerinin insan kolon kanseri hücrelerinde ölümü artırabileceğini belirtmişlerdir.

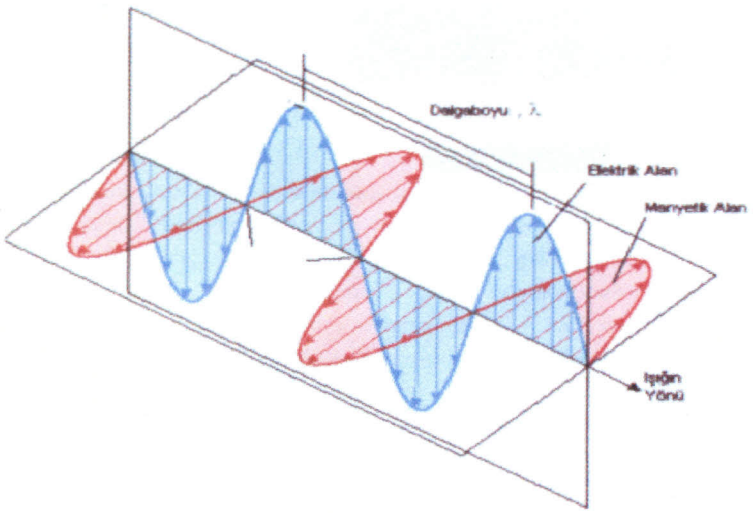
2.3. Spektrofotometre

2.3.1. Işığın Özellikleri

Enerji transferi üzerine yapılan araştırma çalışmaları son yıllarda giderek artmıştır. Enerji transferinin temelini, ışığın madde ile etkileşimi oluşturduğundan, ışığın yapısının iyi bilinmesi gerekir.[24] Işık sinüsoidal harekete sahip olup birbirine dik elektrik ve manyetik alan reflektörlerinden oluşmaktadır. Işığın dalga hareketi yanında teorik özelliği de sahip olduğu, Plank'ın siyah cisim ışıması olayı ve Einstein'in fotoelektrik olayı ile kanıtlanmıştır.

Kuantum mekaniksel teori; elektromanyetik ışınımın soğurulmasını ve yayılmasını izah eder. Bir madde, üzerine düşürülen çeşitli dalga boylarındaki ışınımlardan ancak bazılarını soğurur. Işığın elektrik alan vektörüyle bir maddenin dipol momentinin örtüşmesi neticesinde, soğurma enerjisi maddeye yani atom veya moleküle aktarılır. Böylece atom ve moleküllerin uyarılmış halleri oluşur. Uyarılmış atom veya moleküller daha sonra, soğurduğu enerjiyi çeşitli yollarla geri vererek temel hale döner. Bir molekül tarafından soğurulan enerjinin geri verilmesi genellikle ısı veya ışıma şeklinde olur. Her atom veya molekülün elektromanyetik radyasyon ile kendine has bir etkileşimi vardır. Moleküllerin dönme, titreşim ve elektronik enerjilerinde meydana gelen değişiklikler en önemli spektroskopi türlerini oluşurur.[27]

Işığın elektromanyetik radyasyonunun bileşenleri temsili olarak aşağıda şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2: Elektromanyetik Radyasyonun Dalga Hareketi[27]

2.3.2. Spektroskopi

Fotofiziksel ve fotokimyasal işlemler, elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşiminin bir sonucudur. Fotofiziksel olaylarda enerjinin ilgilenilen sistemler için çeşitli hallere dönüşümü söz konusu iken, fotokimyasal olaylarda ise enerjinin yani ışığın kimyasal değişimi söz konusudur. Işığın madde ile etkileşmesi, elektromanyetik bir dalga ile bir molekül veya atomun etkileşmesidir. Moleküle elektromanyetik dalganın sonucunda, o moleküllerin öteleme, dönme, titreşimsel ve elektronik uyarılmış hallerin oluşumu söz konusudur. Fotofiziksel ve fotokimyasal işlemler elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşiminin bir sonucudur. Elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşimini inceleyen bilim dalı ise spektroskopidir.[26, 27]

2.3.3. Işığın Absorplanması

Absorpsiyonla ışın enerjisi, maddenin iyon, atom, moleküllerine aktarılır. Böylece ışın enerjisini absorplamış olan iyon, atom veya moleküller uyarılmış hale

geçerler. Uyarılmış bir atom veya molekül 10^{-8} saniye kadar yaşayabilir.[26] Sonra absorplandığı ışın enerjisini geri vererek tekrar eski haline veya temel haline döner. Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları, başka bir maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır. Bu spektrumlar genel olarak iki kısma ayrılır.[25]

1. Atomik Absorpsiyon Spektrumları (AAS)
2. Moleküler Absorpsiyon Spektrumları (MAS)

2.3.4. Atomik Absorpsiyon Spektrumları

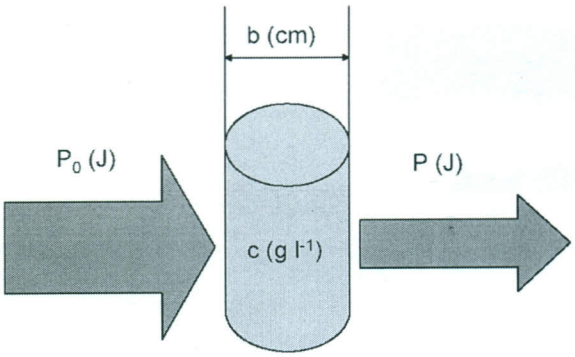
Atomlar en dış tabaka elektronlarının (valans) uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına atomik absorpsiyon, en iç tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına da X-ışınları spektroskopisi denir.[26]

2.3.5. Moleküler Absorpsiyon Spektrumları

Moleküler absorpsiyon spektroskopisinin, atomik absorpsiyon spektroskopisinden ayrılan en önemli yanı; atomik absorpsiyon spektroskopisinde birbirinden farklı dalga boylarında keskin çizgiler meydana gelmesine karşılık, moleküler absorpsiyon spektroskopisinde, birçok dalga boylarını içine alan geniş absorpsiyon bantlarının meydana gelmesidir.[26] Bir molekülün UV-Görünür alan spektrumu, molekülün bağ elektronlarından birinin bir foton enerjisini absorplayarak bir üst elektronik seviyeye geçmesi şeklinde açıklanabilir.[26]

2.3.6. Geçirgenlik

Bir maddenin çözeltisinden polikromatik bir ışın demeti geçirilirse, demette bulunan bazı ışınlar madde tarafından absoplanır ve demet çözeltiden şiddetinden bir miktar kaybederek çıkar.[25, 26]



Şekil 2.3: Bir kapta bulunan çözelti üzerrine gönderilen Po ışın demetinin yansıma, saçılma (dağılma) ve absorbansla zayıflaması ve P demeti olarak çözeltiyi terk etmesi

Bunun sonucu çözeltiye Po şiddetinde giren ışın demeti, çözeltiyi P şiddetinde terk eder. Başka bir deyişle çözeltiden geçen ışın demetinin şiddeti Po dan P' ye düşmüş olur. Işın demetinin çözeltiden geçme oranı P/Po şeklinde gösterilir. Bu orana geçirgenlik (T) denir.[25, 27] Geçirgenlik:

$T = \frac{P}{Po}$ şeklinde gösterilir.

Geçirgenliğin eksi logaritması absorbans (A) olarak adlandırılır ve absorbans

$$A = -\log_{10} T = -\log \frac{P}{P_0}$$

şeklinde formüle edilir. Çalışmalarda absorplanan ışın miktarı ya geçirgenlik ya da absorbans olarak verilir. Geçirgenlik, genellikle yüzde olarak verilir:

$$\%T = \frac{P}{P_o} 100$$

Bir çözeltinin absorbansı, ışının çözelti içinde aldığı yolla (b) ve çözeltide absorpsiyon yapan taneciklerin derişimiyle (c) doğru orantılıdır. Bu ilişki Lambert-Beer kanunu olarak adlandırılır:[25, 27]

$$A = \varepsilon bc$$

şeklinde verilir ve burada ε *molar absorbans* ya da *molar absorptivite* olarak adlandırılır.

Lambert Beer Kanunu aşağıdaki denklem ile de ifade edilebilir.[25, 27]

$$P = P_0 \, 10^{-\varepsilon b c}$$

2.4. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri

Ultraviyole-Görünür Bölge spektrofotometreleri, 110 nm'den 800 nm'ye kadar değişen dalga boyları arasında çalışırlar. Ancak 110 nm ile 200 nm dalga boyu aralığında çalışan cihazlar vakum tertibatlı cihazlardır. Bundan dolayı laboratuvarlarda kullanılan spektrofotometri cihazları 200 ile 800 nm dalga boyu aralığında çalışmaktadır. Spektrofotometrelerde elektromanyetik ışın kaynağı olarak döteryum ve tungsten olmak üzere iki lamba kullanılmaktadır. 160-375 nm aralığında ışın üretmek için döteryum lambası, 350-800 nm arasında ise tungsten lambası kullanılmaktadır.[25, 27]

Ultraviyole-Görünür Bölge spektrofotometreleri yapılarına göre iki kısma ayrılır:[26, 27]

1- Tek ışınlı spektrofotometreler

2- Çift ışınlı spektrofotometreler

2.4.1. Tek Işınlı Spektrofotometreler

Absorbsiyon ve geçirgenlik ölçümlerinde kullanılan basit, ucuz ve bakım kolaylığı olan bir cihazdır. Tek ışınlı spektrofotometreler ışın kaynağı, dalga boyu seçici, filtre ve monokromatör, ışın yoluna konacak eşlenik iki hücre, dedektör, yükseltici ve bir gösterge aletinden meydana gelir. Absorbsiyon ve % geçirgenlik okumak için önce numune bölmesine referans madde ile alet konularak alet ve referans hücreye göre cihaz sıfırlanır. Daha sonra numune hücresi konur ve ölçüm yapılır.[26]

2.4.2. Çift Işınlı Spektrofotometreler

Son dönemde kullanılan spektrofotometrelerin pek çoğu çift ışınlı tasarıma sahiptir. Bu cihazlar tek ışınlı cihazlara göre hem optik hem de elektronik yönden daha karmaşıktırlar. Çift ışınlı spektrofotometreler 190-800 nm aralığında çalışmak üzere tasarlanmışlardır. Cihaz sıra ile devreye giren tungsten ve döteryum lambaları, yansıtmalı granting monokromatörü ve bir fotoçoğaltıcı dedektörü ile donatılmıştır.[26]

2.4.3. Spektroskopinin Kullanım Amaçları

UV-Görünür bölge spektroskopisinin kullanım amaçları;

a) Nicel analiz, b) Nitel analiz, c) Titrasyon, d) Molekül yapısının aydınlatılması, e) Asit baz denge sabitinin bulunması

İnorganik ve organik bileşiklerin kalitatif-kantitatif analizlerinde, asit baz denge sabitleri ile molekül yapılarının aydınlatılmasında kullanılan spektroskopik yöntemler, elektromanyetik ışınların madde ile etkileşimini incelemektedir.

2.4.3.1. Nitel Analiz

Maddenin tespiti ve yapısı bilinen spektrumlarla karşılaştırılarak bulunan maddenin dalga boyuna bağlı olarak absorpsiyon değişimini gösteren spektrum çizilir.

2.4.3.2. Nicel Analiz

En iyi absorpsiyon yapılan dalga boyu bulunarak tayini yapılacak maddenin spektrumu alınır. Dalga boyu sabit tutularak her madde için dalga boyuna bağlı karakteristik bir özellik olan absorptivite katsayısı belirlenmeye çalışılır. Dalga boyu sabit tutularak artan derişimlerde hazırlanan çözeltilerin absorbansları okunarak derişimlere karşı grafiğe geçirilir ve bilinmeyen maddenin absorbansı okunarak derişimleri tespit edilir.[28]

2.4.5. Türev Spektrofotometrisi

Türev spektrofotometrisi, türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir. UV-Görünür bölge çalışmalarından çok daha geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Bunun yanında sinyal/gürültü (S/G) oranı da düşüktür. Türev uygulamaları bu sorunlara belli oranlarda çözüm getirmiş ve karakteristik pikleri az olan ve çözümlenmemiş bantları içeren spektrumların ayırım gücünü artırmıştır.

Türev tekniği orijinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi vererek bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böylece bir bileşik daha kolay ve daha kesin olarak tanımlanabilir. Orijinal spektrumlarda üst üste binen çakışan bantlar varsa, bu spektrumların bantları alınarak bantların belli oranda birbirinden ayrılması sağlanır. Bu yöntemle karışımların analizleri de yapılabilmektedir.[29] Spektrofotometrede bulanık çözeltiler ile çalışırken çökme hızı tanecik büyüklüğü gibi etkenlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılırken türev alınarak bulanıklığın oluşturduğu bu etki ortadan kaldırılabilir.

Yöntemin dezavantajı ise, yüksek türev derecelerinde S/G oranın bozulması, pik şekillerinde bozulma ve dönüm noktası kaymasıdır. Bu nedenle uygulanacak türevin derecesi iyi seçilmelidir.[30]

Türev spektrumlarının değerlendirilmesinde üç yöntem vardır. Bunlar, pikten pike ölçüm, pikten sıfıra ölçüm ve teğet ile ölçümdür.[30]

Türev spektroskopisi yöntemi ilaç analizlerinde, aynı spektral bölgede absorbsiyon yapan ilaç karışımlarının tayininde, bozucu etki yapan matriks bileşenlerinin varlığında etken maddenin tayininde uygulanmaktadır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

- Metanol HPLC grade (Merk, Germany)
- Etil asetat (Lab SCAN)
- pH'sı 5,8'e ayarlanmış fosfat tamponu

3.1.2. Cihazlar

- Santrifüj (Hettich, RPM x100)
- Ultrasonik Banyo (Elma LC30)
- Terazi (Metler Toledo Ad 104-5)
- Karıştırıcı Vorteks (IKA)
- Su Banyosu (GFL)
- Etüv (Memmert)

Spektrofotometre (HeλIOS β)

- Kuvartz Küvet
- Autosampler vial kit (Thermoquest,1.8 ml screw cap)
- Yazıcı (Lexmark)

3.2. Metod

3.2.1. Spektrofotometrik Metodlar

3.2.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

İn vitro çalışmalar için etodolak'ın 150 µg/ml konsantrasyonundaki metanol stok çözelti hazırlandı. Stok çözelti metanol ile seyreltilerek 1-30 µg/ml aralığında yeni standart çözeltiler hazırlandı.

Plazma çalışmaları için etodolak'ın 80 µg/ml konsantrasyonundaki metanol stok çözelti hazırlandı. Stok çözelti metanol ile seyreltilerek 1-30 µg/ml çalışma çözeltileri hazırlandı. 1-30 µg/ml aralığında bu standart çözeltilerden 0.4'er ml boş plazmaya spike edilip ekstraksiyon işlemi uygulanarak istenilen konsantrasyonlar elde edildi.

Stok çözeltiler laboratuvar şartlarında saklandı.

3.2.1.2. Spektrofotometrik Yöntem Şartları

Spektrofotometrik ölçümler termospektronik çift ışınlı UV-Vis spektrofotometrisinde ölçüldü. 1cm kuvartz küvetler kullanıldı. Spektral band genişliği 2 nm ve dalga boyu tarama hızı 600 $nm.min^{-1}$. Spektrumlar 240-350 nm dalga boyu arasında alındı.

Çalışmamızda; 0., 1., 2. türev spektrumları alındı. UV- (sıfırıncı) 277 nm'de, birinci türev 285 nm'de maximum 293 nm'de minimum ve ikinci türev 287 nm'de maximum 299 nm'de minimum ölçümler yapıldı.

Hazırlanan bütün çözeltiler 45 µm çapındaki filtreden süzüldü. Stok çözeltiler laboratuvar şartlarında saklandı.

3.2.3. Ekstraksiyon İşlemi

- Santrifüj tüplerinin herbirine derin dondurucudan çıkarılan 0.4 ml boş plazma spayk edildi.
- Plazma üzerine stok çözeltiden hesaplanan miktarda etodolak ilave edilerek 10 sn vortekslendi.
- Üzerine 1'er ml 1 M pH'sı 5,8'e ayarlanmış fosfat tamponundan eklendi ve 120 sn vortekslendi.
- 5 ml etilasetat eklendi.
- 120 sn vortekslendi.
- Santrifüjlendi (4000rpm, 15dak).
- Sulu tabaka alınarak atıldı.
- Faz alındı 40°C de azot gazı altında buharlaştırıldı.

UV-Vis spektrofotometre Cihazı için;

- Kalıntı 4 ml metanol ile çözüldü.
- 30 sn vortekslendi.
- Kuvartz küvetlere konuldu.

Not: Kör numune için etodolak ilave edilmeden ekstraksiyon yapılan plazma kullanıldı.

3.2.4. Yöntemin Analitik Validasyonu

Etodolak'ın plazmadan miktar tayininde kullanılan analitik yöntem validasyonu literatürde biyoyararlanım ve farmakokinetik çalışmalar için önerilen analitik yöntem validasyonu esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada validasyonun analitik parametreleri olan stabilite, doğruluk, kesinlik, hesaplanmıştır.

3.2.4.1. Stabilite

Deney şartlarında etodolak'ın stabilitesini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonda hazırlanan örnekler oda sıcaklığı 12, 24 ve 72 saat sonra ölçülerek kontrol edilmiştir.

3.2.4.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Etodolak'ın analizi için; altı farklı konsantrasyonuna göre kalibrasyon eğrileri çizilmiştir.

3.2.4.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin doğruluğu, ortalama geri kazanılan (recorvery) veya ortalama % geri kazanılan ve varyasyon katsayısı (bağıl standart sapması) ile tespit edildi. Yöntemin kesinliği, gün-içi ve günler arası değişkenlikler ile belirlendi. Gün-içi ve günler arası kesinlik bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması (BSS) ile verildi.

Gün İçi Kesinlik: Kalibrasyon eğrisi aralığında seçilen üç farklı derişimde hazırlanan etodolak ile, bir günde altı kez analiz edilen standart çözeltiler ölçülerek bulundu.

Günler Arası Kesinlik: Kalibrasyon eğrisi aralığında seçilen üç farklı derişimde hazırlanan etodolak ile, altı günde altı kez analiz edilen standart çözeltiler ölçülerek bulundu.

3.2.5. Ex Vivo Çalışmalar

Etodolak içeren ve Türk ilaç piyasasından temin edilen etol fort (400 mg), tadolak (400 mg) ve tadolak (200 mg) ticari tabletler *ex vivo* ortamda incelenmiştir.

3.2.5.1. Tabletlerin Hazırlanması

Beş tablet ezildi ve ağırlıkları belirlendi. Ezilen tabletlerden eşit miktarda etodolak, 100 ml'lik balon jojeye alındı. 100 ml metanol eklendi. Bu çözelti süzülerek, istenilen konsantrasyonları metanol ile seyreltilerek elde edildi.

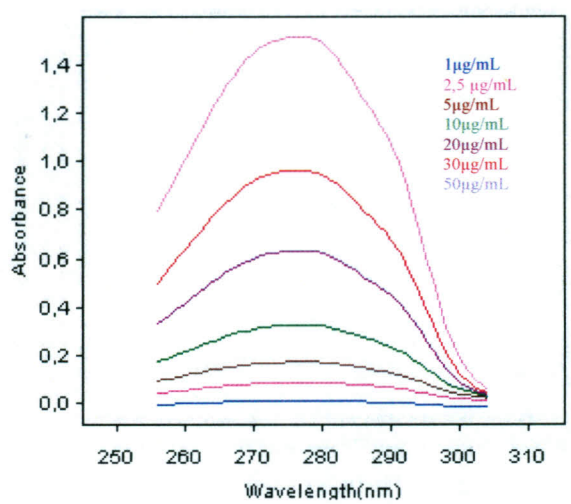
4. BULGULAR

4.1. UV-Visible Spektrofotometri Yöntemi

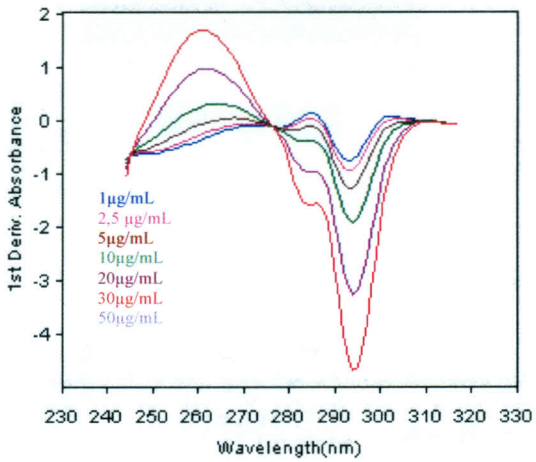
4.1.1. İn Vitro Koşullardaki Çalışmalar ve Validasyonu

4.1.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

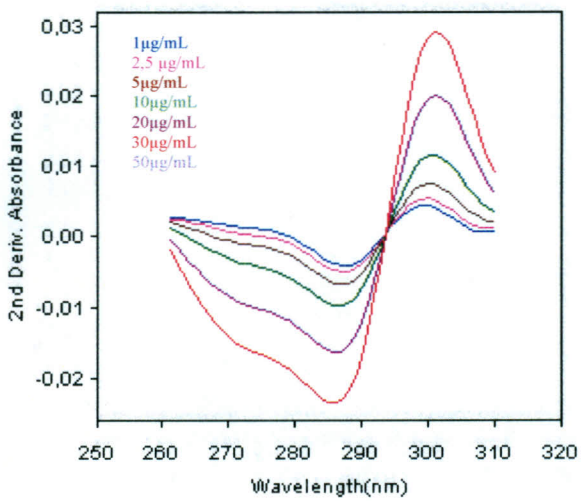
Etodolak'ın 1-50 µg/ml standart çözeltileri HPLC-grade metanolde hazırlandı. 0., 1., 2. türev spektrumları alındı. UV (sıfırıncı) 277 nm de, birinci türev 285 nm'de maximum 293 nm'de minimum ve ikinci türev 287 nm'de maximum 299 nm'de etodolak absorbansları okunarak kaydedildi.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.1: Etodolak'nin standart çözeltisinin (10 µg/ml) sırasıyla (a) Orijinal UV, (b) Birinci ve (c) İkinci türev spektrumu

4.1.1.2. Yöntem Validasyonu

4.1.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri

Etodolak'ın analizi için, etodolak'ın derişimine karşı pik yüksekliği (absorbans) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizildi. Etodolak'ın 6 farklı konsantrasyonu'a

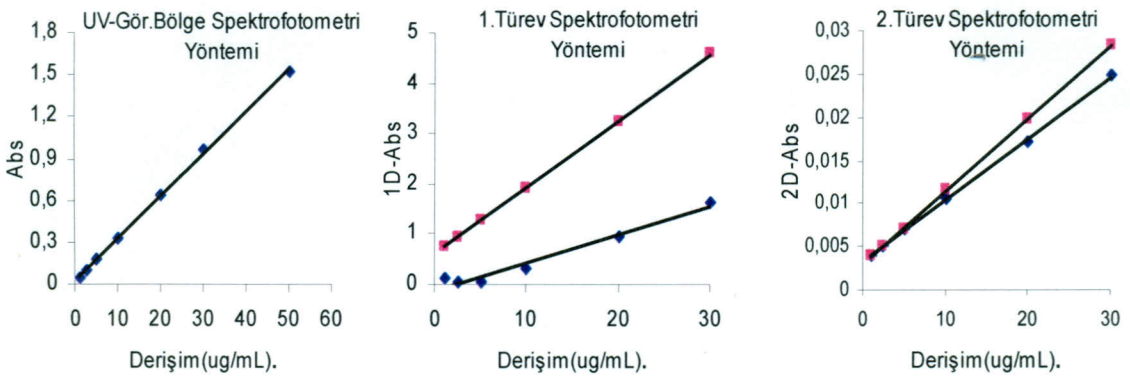
(1-30µg/ml) göre kalibrasyon eğrisi elde edildi. Etodolak'ın regrasyon eşitliklerinin istatiksel analiz sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Etodolak'ın istatiksel analiz sonuçları

Yöntem	Dalga Boyu (nm)	ÇA (µg/mL)	LR[a]	Sa	Sb	R
UV Görünür Bölge Spektrofotometri	277 nm	1-50	A_{277nm}=0,0303x+0,0201	0,00005	0,0004	0,9995
1.Türev Spektrofotometri	285 nm	1-50	$1D_{285nm}$=0,0552x-0,1204	0,0029	0,0011	0,9636
	293 nm	1-50	$1D_{293nm}$=0,1312x+0,6195	0,0054	0,0307	0,9998
2.Türev Spektrofotometri	287 nm	1-50	$2D_{287nm}$=0,0007+0,0033	$8{,}94.10^{-05}$	0,0001	0,9992
	300 nm	1-50	$2D_{299nm}$=0,0008+0,0030	$5{,}16.10^{-05}$	0,0001	0,9997

ÇA: çalışma aralığı, LR: lineer regrasyon, Sb: regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sa: regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

Etodolak'ın 1-30µg/ml derişim aralığında hazırlanan standart çözeltilerinin UV görünür bölge, 1. türev, 2. türev spektrofotometrilerinin derişim grafiği Şekil 4-2'de belirtilmiştir.



Şekil 4.2: Etodolak'ın standart çözeltisinin sırasıyla (a) Orijinal UV, (b) Birinci ve (c) İkinci türev spektrumlarının derişim grafikleri

4.1.1.2.2. Doğrusallık. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği gün-içi ve günler arası değişkenlikler ile belirlendi. Gün-içi ve günler arası kesinlik bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi. Orijinal UV. birinci ve ikinci türev

spektrumları için sırasıyla gün-içi kesinlik ve günler arası kesinlik sonuçları Tablo 4.2'de gösterilmektedir.

Tablo 4.2: Etodolak'ın sıfırıncı türev, birinci türev, ikinci türev için gün-içi, günler arası kesinlik sonuçları

λ(nm)	Eklenen (µg/mL)	Güniçi			Günler Arası		
		Bulunan±SD (µg/mL)	Doğruluk	% RSD	Bulunan±SD (µg/mL)	Doğruluk	% RSD
A_{277nm}	2,50	2,741±0,013	9,658	0,491	2,790±0,101	11,63	3,638
	7,50	7,383±0,013	1,547	0,182	7,411±0,103	1,180	1,398
	25,0	25,06±0,017	0,272	0,067	25,06±0,061	0,272	0,245
$1D_{285nm}$	2,50	2,516±0,024	0,652	0,992	2,513±0,024	0,531	0,948
	7,50	8,002±0,018	6,698	0,233	7,966±0,126	6,215	1,592
	25,0	28,93±0,052	15,71	0,180	28,58±0,272	14,35	0,952
$1D_{293nm}$	2,50	2,638±0,017	5,538	0,675	2,815±0,262	12,60	9,336
	7,50	6,768±0,007	9,756	0,118	7,122±0,346	5,030	4,862
	25,0	24,39±0,029	2,413	0,122	24,56±0,311	1,727	1,266
$2D_{287nm}$	2,50	2,419±0,014	3,238	0,609	2,476±0,073	0,952	2,979
	7,50	7,190±0,737	4,126	10,26	7,428±0,782	0,952	10,53
	25,0	23,38±1,475	6,476	6,310	22,90±0,737	8,380	3,220
$2D_{299nm}$	2,50	2,525±0,049	1,000	1,955	2,597±0,046	3,916	1,785
	7,50	7,504±0,006	0,055	0,086	7,920±0,642	5,611	8,108
	25,0	26,22±0,094	4,916	0,358	26,66±0,645	6,666	2,420

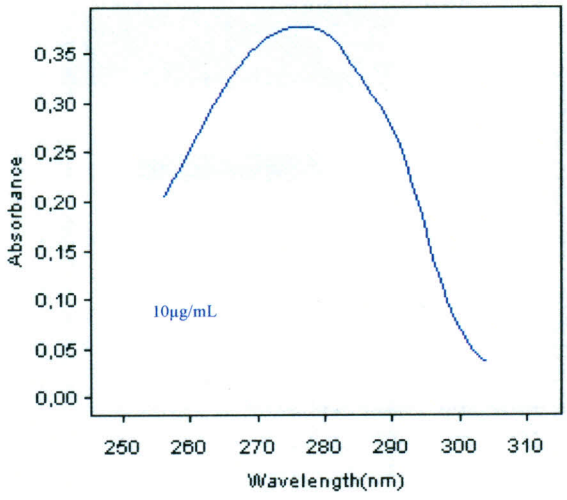
λ: Dalga boyu, SD: Standart sapma, % RSD: Bağıl standart sapma (SD/ortalamax100)

4.1.1.3. Yöntemin Farmasötük Preparatlara Uygulanması

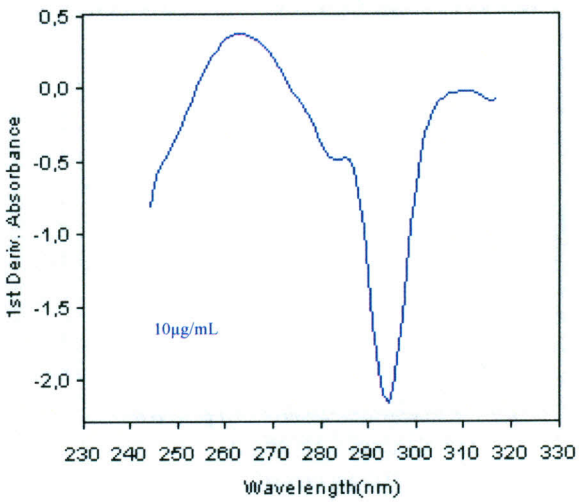
Yöntem etodolak içeren farmasötik preparatlara uygulandı.

4.1.1.3.1. Etol fort

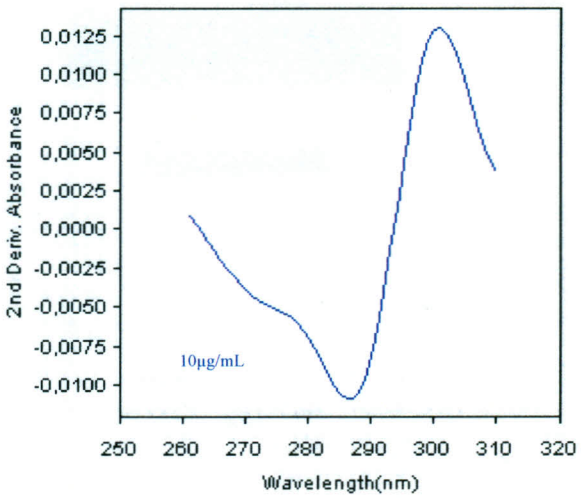
1 etol fort tablet 400 mg etodolak içerir. 5 µg/ml ve 10 µg/ml metanolde çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çözeltilerin 0.,1.,2. türev spektrumları alındı ve standart etodolak kalibrasyon eğrisine göre değerlendirildi (Şekil 4.2).


0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Absorbance
10µg/mL
250 260 270 280 290 300 310
Wavelength(nm)

(a)


0,5
0,0
-0,5
-1,0
-1,5
-2,0
1st Deriv. Absorbance
10µg/mL
230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330
Wavelength(nm)

(b)



(c)

Şekil 4.3: Etol fort çözeltisinin (10 µg/ml)sırasıyla (a) Orijinal UV, (b) Birinci ve (c) İkinci türev spektrumu

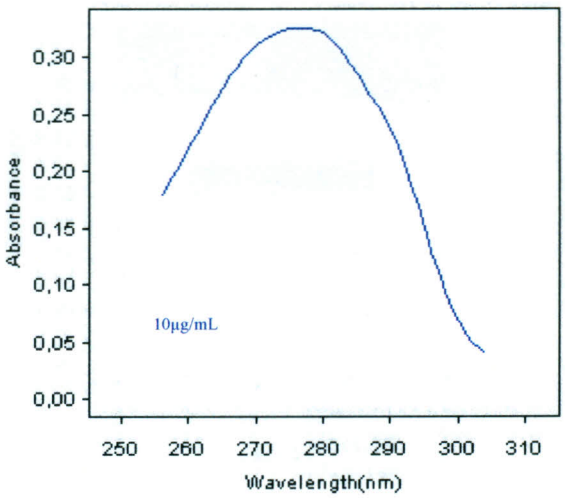
Tablo 4.3: Etol fort Tablet miktar analizi

Ticari Preparat	Yöntem	λ(nm)	n	Bulunan±SD (mg)	%Geri kazanım	%RSD	Güven Aralığı
Etol Fort Tablet	UV Görünür Bölge Spektrofotometri	277	12	216,6±18,20	108,3	8,406	98,97-118,1
	1.Türev Spektrofotometri	285	12	177,5±2,913	88,76	1,640	87,21-90,65
		293	12	233,4±2,454	116,7	1,051	115,2-118,4
	2 Türev Spektrofotometri	287	12	208,09±14,71	104,04	7,069	95,71-110
		299	12	239±12,87	119,7	5,373	112,5-125

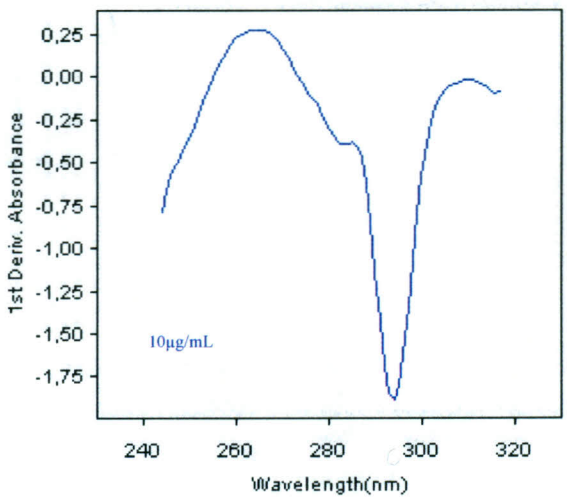
λ: Dalga boyu, SD: Standart sapma, % RSD: Bağıl standart sapma (SD/ortalamax100)

4.1.1.3.2. Tadolak fort

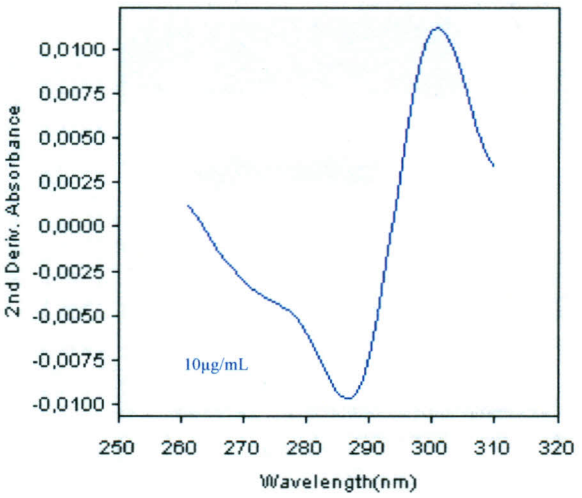
1 tadolak tablet 400 mg etodolak içerir. 5 µg/ml ve 10 µg/ml metanolde çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çözeltilerin 0., 1., 2. türev spektrumları alındı ve standart etodolak kalibrasyon eğrisine göre değerlendirildi (Şekil 4-3).


0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Absorbance
10µg/mL
250
260
270
280
290
300
310
Wavelength(nm)

(a)


0,25
0,00
-0,25
-0,50
-0,75
-1,00
-1,25
-1,50
-1,75
1st Deriv. Absorbance
10µg/mL
240
260
280
300
320
Wavelength(nm)

(b)



(c)

Şekil 4.4: Tadolak fort çözeltisinin (10 µg/ml) sırasıyla (a) Orijinal UV, (b) Birinci ve (c) İkinci türev Spektrumu

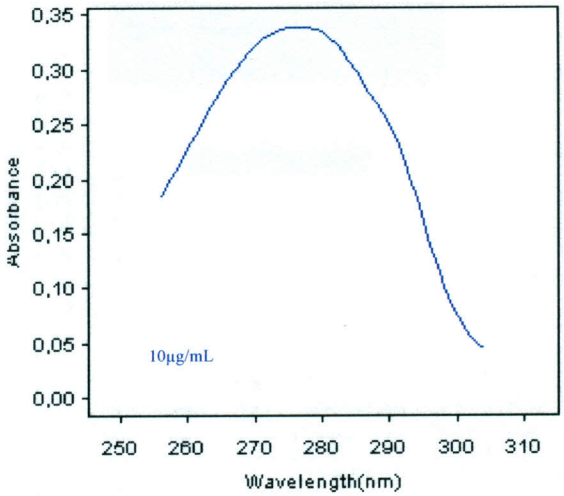
Tablo 4.4: Tadolak fort (400mg) tablet miktar analizi

Ticari Preparat	Yöntem	λ(nm)	n	Bulunan±SD (mg)	%Geri kazanım	%RSD	Güven Aralığı
Etol Fort Tablet	UV Görünür Bölge Spektrofotometri	277	12	205,9±4,028	102,9	1,955	100,9-104,9
	1.Türev Spektrofotometri	285	12	188,5±4,697	94,26	2,491	91,55-97,17
		293	12	213,07±15,83	106,5	7,430	98,66-114,3
	2 Türev Spektrofotometri	287	12	193,5±8,363	96,78	4,320	94,28-95,71
		299	12	200,4±0,973	100,2	0,485	100-101,2

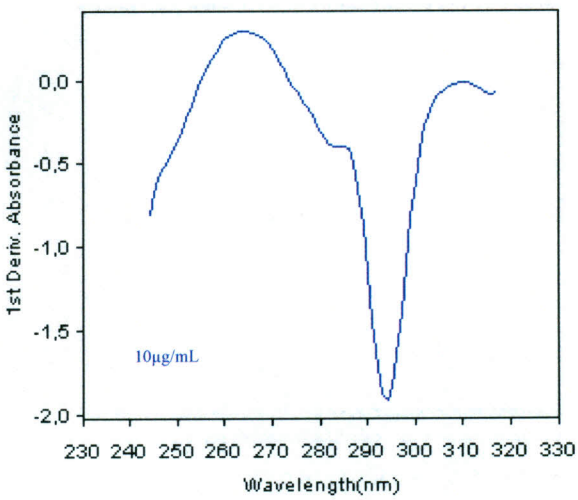
λ: Dalga boyu, SD: Standart sapma, % RSD: Bağıl standart sapma (SD/ortalamax100)

4.1.1.3.3. Tadolak

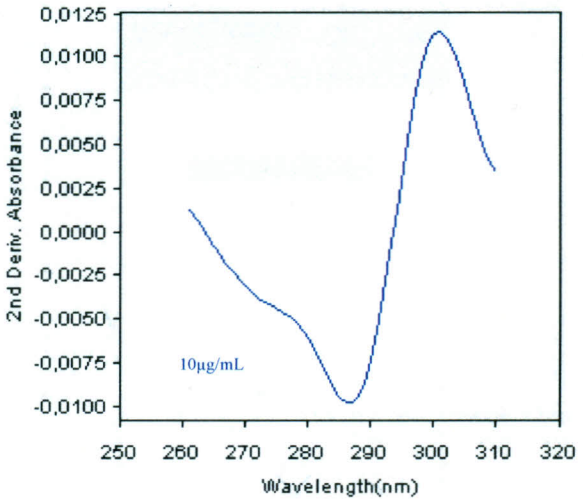
1 tadolak tablet 200 mg etodolak içerir. 5 µg/ml ve 10 µg/ml metanolde çözeltileri hazırlandı.Elde edilen çözeltilerin 0., 1., 2. türev spektrumları alındı ve standart etodolak kalibrasyon eğrisine göre değerlendirildi (Şekil 4.4).


0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Absorbance
10µg/mL
250 260 270 280 290 300 310
Wavelength(nm)

(a)


0,0
-0,5
-1,0
-1,5
-2,0
1st Deriv. Absorbance
10µg/mL
230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330
Wavelength(nm)

(b)



(c)

Şekil 4.5. Tadolak çözeltisinin (10 µg/ml) sırasıyla (a) Orijinal UV, (b) Birinci ve (c) İkinci türev Spektrumu

Tablo 4.5: Tadolak (200mg) Tablet miktar analizi

Ticari Preparat	Yöntem	λ(nm)	n	Bulunan±SD (mg)	%Geri kazanım	%RSD	Güven Aralığı
Etol Fort Tablet	UV Görünür Bölge Spektrofotometri	277	12	219,2±7,166	109,6	3,267	100,9-112,8
	1.Türev Spektrofotometri	285	12	251,1±2,103	125,5	0,837	123,0-126,8
		293	12	211,7±3,488	105,8	1,647	104,0-107,6
	2 Türev Spektrofotometri	287	12	215,2±11,12	107,6	5,167	95,7-110

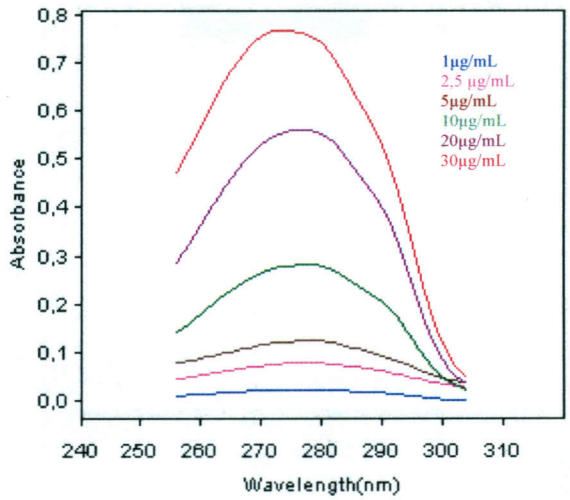
λ: Dalga boyu, SD: Standart sapma, % RSD: Bağıl standart sapma (SD/ortalamax100)

4.1.2. Plazmadan Geri Kazanım Çalışmaları

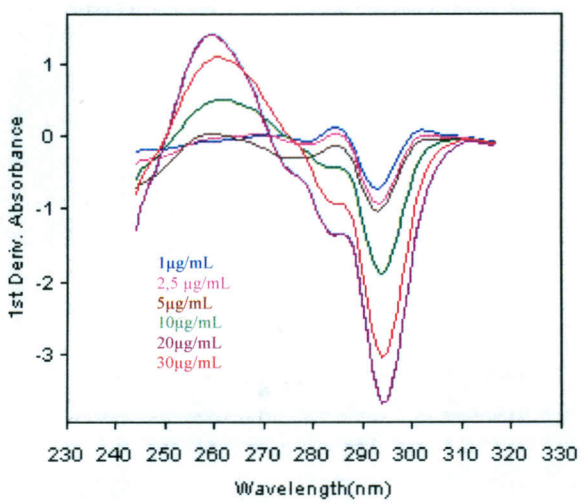
4.1.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

1-30µg/ml çalışma çözeltileri hazırlandı. Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Alma Merkezinden plazma sağlanarak ekstraksiyon işlemi uygulandı ve mutlak geri kazanım hesaplandı. Plazmaya spike çalışmasında maddenin konsantrasyonu Ek-1 deki gibi ve mutlak geri kazanım Ek-2 deki gibi hesaplandı. Etodolak'ın plazmadan ekstraksiyon ile elde edilen çalışma çözeltilerin 0., 1., 2. türev spektrumları alındı. UV (Sıfırıncı) spektrumu 277 nm'de, birinci türev spektrumu 285 nm'de maximum 293

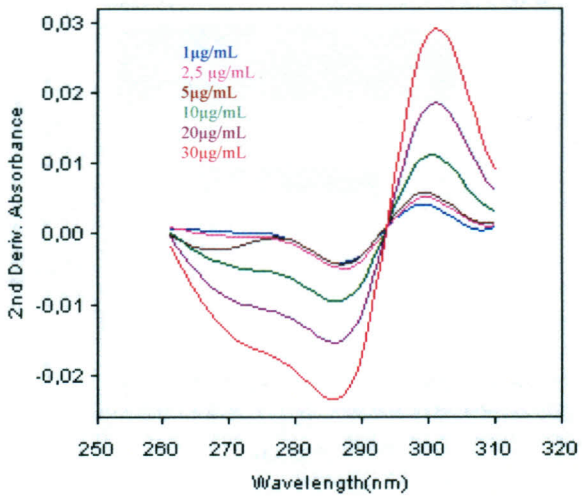
nm'de minimum ve ikinci türev spektrumu 287 nm'de maximum 299 nm'de minimum etodolak'ın absorbansları okunarak kaydedildi (Şekil 4.5).



(a)



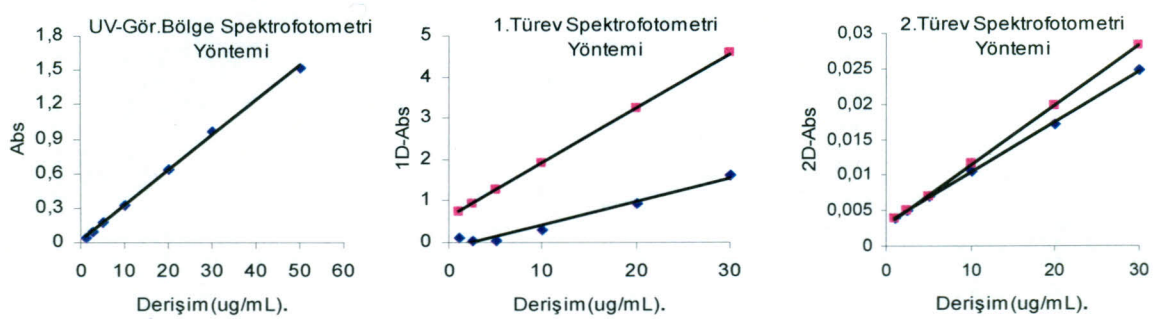
(b)



(c)

Şekil 4.6: Etodolak'ın plazmadan geri kazanımla elde edilen çözeltilerinin (10 µg/ml) sırasıyla (a) Orijinal UV, (b) Birinci ve (c)İkinci türev Spektrumu

Etodolak'ın 1-30 µg/ml derişim aralığında plazmadan ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanan çözeltilerinin UV görünür bölge, 1. türev, 2. türev spektrofotometrelerinin derişim grafiği Şekil 4-6'da belirtilmiştir.



Şekil 4.7: Etodolak'ın standart çözeltisinin sırasıyla (a) Orijinal UV, (b) Birinci ve (c) İkinci türev spektrumlarının derişim grafikleri

4.1.2.2. Yöntem Validasyonu

4.1.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri

Etodolak'ın plazmadan ekstrasyon yöntemiyle günler içi ve günler arası plazma yüzde geri kazanım değerleri tablo 4.6'da gösterilmektedir.

Tablo 4.6: UV-Görünür Bölge, 1 türev ve 2. türev Spektrofotometri yönteminin gün içi ve günler arası plazma yüzde geri kazanım değerleri

λ(nm)	Eklenen (μg/mL)	Gün içi		Günler Arası	
		%Geri kazanım	% RSD	%Geri kazanım	% RSD
A_{277nm}	2,50	75,28	1,261	71,19	2,893
	7,50	68,21	3,054	68,82	5,395
	25,0	88,82	0,057	98,03	5,217
$1D_{293nm}$	2,50	96,27	0,231	111,5	3,114
	7,50	91,61	0,140	95,77	3,141
	25,0	92,20	0,178	97,24	3,273
$2D_{287nm}$	2,50	100,1	1,887	99,01	3,016
	7,50	84,26	6,089	83,56	8,518
	25,0	81,53	5,777	87,10	4,708
$2D_{299nm}$	2,50	99,60	2,747	111,6	9,445
	7,50	88,85	1,769	89,41	7,067
	25,0	88,95	4,821	91,50	2,94

λ: dalga boyu, % RSD: bağıl standart sapma (Standart sapma/ortalamax100)(n=6)

Etodolak'ın analizi için, etodolak'ın plazmadan ekstraksiyonuyla elde edilen etodolak'ın derişimine (2,5-25 μg/ml) karşı pik yüksekliği (absorbans) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizildi. Tadolak fort tablet için Tablo 4-7'de, Etol fort içinse tablo 4-8'de geri kazanım değerleri belirtilmiştir.

Tablo 4.7: Tadolak fort tabletin UV-Görünür Bölge, 1 türev ve 2. türev Spektrofotometri yönteminin yüzde geri kazanım değerleri

λ(nm)	Eklenen (μg/mL)	Bulunan±SD (μg/mL)	Geri Kazanım	% RSD
A_{277nm}	2,50	$8,346\pm1,76.10^{-06}$	111,28	$2,11.10^{-05}$
	7,50	$12,66\pm5,31.10^{-06}$	101,35	$4,19.10^{-05}$
	25,0	$30,22\pm2.10^{-03}$	100,75	0,069
$1D_{285nm}$	2,50	5,620±0,043	74,93	0,774
	7,50	10,81±0,089	86,48	0,825
	25,0	29,51±0,064	98,37	0,218
$1D_{293nm}$	2,50	7,789±0,031	103,8	0,399
	7,50	12,02±0,013	96,16	0,111
	25,0	28,32±0,021	94,42	0,074
$2D_{287nm}$	2,50	$8,142\pm5,8.10^{-07}$	108,5	$9,31.10^{-06}$
	7,50	12,66±2,102	101,3	16,60
	25,0	28,85±0,782	96,19	2,711
$2D_{299nm}$	2,50	8,708±0,064	116,1	0,741
	7,50	12,52±0,094	100,1	0,751
	25,0	30,04±0,102	100,1	0,339

Tablo 4.8: Etol fort tabletin UV-Görünür Bölge, 1 türev ve 2. türev Spektrofotometrisi için yönteminin yüzde geri kazanım değerleri

λ(nm)	Eklenen (μg/mL)	Bulunan±SD (μg/mL)	Geri Kazanım	% RSD
A_{277nm}	2,50	8,825± 0,027	117,6	0,312
	7,50	17,46±0,013	139,6	0,077
	25,0	30,16±0,020	100,5	0,069
$1D_{285nm}$	2,50	6,266±0,022	83,55	0,354
	7,50	15,93±0,026	127,47	0,167
	25,0	31,04±0,024	103,58	0,079
$1D_{293nm}$	2,50	8,620±0,021	114,93	0,254
	7,50	16,76±0,014	134,12	0,088
	25,0	29,61±0,020	98,72	0,068
$2D_{287nm}$	2,50	8,166±108,8	108,57	1,316
	7,50	16,71±0,017	133,7	0,764
	25,0	28,14±0,038	93,80	5,943
$2D_{299nm}$	2,50	8,75±0,023	116,6	0,046
	7,50	17,5±0,032	140	0,233
	25,0	31,25±0,049	104,16	0,026

Tablo 4.9: Plazmadan ekstrasyonla elde edilen etodolak'ın istatistiksel analiz sonuçları

Yöntem	Dalga Boyu	ÇA (µg/mL)	LR[a]	Sa	Sb	R
UV Görünür Bölge Spektrofotometri	277 nm	1-30	A_{277nm}=0,259x+0,0141	0,00004	0,0004	0,9983
1.Türev Spektrofotometri	285 nm	1-30	$1D_{285nm}$=0,0504x-0,0491	0,000105	0,0008	0,9804
	293 nm	1-30	$1D_{293nm}$=0,1052x+0,7201	0,001502	0,0021	0,9938
2.Türev Spektrofotometri	287 nm	1-30	$2D_{287nm}$=0,0007x+0,003	$5,4.10^{-05}$	0,0003	0,9986
	300 nm	1-30	$2D_{299nm}$=0,0007x+0,0029	$4,8.10^{-05}$	0,0002	0,9987

4.1.2.2.2. Doğrusallık Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği gün-içi ve günler arası değişkenlikler ile belirlendi. Gün-içi ve günler arası kesinlik bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi. Orijinal UV birinci ve ikinci türev spektrumları için sırasıyla gün-içi ve günler arası kesinlik sonuçları Tablo 4.10'da gösterilmektedir.

Tablo 4.10: Plazmadan ekstrasyonla elde edilen etodolak'ın UV-Görünür Bölge, 1. türev ve 2. türev spektrofotometri yönteminin gün içi ve günler arası plazma doğruluk ve kesinlik değerleri

λ(nm)	Eklenen (µg/mL)	Gün içi			Günler Arası		
		Bulunan±SD (µg/mL)	Doğruluk	% RSD	Bulunan±SD (µg/mL)	Doğruluk	% RSD
A_{277nm}	2,50	2,454±0,032	-1,828	1,284	2,332±0,100	-6,718	4,285
	7,50	5,878±0,199	-21,63	3,392	5,955±0,303	-20,60	5,083
	25,0	26,19±0,021	4,772	0,081	28,96±1,565	15,86	5,404
$1D_{293nm}$	2,50	1,992±0,022	-20,31	1,116	2,778±0,613	11,11	22,06
	7,50	6,282±0,017	-16,23	0,271	7,307±0,718	-2,569	9,831
	25,0	26,63±0,085	6,549	0,320	28,68±1,431	14,73	4,98
$2D_{287nm}$	2,50	2,857±0,128	14,28	4,470	2,83±0,210	13,33	7,422
	7,50	5,714±0,128	-23,81	2,236	5,952±0,738	-20,63	12,39
	25,0	18,57±0,639	-25,71	3,440	19,76±1,075	-20,95	5,442
$2D_{299nm}$	2,50	3,000±0,202	20,00	6,734	2,881±0,292	15,23	10,12
	7,50	7,286±0,202	-2,857	2,773	7,762±0,738	3,492	9,504
	25,0	26,33±1,475	5,333	5,603	27,762±1,47	11,04	5,315

4.1.3. Etodolak'ın Plazma Çözeltilerinin Stabilitesi

Etodolak çözeltileri boş plazmaya (0,4 ml) hesaplanan miktarlarda ilave edilerek 1,5; 12 ve 28 μg/ml hazırlanan derişimlerine katılarak çalışma çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında +4 C'de ve -20 C'de (buzlukta) 12 saat, 24 saat, 72 saat bekletilerek UV Görünür Bölge, 1. ve 2.türev absorbans değerleri ölçüldü. Hemen hazırlanan çözeltilerin absorbanslarıyla karşılaştırılarak sonuçlar yüzde geri kazanım ile değerlendirildi.

Tablo 4.11: Etodolak'ın standart çözeltilerinin stabilites

(%) Stabilite		Oda Sıcaklığı, (%GK±SD)			+4°C, (%GK±SD)			-20°C, (%GK±SD)		
Dalga Boyu (nm)	Added (µg/ml)	12 saat	24 saat	72 saat	12 saat	24 saat	72 saat	12 saat	24 saat	72 saat
A_{277nm}	1,50	90,21±0,166	151,1±1,694	104,3±1,638	153,3±2,609	169,6±2,887	158,7±0,999	176,6±4,00	166,3±2,83	164,7±3,324
	12,0	104,08± $1,56.10^{-14}$	62,68±0,073	214,5±0,351	120,01±0,334	117,2±0,138	115,6± $1,56.10^{-14}$	123,9±0,175	118,3±0,138	123,6±0,175
	28,0	113,6±0,165	98,08±0,093	98,27±0,010	109,5±0,210	87,68±37,89	115,9±0,181	111,7±0,141	111,1±0,116	114,6±0,075
1D 285nm	1,50	744,8±856,1	-342,1±39,96	-47,27±13,05	-310,1±36,62	87,78±12,10	-32,54±9,782	-483,2±53,61	-16,46±31,99	-17,59±7,121
	12,0	92,86±0,318	46,91±0,273	49,66±1,184	109,9±0,269	88,20±28,49	104,9±0,324	115,4±0,241	109,9±0,578	117,4±0,352
	28,0	88,98±38,46	95,58±0,156	93,20±0,122	105,3±0,237	100,1±0,321	96,34±0,254	104,9±0,218	106,6±0,274	94,51±0,438
$1D_{293nm}$	1,50	-105,7±0,184	1,644±0,163	-110,8±0,207	-87,10±49,15	0,040±0,124	-108,00±0,213	-108,2±0,203	-100,6±0,407	-106,7±0,215
	12,0	106,4±0,173	108,45±0,124	99,40±0,045	-108,5±0,039	-102,5±0,119	-105,7±0,123	-110,2±0,146	-102,8±0,119	-110,9±0,111
	28,0	-107,3±0,138	-96,13±0,116	97,38±0,036	-105,05±0,024	-99,45±0,052	-108,9±0,093	-105,1±0,061	-105,7±0,080	-99,18±0,088
$2D_{287nm}$	1,50	133,3± $3,11.10^{-14}$	-133,3± $3,11.10^{-14}$	-133,3± $3,11.10^{-14}$	-100±0,013	97,43±3,023	-133,3± $3,11.10^{-14}$	-100±0,056	-133,3± $3,11.10^{-14}$	-133,3± $3,11.10^{-14}$
	12,0	-96,29±5,737	-84,25±5,021	-120,3±7,172	-108,3±6,454	-96,29±5,737	-108,3±6,454	-108,3±6,454	-96,29±5,737	-108,3±6,455
	28,0	-105,8±0,175	-94,11±0,143	-67,64±82,16	-105,8±0,472	-100±0,379	-111,7±0,378	-105,8±0,378	-105,8±0,415	-111,7±0,489
$2D_{299nm}$	1,50	16,31±0,278	16,31±0,278	16,31±0,278	16,31±0,278	16,31±0,278	16,31±0,278	16,31±0,278	16,31±0,278	16,31±0,278
	12,0	3,74± $4,86.10^{-16}$	2,61±0,175	4,081±0,227	4,081±0,015	3,741± $4,86.10^{-16}$	4,081± 0,017	4,081± 0,189	4,081± 0,219	4,081± 0,173
	28,0	3,154±0,003	2,901±0,003	3,013±0,001	3,027±0,003	2,901±0,003	3,154±0,003	3,134±0,054	3,154±0,003	2,902±0,003

5. TARTIŞMA VE YORUM

Ex vivo ortamlarda etodolak'ın analizi için spektrofotometre yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır.

UV-Görünür bir bölgedeki bir spektrum, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Yani $A= f(\lambda)$ fonksiyonudur. Bu fonksiyonun her bir noktasındaki türevi hesaplanabilir. Eğer bu türev değerleri dalgaboyuna karşı grafiğe geçirilecek olursa "türev spektrumu" meydana gelir ve 1'den n'e kadar derecede olabilir.

Türev spektrofotometre ise türev spektrumların kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir. Bir orijinal spektrum her bir noktasındaki türevinin hesapla bulunması ve sonra bunların grafiğe geçirilerek yeni türev eğrilerinin hazırlanması oldukça güç bir işlemdir. Bu nedenle hesapların yapılması için bilgisayardan yararlanılır.

Türev çalışması orijinal spektrumun eğrileri hakkında bilgi verir, bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böyle bir bileşik daha kolay tanınabilir.

Spektrofotometrik çalışmamızda etodolak'ın orijinal spektrofotometrisinin belirlenmesi ile ilgili metot geliştirilmiş, 1. ve 2. türev spektrofotometrisi yönteminin daha kesin olarak belirlenmesi sağlanmıştır. Yöntemler valide edilmiştir.

Spektrofotometrik çalışmada optimum koşullar belirlendikten sonra orijinal UV spektrofotometri 289 nm, birinci türev spektrofotemetri 285 nm'de maximum 293 nm'de minimum, ikinci türev spektrofotemetri 287 nm'de maximum 299 nm'de minimum dalga boylarında absorbans verdiği belirlendi Kalibrasyon grafikleri bilinen

konsantrasyonlara (2,5-25 μg/ml) karşı orijinal UV absorbansları, birinci türev absorbansları ve ikinci türev absorbansları okunarak elde edildi.

Eğriler için kolerasyon katsayısı; orijinal UV spektrofotometri r=0.999, birinci türev spektrofotemetri 285 nm için r=0.963 ;293 nm için r=0,999 ve ikinci türev spektrofotemetri 287 nm'de r=0,999; 299 nm'de ise r=0,999 olarak bulundu.

Spektrofotometrik çalışmamızda; ayrıca etodolak'ın insan plazmasına miktar tayini için ekstraksiyon gerçekleştirilerek kalibrasyon grafikleri bilinen konsantrasyonlara (2-25 μg/ml) karşı orijinal UV absorbansları, birinci türev absorbansları ve ikinci türev absorbansları okunarak elde edildi Eğriler için kolerasyon katsayısı orijinal UV spektrofotometri r=0.997, birinci türev spektrofotemetri r=0.983 ve ikinci türev spektrofotemetri r=0.979 olarak bulundu.

Sonuç olarak bu çalışmada non-steroid antiinflamatuar ilaçlardan UV-görünür bölge spektrofotometrisi, birinci türev spektrofotometrisi, ikinci türev spektrofotometrisi yöntemleri geliştirilip geçerlilik testleri yapılması amaçlanmış ve bu yolda çalışmalar yürütülmüştür.

6. KAYNAKLAR

1. Akgün H, Balkan A, Bilgin AA, Çalış Ü, Dalkara S, Erdoğan H, Erol DD, Ertan M, Özkanlı F, Palaska E, Saraç S, Şafak C. Farmasötik Kimya, 1.cilt, Ankara, Irmak matbaası 2000;607.

2. Rao NR, Meena S, Rao AR. An overview of the recent developments in analytical methodologies for determiniation of COX-2 inhibitors in bulk drugs, pharmaceuticals and biological matrices. J Pharm Biomed Anal 2005; 39:349 – 363.

3. Mutschler E. Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. (5th ed.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1986;665.

4. Yılmaz S, Uslu B, Özkan S. Anodic oxidation of etodolac and its square wave and differential pulse voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum. Talanta 2001; 54:351-360.

5. Garcia JB, Lucia M, Saraiva MFS, Lima LFC. Determination and antioxidant activity evaluation of etodolac, an antiinflammatory drug, by seguential injection analysis. Anal Chim Acta 2006;573-74:371-375.

6. Ak DD, Kutluk ÖB, Tonçel M, Aboul-Einein HY. Capıllary electrophoretıc method for the determination of etodolac in pharmaceutical tablet formulation. J Liq Chromatogr Relat Technol 2001;24:773-780.

7. Davis JL, Papich MG, Morton AJ, Gayle J, Blıkslager AT, Campbell NB. Pharmacokinetics of etodolac in the horse following oral and intravenous. J Vet Pharmacol Therap 2007;30:43-48.

8. El Kousy NM. Spectrophotometric and spectrofluometric determiniation of etodolac and aceclofenac. J Pharm Biomed Anal 1999;20:185-194.

9. Strickmann DB, Chankvetadze B, Blaschke G, Desiderio C, Fanali S, Seperation and identification of etodolac and its urinary phase I metabolites using capillary electrochromatography and on-line capillary electrochromatography- electrospray ionisation mass spectrometry coupling. J Chromatogr A 2000;887:393-407.

10. Strickmann DB, BlaschkeG, Capillary electrochromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the gualitivite investigation of the drug etodolac and its metabolites in biological samples. J Chromatogr B 2000;748: 213-219.

11. Pablos RR, Ruiz GC, Crego AL, Marina LM. Seperation of etodolac enantiomers by capillary electrophoresis. Validation and application of the chiral method to the analysis of commercial formulations. Electrophoresis 2005;26:1106–1113.

12. Fanali S, Desiderio C, Schulte G, Heitmeier S, Strickmann D, Chankvetadze B, Blaschke G. Chiral capillary electrophoresis – electrospray mass spectrometry coupling using vancomycin as chiral selector. J Chromatogr A 1998;800:69 – 76.

13. Shi J, Lai S, Xu CJ, Duan G, Li D. Pharmacokinetic difference between S-(+) and R-(-)-etodolac in rats. Acta Pharmacol Sin 2004;25:996 – 999.

14. Gouda AA, Hassan WS. Spectrophotometric determination of etodolac in pure form and pharmaceutical formulations. Chem Cent J 2008;2:1-7.

15. Lee HS, Kang IL-M, Lee HW, Seo Ji-H, Ryu Ju-H, Choi SJ, Lee MJ, Jeong SY, Cho YW, Lee KT. Development and validation of a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry fort he determinetion of etodolac in human plasma. J Chromatogr B 1998;800:69 – 76.

16. Boni JP, Korth-Bradley JM, Martin P, Simcoe DK, Richard LS, Rennebohm R, Walson PD. Pharmacokinetics of etodolac in patients with stable juvenile rheumatoid arthritis. Clinical Therapeutics 1999;21:10.

17. Corlett SA, Chyrstyn H. High-performance liquid chromatographic determination of the enantiomers of cyclophosphamide in serum. J Chromatogr B 1996;682:337-342.

18. Mao Y, Huang M, Xia Y, Jemal M. High-throughput quantitation of nefazode and its metabolies in human plasma by high flow direct-injection LC-MS/MS. J Pharm Biomed Anal 2007;43:1808-1819.

19. Walker RB, Kanfer I. Sensitive High-performance liguid chromatographic determination of cyclizine and its demethylated metabolite, norcyclizine, in biological fluids using coulometric detection. J Chromatogr B 1995;672:172-177.

20. Giuliano F, Ferraz J, Pereira R, Nucci G, Warner TD. Cyclooxygenase selectivity of non-steroid anti-inflammatory drugs in humans:ex vivo evaluation. European J Pharmacol 2001;426:95-103.

21. Costa P, Cabral L, Alencar K, Schmidt L, Vasconcellos M. Tetrahedron lett 1997;38:7021-7024.

22. Duymuş H, Arslan M, Küçükislamoğlu, Zengin M. Charge transfer complex studies between some non-steroidal anti-inflammatory drugs and π-electron acceptors. Spektrochimica Acta Part A 2006;65:1120-1124.

23. Lin J, Hsiao P, Chiu T, Chao J. Combination of cyclooxygenase-2 inhibitors and oxaliplatin increases the growth inhibition and death in human colon cancer cells. Bio Pharm 2005;70:658-667.

24. Suppan P.,İnvited review.Solvatochromic shifts : the influence of the medium on the energy of electronic states. J Photocherm Photobiol A Chem 1995;50:293-330.

25. Wiberg K. Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions. Department of Analytical Chemistry, Arrhenius Laboratory, Stokholm University 2004 www.anchem.su.se/downloads/diss pdf 2004,6,8.

26. Gündüz T. İnstrümantel Analiz, Altıncı Baskı. Ankara : Gazi Kitapevi, 2002:80,81,101.

27. Skoog DA, Leary JJ. Principles of Instrumantel Analysis, 4th Edition. New York: Harcourt Brace College Publishers 1998;116,117,134,135,139,674,679,705,706.

28. Holler JF, Skoog DA, West DM. Spektrokimyasal metotlara giriş. Kılıç E, Köseoğlu F eds. Analitik Kimya. Özkan matbaa. Ankara 1999:497-724.

29. Grinter HC, Threlfall TL. UV-VIS Spectroscopy and its applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany, 1992:81-88.

30. Analitik Kimya II Laboratuvar Aletli Analiz Deneyleri Hacettepe Üniv., Ecz.Fak. Analitik Kimya A.B.D., Ankara, 2005.

7. EKLER

Ek 1. % Geri Kazanım Hesaplama Yöntemi

% Geri Kazanım = (Biyolojik materyale eklenmiş ilaç pik alanı/hareketli faza eklenmiş ilaç pik alanı)x100

Ek 2. Bağıl Standart Sapma ve Bağıl Hata Hesaplama Yöntemi

Bağıl Standart Sapma (BSS) = (Standart Sapma/Aritmetik Ortalama)x100

% Bağıl Hata = [(Bulunan-Eklenen)/Eklenen]x100