

ULVI MEHDİZADE

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2020





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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ROFLUMİLASTİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR YÜKSEK  
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ  
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

**ULVİ MEHDİZEDE**

**DANIŞMAN  
DR.ÖĞR.ÜYESİ PELİN KÖSEOĞLU YILMAZ**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

**İSTANBUL-2020**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans öğrencisi Ulvi MEHDİZADE tarafından Dr. Öğr. Üyesi Pelin KÖSEOĞLU YILMAZ'ın danışmanlığında hazırlanan “Roflumilastın Tayini için Yeni bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 20.10.2020 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sıdıka TOKER

### Jüri-Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Pelin KÖSEOĞLU YILMAZ

### Jüri

Prof. Dr. Ufuk KOLAK

### Jüri

Doç. Dr. Abdulselam ERTAŞ

### Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ

**BEYAN**

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

ULVİ MEHDİZEDE

## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam sırasında gösterdiği bilimsel destek ve yakın ilgisinden dolayı değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Pelin Köseoğlu Yılmaz’a;

Çalışmanın yapılmasına imkan sağlayan ve desteklerinden dolayı Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Sıdıka Toker’e;

Çalışmam sırasında gösterdiği ilgiden dolayı Sayın Prof. Dr. Ufuk Kolak’a ve Arş. Gör. Dr. Gamze Ergin Kızılçay’a;

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans sürecinde de hem maddi hem de manevi olarak yanımda olan babam Askerov Çingiz, annem Mammadova Ziyafet ve ablalarım sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                       |      |
|-------------------------------------------------------|------|
| BEYAN.....                                            | iii  |
| İTHAF.....                                            | iv   |
| TEŞEKKÜR.....                                         | v    |
| İÇİNDEKİLER .....                                     | vi   |
| TABLolar LİSTESİ.....                                 | ix   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                | x    |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                 | xi   |
| ÖZET .....                                            | xiii |
| ABSTRACT.....                                         | xiv  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                 | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                               | 2    |
| 2.1. KOAH (Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı) ..... | 2    |
| 2.1.1. KOAH Tanımı.....                               | 2    |
| 2.1.2. Komorbiditeler .....                           | 2    |
| 2.1.3. Epidemiyolojisi .....                          | 3    |
| 2.1.4. Risk Faktörleri.....                           | 3    |
| 2.1.5. Semptomları .....                              | 4    |
| 2.1.6. Patolojisi.....                                | 5    |
| 2.2. Stabil KOAH Tedavisi .....                       | 6    |
| 2.2.1. KOAH Tedavisinde Kullanılan İlaçlar .....      | 7    |
| 2.2.1.1. Bronkodilatörler .....                       | 7    |
| 2.2.1.2. Kortikosteroidler .....                      | 8    |
| 2.2.1.3. Fosfodiesteraz-4 (FDE-4) İnhibitörleri ..... | 9    |
| 2.2.1.4. Diğer İlaç Tedavileri .....                  | 9    |
| 2.2.2. İlaç Dışı Tedaviler.....                       | 10   |
| 2.2.2.1. Pulmoner Rehabilitasyon .....                | 10   |
| 2.2.2.2. Oksijen Tedavisi.....                        | 10   |
| 2.2.2.3. Cerrahi Yolla Tedavi.....                    | 10   |
| 2.3. Fosfodiesteraz-4 (FDE-4) İnhibitörleri .....     | 13   |
| 2.4. Roflumilast (RFL).....                           | 14   |
| 2.4.1. Farmakolojisi .....                            | 14   |

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....                                      | 15 |
| 2.4.3. Analiz Yöntemleri.....                                                     | 17 |
| 2.4.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizleri .....      | 17 |
| 2.4.3.2. Spektrofotometrik Analizleri .....                                       | 20 |
| 2.4.3.3. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) ile Analizleri21  |    |
| 2.4.3.4. Kapiler Elektforez ile Analizleri.....                                   | 21 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                           | 25 |
| 3.1. Analizin Yapıldığı Yer.....                                                  | 25 |
| 3.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler .....                             | 25 |
| 3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler .....                                       | 25 |
| 3.2.2. Çözeltiler.....                                                            | 25 |
| 3.2.2.1. Hareketli Faz Çözeltisi .....                                            | 25 |
| 3.2.2.2. RFL ve IRB Çözeltileri .....                                             | 25 |
| 3.3. Cihaz ve Gereçler.....                                                       | 26 |
| 3.4. RFL'nin HPLC-FD ile Miktar Tayini için Yöntem Koşullarının Belirlenmesi .... | 26 |
| 3.4.1. Kromatografik Parametrelerin Seçimi .....                                  | 27 |
| 3.4.2. İç Standardın Seçilmesi.....                                               | 27 |
| 3.4.3. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması .....                                        | 27 |
| 3.4.4. Tabletten Ekstraksiyon.....                                                | 27 |
| 3.5. Geliştirilen Yöntemin Validasyon Parametreleri.....                          | 28 |
| 3.5.1. Seçicilik (Özgünlük) .....                                                 | 28 |
| 3.5.2. Doğrusallık.....                                                           | 28 |
| 3.5.3. Uygunluk Parametreleri .....                                               | 28 |
| 3.5.4. Doğruluk .....                                                             | 28 |
| 3.5.5. Kesinlik .....                                                             | 29 |
| 3.5.6. Gözlenebilme Sınırı (LOD) .....                                            | 29 |
| 3.5.7. Tayin Sınırı (LOQ).....                                                    | 29 |
| 3.5.8. Sağlamlık .....                                                            | 30 |
| 4. BULGULAR.....                                                                  | 31 |
| 4.1. RFL'nin HPLC-FD ile Miktar Tayini için Geliştirilen Yöntemin Koşulları.....  | 31 |
| 4.1.1. Kromatografik Parametreler .....                                           | 31 |
| 4.1.2. İç Standardın Seçilmesi.....                                               | 31 |
| 4.1.3. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması .....                                          | 32 |

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| 4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyon Sonuçları ..... | 34 |
| 4.2.1. Seçicilik.....                                 | 34 |
| 4.2.2. Doğrusallık.....                               | 34 |
| 4.2.3. Uygunluk Parametreleri .....                   | 35 |
| 4.2.4. Doğruluk ve Kesinlik .....                     | 35 |
| 4.2.5. Gözlenebilme Sınırı (LOD) .....                | 38 |
| 4.2.6. Tayin Sınırı (LOQ).....                        | 38 |
| 4.2.7. Sağlamlık .....                                | 38 |
| 5. TARTIŞMA .....                                     | 39 |
| KAYNAKLAR .....                                       | 42 |
| İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....                       | 50 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                        | 51 |

## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2- 1: KOAH'ta Yaygın Kullanılan Bronkodilatör Formülasyonları ve Günlük Dozları* (Kocabaş ve ark. 2014) .....                     | 11 |
| Tablo 2- 2: RFL'nin Tayin Yöntemleri .....                                                                                              | 23 |
| Tablo 3- 1: Kimyasallar Maddeler ve Çözücüler.....                                                                                      | 25 |
| Tablo 4- 1: Ölçü Eğrisi Verileri.....                                                                                                   | 33 |
| Tablo 4- 2: Regresyon Analizi Sonuçları .....                                                                                           | 33 |
| Tablo 4- 3: Uygunluk Parametreleri .....                                                                                                | 35 |
| Tablo 4- 4: Standart Çözeltiler ile Gerçekleştirilen Doğruluk ve Kesinlik Çalışmalarının Sonuçları.....                                 | 36 |
| Tablo 4- 5: Tablet Çözeltisi ve RFL Katılmış Tablet Çözeltileri ile Gerçekleştirilen Doğruluk ve Kesinlik Çalışmalarının Sonuçları..... | 37 |
| Tablo 4- 6: Yöntemin Sağlamlığı .....                                                                                                   | 38 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2- 1: RFL'nin Kimyasal Yapısı .....                                                          | 16 |
| Şekil 2- 2: RFL N-Oksidin Kimyasal Yapısı.....                                                     | 16 |
| Şekil 2- 3: RFL'nin Bozunma Ürünleri .....                                                         | 18 |
| Şekil 4- 1: RFL'nin Absorpsiyon (a) ve Emisyon (b) Spektrumları.....                               | 31 |
| Şekil 4- 2: IRB'nin Kimyasal Yapısı .....                                                          | 32 |
| Şekil 4- 3: Ölçü Eğrisinin Hazırlanmasında Kullanılan Standart Çözeltilere Ait Kromatogramlar..... | 32 |
| Şekil 4- 4: RFL'nin 1,25-10,0 µg/mL Konsantrasyon Aralığında Hazırlanan Ölçü Eğrisi .....          | 34 |
| Şekil 4- 5: Hareketli Fazın HPLC-FD Kromatogramı.....                                              | 34 |
| Şekil 4- 6: Tablet Çözeltisinin HPLC-FD Kromatogramı .....                                         | 36 |

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

|             |                                                  |
|-------------|--------------------------------------------------|
| A:          | Pik alanı                                        |
| $\bar{A}$ : | Pik alanları oranlarının ortalaması              |
| AAT:        | Alfa-1 antitripsin                               |
| C:          | Konsantrasyon                                    |
| cAMP:       | Siklik adenozin monofosfat                       |
| $C_{max}$ : | Maksimum konsantrasyon                           |
| CZE:        | Kapiler zon elektroforez                         |
| DAD:        | Diyot serili dedektör                            |
| EAA:        | Eğri altı plazma alanı                           |
| FD:         | Floresans dedektör                               |
| FDA:        | Amerika Gıda ve İlaç İdaresi                     |
| FDE:        | Fosfodiesteraz                                   |
| h/h:        | Hacim/hacim                                      |
| HPLC:       | Yüksek performanslı sıvı kromatografisi          |
| HPTLC:      | Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi   |
| ICH:        | Uluslararası Harmonizasyon Konferansı            |
| ICS:        | İnhale kortikosteroid                            |
| IRB:        | Irbesartan                                       |
| İS:         | İç standart                                      |
| KOAH:       | Kronik obstrüktif akciğer hastalığı              |
| LABA:       | Uzun etkili beta agonist                         |
| LAMA:       | Uzun etkili muskarinik antagonist                |
| LOD:        | Gözlenebilme sınırı                              |
| LOQ:        | Tayin sınırı                                     |
| MeOH:       | Metanol                                          |
| mg:         | Miligram                                         |
| mL:         | Mililitre                                        |
| OPA:        | orto-Fosforik asit                               |
| RFL:        | Roflumilast                                      |
| RP-HPLC:    | Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| RSD:        | Bağıl standart sapma                             |

SD: Standart sapma

UV: Ultraviyole

$\mu$ : Mikro

$\mu$ L: Mikrolitre



## ÖZET

Mehdizade, U. (2020). Roflumilastın Tayini için Yeni bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Roflumilast kronik obstrüktif akciğer hastalığı tedavisinde kullanılan non-steroidal antienflamatuvar bir fosfodiesteraz-4 inhibitörüdür. Bu yüksek lisans tezi kapsamında roflumilastın tablet formülasyonlarda miktar tayini için yeni bir floresans dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminin geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlandı. Ayırma işlemleri 40°C'de bir C18 analitik kolon (250 × 4,6 mm, 5 µm) ile gerçekleştirildi. Mobil faz olarak %20 sulu o-fosforik asit çözeltisi (0,08%) ve %80 metanol içeren bir sistem kullanıldı ve izokratik elüsyon uygulandı. Eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 290 ve 380 nm olarak belirlendi. Doğrusal aralık 1,25-10,00 µg/mL olarak tespit edildi. İç standart olarak irbesartan kullanıldı. Gözlenebilme ve tayin sınırları sırası ile 0,07 µg/mL ve 0,22 µg/mL olarak hesaplandı. Yöntemin kesinlik ve doğruluğu 1,25, 5,00 ve 10,00 µg/mL konsantrasyonlarındaki standart çözeltiler ile belirlendi. Yüzde geri kazanım düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda standart eklenen tablet çözeltilerinin analiz sonuçları ile hesaplandı. Yöntemin sağlamlığı, akış hızı, mobil faz bileşimi ve kolon sıcaklığı parametreleri ile incelendi. Önerilen metot roflumilastın tablet formülasyonlarda yüksek kesinlik ve doğruluk ile tayini için başarılı bir şekilde uygulandı.

Anahtar Kelimeler: Roflumilast, irbesartan, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, floresans, metot geliştirme ve validasyon, ilaç analizi

## ABSTRACT

Mehdizade, U. (2020). Development and Validation of a New High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Roflumilast. Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. MSc Thesis. İstanbul.

Roflumilast is a non-steroidal anti-inflammatory phosphodiesterase-4 inhibitor used in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. In this MSc thesis, it was aimed to develop and validate a novel high performance liquid chromatography method with fluorescence detection for the quantification of roflumilast in tablet formulations. Separations were achieved by a C18 analytical column ( $250 \times 4.6$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ) at  $40^\circ\text{C}$ . Isocratic elution was applied with a mobile phase consisting of 20% aqueous o-phosphoric acid solution (0.08%) and 80% methanol. The excitation and the emission wavelengths were 290 and 380 nm, respectively. The linear range was 1.25-10.00  $\mu\text{g/mL}$ . Irbesartan was used as the internal standard. Limits of detection and quantification were 0.07  $\mu\text{g/mL}$  and 0.22  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The precision and the accuracy of the method was determined at the concentrations of 1.25, 5.00 and 10.00  $\mu\text{g/mL}$ . The recovery percent was calculated by the tablet solutions spiked at low, middle and high concentrations. The robustness of the method was tested in terms of flow rate, mobile phase composition and column temperature. The proposed method was successfully applied for the determination of roflumilast in tablet formulations with high precision and accuracy.

**Key Words:** Roflumilast, irbesartan, high performance liquid chromatography, fluorescence, method development and validation, drug analysis

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), akciğerlerden hava akışının tıkanmasına neden olan kronik enflamatuvar bir akciğer hastalığıdır. KOAH dünya çapında morbidite ve mortalitenin başlıca nedenlerindendir (Fabbri ve ark. 2008). Genetik duyarlılık ile çevresel uyaranlara maruz kalma arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır. Başlıca risk faktörleri sigara kullanımı, alfa-1 antitripsin (AAT) eksikliği ve mesleki maruziyetdir. Farmakolojik tedavi alevlenmelerin sıklığı ve semptomların azaltılması ile egzersiz kapasitesinin artırılmasında faydalıdır (Rabe ve ark. 2007).

Bir dizi benzamit türevinden geliştirilmiş, roflumilast (3-(siklopropilmetoksi)-N-(3,5-dikloro-4-piridinil)-4-(diflorometoksi)-benzamit) (RFL), güçlü ve seçici bir fosfodiesteraz-4 inhibitörü olarak onaylanmıştır (Hatzelmann ve Schudt 2001). RFL ve ana aktif metaboliti olan RFL N-oksit, insan bağışıklık hücrelerinin *in vitro* uyarılmasının ardından iltihaplanma araçlarının salınmasını bastırır (Lipworth 2005). Temmuz 2010'da, bronkodilatör tedavisine ek olarak, ağır KOAH'nın idame tedavisi için Avrupa İlaç Ajansı tarafından RFL'ye (Daxas; Nycomed) pazarlama izni verilmiştir (European Medicines Agency 2018). Mart 2011'de ise, KOAH alevlenmelerini azaltmak için ABD'de FDA onayı almıştır (Mullard 2012). RFL 500 µg tabletler halinde mevcut olup, yetişkinler için doz 1 tablet/gündür. Oral kullanılan RFL tabletinin biyoyararlanımı %80'dir (Daliresp package insert 2015).

Literatürde RFL'nin çeşitli örneklerde analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), UV-görünür bölge spektrofotometrisi, yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi ve kapiler elektroforez yöntemlerinin uygulandığı belirlenmiştir. HPLC, RFL tayini için en çok kullanılan tekniklerden biridir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında ilk defa floresans dedektörlü HPLC ile tablet formülasyonlarında RFL'nin miktar tayini için duyarlı ve basit bir yöntemin geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. KOAH (Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı)

#### 2.1.1. KOAH Tanımı

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), solunum yollarının ve alveoler anormalliklerin neden olduğu kalıcı teneffüs semptomları ve hava akımı sınırlaması ile karakterize, genellikle zehirli partiküllere veya gazlara önemli ölçüde maruz kalmaktan meydana gelen yaygın, önlenabilir ve tedavisi mümkün bir hastalıktır. KOAH'ı karakterize eden kronik hava akımı sınırlaması, amfizem ve kronik bronşitden kaynaklanır. Kronik bronşit art arda iki yıl ve her yılın en az üç ayı olmak üzere balgamlı öksürüğü karakterize eder. Nefes darlığı, kronik öksürük ve balgam çıkarma hastalığın sık görülen semptomları arasındadır (Vogelmeier ve ark. 2017).

#### 2.1.2. Komorbiditeler

Araştırmalar KOAH'nın komorbidite bir hastalık olduğunu ortaya çıkarmıştır. Hava akımı tıkanıklığının kardiyak fonksiyon ve gaz değişimi gibi sistemik sonuçları üzerinde derin etkileri vardır. Ayrıca, KOAH onarım mekanizmalarındaki enflamasyon ve değişikliklerden kaynaklandığından, enflamatuvar aracılarda dolaşıma “dökülmesi”, kaşeksi gibi hastalığın önemli sistemik belirtilerine yol açabilir. Sistemik enflamasyon kalp hastalığı, akciğerlerde kanser, anemi, osteoporoz, diyabet ve depresyon gibi sistemik hastalıkları ortaya çıkarabilir veya kötüleştirebilir (Kocabaş ve ark. 2014, Barnes ve Celli 2009). Bu komorbiditeler sağlık sonuçlarını etkiler, hastaneye yatış ve ölüm riskini artırır. KOAH'da komorbiditeler sağlık kaynaklarının kullanımının %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır (Sin ve ark 2006).

Hastalık genellikle sigara kullanımından kaynaklandığından, sigaranın sistemik etkileri sadece KOAH ile ilişkili solunum anormallikleri, semptomları ve fonksiyonel bozukluklarına değil, aynı zamanda kronik komorbiditelerine de önemli katkıda bulunabilmektedir (Agusti 2006). Sigaraya ek olarak, kardiyovasküler ve diğer kronik komorbid durumlar için önemli bir risk faktörü de obezitedir. İki risk faktörü sinerjistik olarak etkileşime girebilir, çünkü hem obezite hem de sigara içimi insülin direnci, oksidatif stres ve çeşitli konsantrasyonlarda sitokinlerin ve enflamatuvar belirteçlerin artan konsantrasyonları ile ilişkilidir (Peeters ve ark. 2003).

Komorbiditelerin sonucu olarak KOAH hastaları genellikle kardiyovasküler hastalıklardan (%25), kanserden (esas olarak akciğer kanseri, %20-33) ve diğer solunum dışı hastalıklardan (%30) hayatını kaybetmektedir. Solunum yolu hastalıkları, özellikle KOAH alevlenmelerine bağlı solunum yetmezliği, ağır KOAH hastalarında ölümlerin %35'ini oluşturur (McGarvey ve ark. 2007).

### 2.1.3. Epidemiyolojisi

KOAH dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerindendir. Geçmişteki hastalık tanı sayılarının net olmaması ve tanı koyma zorluğu göz önüne alındığında sayısal verilerin doğruları tam göstermediği sonucuna varılır. Fakat, günümüzde sayısal verilerin artması hastalığın mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenlerinden biri olduğunu göstermektedir. Hastalığın tüm evrelerinde spirometri kullanımı, tanıyı iyileştirmek ve KOAH'ı erken tespit etmek için çok önemlidir.

2005 yılında 3 milyona yakın kişi, tüm nedenlere bağlı mortalitenin yaklaşık %5'ini oluşturan KOAH'tan ölmüştür. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporlarında KOAH'ın 2030 yılına kadar dünyanın en yaygın üçüncü ölüm ve sakatlık nedeni olacağı tahmin edilmektedir (World Health Organization 2017).

Hastalığın küresel olarak, 2015 yılında 3,17 milyon (2015 yılındaki tüm ölümlerin %5'i) ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir. Global Hastalık Yüğü Çalışması, 2016 yılında dünya çapında 251 milyon KOAH vakası prevalansı bildirmektedir (Kar ve Zengin 2019).

Hafif ve orta şiddette KOAH olan bireylerin %60-85'inde tanı konulmadığı düşünülmektedir. İspanyada yapılan bir araştırmada, 40-80 yaşlarındaki yetişkinlerin %10'unda KOAH olmasına rağmen, sadece %27'sine daha önce tanı konulmuştur (Miravitlles ve ark. 2009, Hvidsten ve ark. 2010). KOAH tipik olarak erkeklerde görülmesine rağmen, sigara içen 50 yaş üstündeki bireylerde sayısının artması sonucu kadınlarda da prevalans artmıştır. ABD'de ilk kez, kadınlarda mortalite oranı düşük olmasına rağmen, 2000 yılında benzer sayıda erkek ve kadın KOAH sebebi ile ölmüştür (Mannino ve ark. 2002).

### 2.1.4. Risk Faktörleri

KOAH, genetik duyarlılık ile çevresel uyaranlara maruz kalma arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır. KOAH için esas risk faktörleri sigara kullanımı, alfa-1 antitripsin (AAT) eksikliği ve mesleki maruziyettir.

Hastalık için tütün kullanımı ana sebeptir. Sigara dumanı akciğer ve sistemik enflamasyona, sistemik oksidatif strese, vazomotor ve endotelial fonksiyonlarda belirgin değişikliklere ve çeşitli pro-pıhtılaşma faktörlerinin dolaşım konsantrasyonlarının artmasına neden olur. Sigara dumanına pasif maruz kalma, akciğerlerde solunan parçacıkların ve gazların toplam yükünü artırarak solunum semptomlarına ve KOAH'a da katkıda bulunabilir. Ayrıca sigara kullanımı KOAH ile birlikte komorbiditelerin de başlıca sebebidir (Rabe ve ark. 2007).

Tozlar, kimyasal ajanlar ve dumanlar dahil olmak üzere mesleki maruziyetler KOAH gelişimi için risk faktörleri arasındadır. Mesleki maruziyet veya mesleki toza maruz kalmak hem sigara içenlerde hem de içmeyenlerde kronik bronşit ve klinik olarak önemli akciğer fonksiyon kayıplarına neden olmaktadır (Oxman ve ark. 1993). Odun, hayvan gübresi, mahsul artıkları ve tipik olarak açık ateşlerde veya kötü çalışan ocaklarda yakılan kömür, iç mekan hava kirliliğine yol açabilir (Orozco-Levi ve ark. 2006). Kötü havalandırılan konutlarda biyokütle pişirme ve ısıtmadan kaynaklanan iç mekan kirliliği KOAH için bir risktir (Ezzati 2005).

KOAH'lı bireylerin %1-2'sinde iyi belirlenmiş genetik bir KOAH nedeni olan AAT eksikliği vardır. AAT kan dolaşımında ve akciğerlerde bulunan bir proteindir. AAT akciğerleri, amfizem ve KOAH'a yol açabilecek enflamasyonun neden olduğu hasardan korumaya yardımcı olmaktadır. Vücutları bu proteinden yeterli miktarda üretmeyen insanların amfizem geliştirme ve normalden daha genç yaşta (30-40 yaş arası) hasta olma olasılığı daha yüksektir. Nadir görülen bu hastalık KOAH gelişme riskini artıran tek genetik faktördür (Gooptu ve ark. 2009). Bununla birlikte, yüksek miktarda sigara tüketen bireylerin sadece %15-20'sinde KOAH gelişmektedir. Bu durum da hangi sigara tüketicilerinin hava akımı kısıtlaması geliştirme riski altında olduğunu belirlemede genetik faktörlerin önemli olabileceğini düşündürmektedir (Barnes 1999).

Sigara, mesleki tozlar ve genetik nedenlerden başka diğer birçok risk faktörü vardır. Hastanın yaşı, cinsiyeti, yaşam şartları, daha önce hastada kronik bronşit ve astım olması, çocukluk döneminde geçirilmiş enfeksiyonlar diğer risk faktörleridir.

### 2.1.5. Semptomları

- Kronik ve progresif dispne en bilinen semptomudur. KOAH'da sakatlık ve anksiyetenin esas sebebi olarak görülür.
- Kronik öksürük genellikle ilk belirtilerdendir.

- Düzenli balgam üretimi ardışık 2 yıl içinde 3 ay ve daha fazla görülebilir. Çok miktarda balgam üreten hastalarda altta yatan bronşektazi olabilir.
- Hışıltı ve göğüs sıkışması da semptomlar arasındadır.

Diğer olası semptomlar arasında yorgunluk, kilo kaybı ve anoreksiya vardır. Fakat bunlar KOAH'nın ağır evrelerini geçiren hastalarda görülmektedir (Vogelmeier 2017). KOAH hastalarında sık görülen ve dikkate alınması gereken semptomlar arasında depresyon ve anksiyete de yer almaktadır (Hanania ve ark. 2011).

### 2.1.6. Patolojisi

KOAH akciğerlerin anormal enflamatuvar cevabı ile ilgili, çoğu zaman ilerleyici, geri dönüşümü zor, hava akımı sorunuyla karakteristik bir hastalıktır. Hastalığın patogenezi için mevcut hipotez, toksik partiküllerin ve gazların solunmasına anormal bir yanıttan kaynaklandığıdır (Pauwels ve ark. 2001).

KOAH'nın patolojik belirteçleri, amfizemi karakterize eden akciğer parankiminin tahrip edilmesi, bronşiyoliti karakterize eden periferik hava yollarının iltihaplanması ve kronik bronşiti karakterize eden merkezi hava yollarının iltihaplanmasıdır. Bu anormalliklerin fonksiyonel sonucu ekspiratuar hava akımı sınırlamasıdır (Turato ve ark. 2001).

KOAH'ı karakterize eden kronik hava akımı sınırlaması, hastalara göre değişiklik gösteren küçük hava yolları hastalığı (obstrüktif bronşiolit) ve parankimal yıkım (amfizem) karışımından kaynaklanır. Kronik enflamasyon yapısal değişikliklere, küçük havayollarının daralmasına ve akciğer parankiminin tahrip olmasına yol açar. Küçük hava yollarının kaybı, hastalığın karakteristik bir özelliği olan hava akışı sınırlamasına ve mukosilyer disfonksiyona katkıda bulunabilir. KOAH patogenezi, toksik parçacıkların ve gazların solunmasına karşı doğuştan gelen ve uyarlanabilir enflamatuvar bağışıklık tepkisine dayanır. Tütün kullanımı bu inhalasyon hasarının birincil nedeni olmasına rağmen, diğer birçok çevresel ve mesleki maruziyet KOAH patolojisine katkıda bulunur. KOAH ile ilişkili immün enflamatuvar değişiklikler, mukus üretimini arttıran ve akciğerin gaz değişim yüzeyinin amfizematöz tahribatına neden olan bir doku onarım ve yeniden modelleme işlemiyle bağlantılı hastalıktır. Sigara içenlerde gözlenen yaygın amfizem şekli, KOAH'da ana tıkanıklık bölgesi haline gelen kalınlaşmış ve daralmış küçük bronşiyollerin yakınındaki solunum bronşiyollerinde başlar. Hastalık ilerledikçe oluşmuş hasarlar artar (Hogg ve Timens 2009).

## 2.2. Stabil KOAH Tedavisi

Bir KOAH tedavisinin etkili olabilmesi için öncelikle hastanın semptomlarının ve gelecekte ortaya çıkabilecek risklerinin azaltılması üzerinde durulur. Şu anda mevcut olan KOAH ilaçları semptomları azaltabilir veya ortadan kaldırabilir, egzersiz kapasitesini artırabilir, alevlenmelerin sayısını, şiddetini azaltabilir ve sağlık durumunu iyileştirebilir. Fakat, hiçbir tedavi akciğer fonksiyonlarındaki düşüş oranını değiştirmemiştir. Hastaya tanı konulduktan sonra risk faktörlerinin azaltılması, stabil KOAH tedavisi ve alevlenmelerin tedavisi programı hastaya uygulanabilir (Kocabaş ve ark. 2014).

KOAH tedavisi için başlıca seçilecek hedefler arasında hastanın semptomlarının ve gelecekte ortaya çıkabilecek risklerin azaltılması yer alır. Sigara içmek KOAH için en sık karşılaşılan ve kolayca tanımlanabilir risk faktörüdür. Bunun için sigara içenler sigarayı bırakmaya teşvik edilmelidir. Mesleki tozlara ve sigara dumanına maruziyet minimuma düşürülmelidir (Vogelmeier ve ark. 2017).

Semptomların ve alevlenme riskinin bireysel olarak değerlendirilmesi ve farmakolojik tedavinin başlatılması için hastalar sınıflara bölünmüştür:

### A Sınıf Hastalar:

Bu sınıftaki hastalarda alevlenmelerin riski düşük ve hastalık semptomları azdır. Tüm A grup hastalarına nefes darlığını azaltmak için bronkodilatör önerilmelidir. Bu, hastanın tercihinine bağlı olarak kısa veya uzun etkili bir bronkodilatör olabilir. Semptomatik fayda kaydedilirse bronkodilatöre devam edilmelidir.

### B Sınıf Hastalar:

B sınıftaki hastalarda alevlenme riski düşük fakat semptomlar çoktur. Başlangıç tedavisi uzun etkili bir bronkodilatör olmalıdır. Uzun etkili bronkodilatörler, aralıklı olarak alınan kısa etkili bronkodilatörlerden etkilidir. Uzun etkili bronkodilatör seçimi bireysel hasta cevabına bağlı olmalıdır. Monoterapide kalıcı nefes darlığı olan hastalar için, iki bronkodilatör kullanılması tavsiye edilir. Şiddetli nefes darlığı olan hastalar için ilk tedavi, iki bronkodilatörle düşünülebilir.

### C Sınıf Hastalar:

C sınıftaki hastalarda alevlenme riski çok, semptomlar düşüktür. Başlangıç tedavisi tek bir uzun etkili bronkodilatör olmalıdır. Uzun etkili muskarinik antagonistlerin (LAMA) alevlenmeyi önleme konusunda uzun etkili beta agonistlerden (LABA) etkili olmasından dolayı, başlangıç tedavisi olarak önerilir. Kalıcı alevlenmeleri olan hastalar ikinci bir uzun etkili bronkodilatör (LABA/LAMA) veya bir LABA-inhale kortikosteroid

(ICS) kombinasyonu kullanılabilir. ICS'lerin pnömoni riskini arttırmamasından dolayı birincil tercih LABA/LAMA'dır.

### **D Sınıf Hastalar**

D sınıfındaki hastalarda hem alevlenme riski hem de semptomlar yüksektir. Hastalarda LABA/LAMA tedavisi başlatılır. Başlangıçta tek bir bronkodilatör seçilirse, alevlenmeyi önlemek için LABA'lara kıyasla bir LAMA tercih edilir. LABA/LAMA tedavisi üzerinde ek alevlenmeler geliştiren hastalarda, iki alternatif yol önerilir. Birincisi LABA/LAMA/ICS tedavisi, diğeri LABA/ICS'ye geçmektir. LABA/ICS tedavisinden semptomlar ve alevlenmeler açısından olumlu yanıt alınmazsa, bir LAMA eklenebilir. LABA/LAMA/ICS ile tedavi edilen hastalarda hala alevlenme görülürse bir FDE-4 inhibitörü olan RFL de verilebilir (Vogelmeier ve ark. 2017).

### **2.2.1. KOAH Tedavisinde Kullanılan İlaçlar**

KOAH alevlenmeleri için en sık kullanılan ilaç sınıfları bronkodilatörler, kortikosteroidler ve antibiyotiklerdir.

#### **2.2.1.1. Bronkodilatörler**

KOAH tedavisinin temelini oluşturan bronkodilatörler solunum yollarının etrafındaki düz kasları gevşeterek, akciğerlerdeki hava yollarının açılmasına yardımcı olur ve oksijen alımını artırır. Bronkodilatörler etki sürelerine göre uzun ve kısa olmak üzere ikiye ayrılırlar. Kısa etkili kriz anında kullanılırken, uzun etkili bronkodilatörler kademeli tedavi için kullanılır. Beta-2 agonistler, antikolinerjikler ve metilksantinler günümüzdeki yaygın klinik kullanımda olan bronkodilatörlerdir (Celli ve MacNee 2004).

**Beta-2 agonistler** solunum yolu düz kaslarında beta-2 adrenerjik reseptörleri stimülasyonla siklik adenosin monofosfatı (cAMP) artırarak bronkodilatasyon sağlarlar. Kısa etkili beta-2 agonistlerden olan salbutamol ve terbutalinin inhaler kullanımından kısa süre sonra yanıt vermekle birlikte, etkileri 4-6 saate kadar sürmektedir (Cook ve ark. 2001). Kısa etkili beta-2 agonistler egzersiz kapasitesini akut olarak arttırmış ve sağlık durumunda iyileşme sağlamıştır (Mahler 2002).

LABA'lardan indakaterol 24 saat, salmeterol ve formeterol 12 saat ve daha fazla etki göstermektedir (Rodrigo ve ark. 2008). LABA'lar akciğer fonksiyonlarında iyileşme sağlamış, semptomları azaltmış, yaşam kalitesini ve egzersiz kapasitesini arttırmıştır. LABA'lar titreme, çarpıntı, kas krampları, serum potasyum konsantrasyonunda bir düşme, baş ağrısı dahil olmak üzere tahmin edilebilir yan etkilere yol açmaktadır.

Salmeterol ayrıca paradoksal bronkospazmaya da neden olabilir. Disritmiler ve hayatı tehdit eden astım atakları gibi ciddi advers olayların meydana gelebileceğine dair bazı kanıtlar vardır. Bununla birlikte, bu tür olayların insidansı çok düşüktür, ancak inhale kortikosteroid kullanmayan hastalarda artabilir. Günde iki kez 50 µg salmeterol ve günde iki kez 12 µg formoterol astım ve KOAH hastalarının tedavisinde etkili ve güvenlidir. Yüksek dozlar daha fazla yan etkiye neden olur, ancak ciddi yan etkilere pek rastlanmaz (Sovani ve ark. 2004).

**Antikolinerjikler** muskarinik reseptörlerin antagonistleridir. Hava yolu düz kasında kasılmaya neden olan M3 muskarinik reseptörleri üzerindeki asetilkolinin etkisini bloke ederek bronkodilatasyon sağlarlar. Kısa etkili antikolinerjik olan ipratropium bromürün inhale kullanımından 30 dakika sonra etkisi başlar ve 6-8 saat sürer. Uzun etkili antikolinerjik tiotropium ise 18 µg günlük doz olarak inhale kullanılır. Etkisi kullanımdan 30-60 dakika sonra görülür ve 24 saat etki göstermektedir. Tiotropium hastaneye yatışların ve alevlenmelerin azalmasına, yaşam kalitesinin artmasına neden olur. Ağız kuruluğu ve metalik tat bırakması gibi yan etkileri vardır (Kocabaş ve ark. 2014). Tiotropiumla yapılan klinik araştırmalar sonucu kardiyovasküler riskin fazla olmadığı sonucuna varılmıştır (Kesten ve ark. 2006).

**Metilksantinlerin** etki mekanizmaları, hücre içi cAMP konsantrasyonunu arttırarak düz kaslarda gevşemeye sebep olmalarıdır. Maliyet ve hastaya uyumluluk açısından uygun olduğu için yaygın kullanılmaktadırlar. Teofilin şu anda KOAH hastalarının tedavisi için kullanılan tek metilksantindir. Kullanımı yan etkilerinden dolayı sınırlıdır. Bu sebeple üçüncü basamak ilaç grubu olarak bilinmektedir. Bir LABA'ya ilave edildiğinde ek klinik iyileşme sağladığı gösterilmiştir (Rennard 2004). Teofilinin antienflamatuvar etkisi vardır (Culpitt ve ark. 2002). Hafif inotropik, diüretik ve iskelet kas kuvvetini arttırmada etkindir. Teofilin, bulantı ve kusma, nöbetler ve aritmiler gibi doza bağlı yan etkilere sahiptir (Rennard 2004).

Tedavi sürecinde etkinliği arttırmak ve yan etkileri azaltmak amacıyla bazen tek bronkodilatör sınıfı değil, kombine bronkodilatörler de kullanılmaktadır (Çelik ve ark. 2010)

#### 2.2.1.2. Kortikosteroidler

KOAH tedavisinde inhaler ve sistemik kortikosteroidler de kullanılmaktadır. Hastalığın stabil döneminde sistemik kortikosteroidler faydalı olmadığı için uzun müddet

kullanımı önerilmemektedir. Birkaç ciddi yan etkisi vardır ve düzenli kullanımları artmış mortalite ile ilişkilidir. Fakat alevlenmeler zamanı kullanılabilir. ICS'lerin ise tek başına kullanımının güvenliği bilinmediği için tek başına kullanımı önerilmez. Uzun etkili bronkodilatörlerle kullanımı daha etkilidir (Kocabaş ve ark. 2014). ICS'lerin KOAH hastalarında potansiyel olarak faydalı iki etkisi vardır. İlk olarak, hava akışında hafif bir iyileşme sağlar ve bu etki genellikle bronkodilatörlerle elde edilen etkiden önemli ölçüde azdır. Diğer yandan LABA bronkodilatörlere eklendiğinde kortikosteroidlerin faydası hala görülebilir (Burge ve ark. 2000, Pauwels ve ark. 1999).

#### **2.2.1.3. Fosfodiesteraz-4 (FDE-4) İnhibitörleri**

FDE-4 inhibitörleri olarak adlandırılan bu sınıfın KOAH tedavisinde antienflamatuvar etkisi vardır. Bu sınıf Bölüm 2.3.'te ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

#### **2.2.1.4. Diğer İlaç Tedavileri**

**Antibiyotikler** - KOAH hastaları için alevlenmelerin çeşitli nedenleri vardır. En sık neden viral veya bakteriyel enfeksiyondur. KOAH alevlenmeleri nedeniyle hastaneye başvuran hastalarda, viral enfeksiyonlar, bakteriyel enfeksiyonlar veya her ikisi birden, vakaların %78'inde tespit edilmiş ve daha da önemlisi, bu hastalarda alevlenmelerin, enfeksiyon harici nedenleri olan hastalardan daha şiddetli olduğu belirlenmiştir (Papi ve ark. 2006). Bakteriyel nedenlerin tanısı için kabul edilen altın standart, balgam kültüründe potansiyel olarak patojenik bir mikro organizmanın izole edilmesidir. Bununla birlikte, bu yöntemin ne hassaslığı ne de doğruluğu yeterli değildir. Bu nedenle antibiyotik kullanıp kullanmama kararına yardımcı olması için klinik kriterler de dikkate alınmalıdır. Beyaz (mukoid) balgamın aksine yeşil (pürülan) balgam varlığı, antibiyotik tedavisine olan ihtiyacı tahmin etmenin en iyi ve en kolay yöntemlerinden biridir (Stockley ve ark 2000, Soler ve ark. 2007)

Viral ve bakteriyel enfeksiyon dışında antibiyotik kullanımı KOAH tedavisinde fazla önerilmemektedir.

**Aşılar** - Viral enfeksiyonlar KOAH alevlenmelerinin önemli bir nedenidir ve artan mortalite ile ilişkilidir. Grip aşısının KOAH hastalarında ağırlaşmış durumları ve ölümü %50 oranında azalttığı belirtilmiştir. Bu tür aşılardan diğer viral patojenlerden koruma sağlama veya influenzadan mutlak koruma sağlama beklenmemelidir (Griffin, 2002).

## **2.2.2. İlaç Dışı Tedaviler**

### **2.2.2.1. Pulmoner Rehabilitasyon**

Pulmoner rehabilitasyon programları, hasta eğitimi, farmakolojik terapi ve egzersiz eğitimini birleştiren kapsamlı, çok disiplinli programlardır. Eğitim programları, hastaların sınırlamalarına adaptasyonunu kolaylaştırmak için etkilidir. Ayrıca, hastanın farmakolojik rejimlere uymasını büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte, rehabilitasyon programlarının temel özelliği egzersiz eğitimidir. Farmakoterapinin rehabilitasyonla entegrasyonu hastaya maksimum fayda sağlar (Sassi-Dambron ve ark. 1995).

### **2.2.2.2. Oksijen Tedavisi**

KOAH'da istirahat hipoksemisi tanısı konulan hastalarda gün içersinde 15 saat ve daha fazla oksijen tedavisi uygulanması yaşam süresini arttırır. Oksijen tedavisi denenene diğer tedavilerden sonra oksijen seviyesi düşük olduğu takdirde uygulanır. Tedavide oksijen konsantratörü cihazı kullanılır (Kocabaş ve ark. 2014).

### **2.2.2.3. Cerrahi Yolla Tedavi**

Akciğer volüm azaltıcı cerrahi, akciğer nakli, büllektomi KOAH'da kullanılan cerrahi tedavilerdir (Kocabaş ve ark. 2014).

**Tablo 2- 1: KOAH'ta Yaygın Kullanılan Bronkodilatör Formülasyonları ve Günlük Dozları\* (Kocabaş ve ark. 2014)**

| <b>Etken madde</b>                    | <b>İnhaler</b>                                                             | <b>Nebülizatör solüsyonu</b>                                   | <b>Oral**</b>                                                                       | <b>Parenteral</b> | <b>Etki süresi</b> |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|
| <b>Kısa etkili antikolinergikler:</b> |                                                                            |                                                                |                                                                                     |                   |                    |
| <b>İpratropium bromür</b>             | -                                                                          | 250-500 µg/2 mL<br>(6-8 saatte 1-2 kere)<br>Maksimum: 2 mg/gün | -                                                                                   | -                 | 6-8 saat           |
| <b>Uzun etkili antikolinergikler:</b> |                                                                            |                                                                |                                                                                     |                   |                    |
| <b>Tiotropium</b>                     | 18 µg, KTİ                                                                 | -                                                              | -                                                                                   | -                 | 24+ saat           |
| <b>Kısa etkili β2 –agonistler:</b>    |                                                                            |                                                                |                                                                                     |                   |                    |
| <b>Salbutamol</b>                     | 100 µg; ÖDİ<br>4-6 saatte,<br>1-2 kere                                     | 2,5 mg/2.5 mL<br>4-6 saatte, 1 kere                            | 2-4mg tablet<br>(6-8 saatte 2-4 mg)<br>4-8 mg SR tablet<br>(12 saatte, 4-8 mg)      | 0,5 mg/mL, ampul  | 4-6 saat           |
| <b>Terbutalin</b>                     | 250 µg; KTİ<br>4-6 saatte, 1-2 kere<br>500 µg; KTİ<br>4-6 saatte, 1-2 kere | -                                                              | 2,5 mg tablet<br>(8 saatte 1 tablet)<br>5 mg durules tablet<br>(12 saatte 1 tablet) | -                 | 4-6 saat           |

Tablo 2.1 - devam

| Etken madde                                                                     | İnhaler                                    | Nebülizatör solüsyonu                | Oral**                            | Parenteral                        | Etki süresi |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------|
| <b>Uzun etkili <math>\beta_2</math> –agonistler:</b>                            |                                            |                                      |                                   |                                   |             |
| <b>Salmeterol</b>                                                               | 25 µg, ÖDİ<br>50 µg, KTİ                   | -<br>-                               | -<br>-                            | -<br>-                            | 12+ saat    |
| <b>Formoterol</b>                                                               | (12 saatte, 50-100 µg)<br>12 µg, ÖDİ       |                                      |                                   |                                   | 12+ saat    |
| <b>Indakaterol</b>                                                              | 4.5 µg, 9 µg, 12 µg,<br>KTİ<br>150 mcg KTİ |                                      |                                   |                                   | 24 saat     |
| <b>Kısa etkili <math>\beta_2</math> -agonist ve antikolinergik kombinasyonu</b> |                                            |                                      |                                   |                                   |             |
| <b>Salbutamol/<br/>İpratropium</b>                                              | 100 µg/20 µg<br>(6 saatte 2 kez)           | 2,5 mg/0,50 mg<br>(6-8 saatte 1 kez) | -                                 | -                                 | 6-8 saat    |
| <b>Metilksantinler</b>                                                          |                                            |                                      |                                   |                                   |             |
| <b>Teofilin</b>                                                                 | -                                          | -                                    | 100, 200, 300 mg<br>(12 saatte 1) | 200 mg/100 mL ve<br>400 mg/500 mL | 12-24 saat  |

\*: Ülkemizde bulunmayan preparatlar dahil edilmemiştir.

\*\* : Temel uygulama şekli inhalasyon tedavisidir. İnhalasyon yoluyla ilaç kullanamayan hastalarda oral preparatlar verilebilir.

KTİ: Kuru toz inhaler; ÖDİ: Ölçülü doz inhaler

### 2.3. Fosfodiesteraz-4 (FDE-4) İnhibitörleri

Son birkaç yılda KOAH tedavisi için enflamatuvar hücreleri inaktive eden oral FDE-4 inhibitörleri kullanılmaktadır. Bir FDE-4 inhibitörü, cAMP üzerindeki bozunma etkisini bloke etmek için kullanılan bir ilaçtır. Hem bağışıklık hücreleri hem de merkezi sinir sistemindeki hücreler içinde cAMP'ı hidrolize etmekten sorumludur (Spina 2009).

FDE-4 inhibitörlerinin çeşitli pulmoner, dermatolojik ve ciddi nörolojik hastalıkların tedavisinde umut verici farmakolojik ajanlar olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda, sırasıyla enflamatuvar havayolu hastalıkları, psöriatik artritis ve atopik dermatitis tedavisi için çok sayıda FDE-4 inhibitörü geliştirilerek sentezlenmiş, RFL, apremilast ve krisaborol molekülleri onaylanmıştır (Li ve ark. 2018).

FDE-4 inhibisyonu, hava yolu enflamasyonunu aşırı derecede baskılar ve cAMP seviyesinin yükselmesi yoluyla hava yolu düz kasını gevşetir. Bulantı, kusma ve bunlarla ilgili genel gastrointestinal yan etkiler FDE-4 inhibitörlerinin en sık görülen yan etkileridir. Diğer olası yan etkiler arasında, RFL'nin klinik kullanımında keşfedilen solunum ve idrar yolu enfeksiyonları bulunmaktadır.

Eskiden KOAH tedavisinde teofillin ve aminofillin gibi nonselektif fosfodiesteraz inhibitörleri kullanılıyordu. Ancak yan etkileri ve diğer ilaçlarla etkileşimlerinden dolayı bu ilaçların kullanımı sınırlandırılmıştır (Currie ve ark. 2008).

Daha sonra birinci nesil FDE-4 inhibitörü olan rolipram molekülünün çalışmaları başlatıldı. Rolipram antienflamatuvar ve immunomodülatör etki göstermiş, fakat telafi edilemeyen bulantı, kusma gibi yan etkileri ikinci nesil FDE-4 inhibitörlerinin geliştirilmesine yol açmıştır (Sanz ve ark. 2005).

RFL ve silomilast ikinci nesil FDE-4 inhibitörleridir. Silomilast tedavisinde hastaların solunum fonksiyonları ve sağlık durumu geçici olarak iyileşmiş ve 24 haftalık tedavide KOAH alevlenmesi oranı azalmıştır. Silomilast geliştirme programı sırasında, bu ikinci nesil FDE-4 inhibitörünün etkinliğini ve güvenliğini karakterize etmek için bir dizi farklı çalışmalar yapılmıştır. Geç faz programı boyunca yapılan güvenlik değerlendirmeleri, silomilast kullanımının ciddi güvenlik endişeleri ile ilgili herhangi bir kanıt ortaya koymamıştır. 2. faz ve erken 3. faz öncesi çalışmalar, etkinlik sonlanım noktalarında iyileşmeler ve bir antienflamatuvar etki mekanizması olduğuna dair bazı kanıtlar göstermiştir. Fakat, daha sonraki 3. faz çalışmaları, önceki program sonuçlarını kesin olarak doğrulayamadığından ve bu sürede ortaya çıkan yan etkilerinden dolayı

silomilast çalışması sona erdirilmiştir (Rennard ve ark. 2008). KOAH tedavisi için bir sonraki geliştirilen FDE-4 inhibitörü RFL olmuştur.

## 2.4. Roflumilast (RFL)

RFL KOAH tedavisinde kullanılan sistemik ve pulmoner enflamasyonu hedeflemek için geliştirilmiş, non-steroidal antienflamatuvar bir FDE-4 inhibitörüdür. FDE-4 inhibitörleri üzerine 20 yıldan fazla araştırma yapıldıktan sonra, RFL bu sınıftan dünya çapında hasta tedavisi için onay almış olan ilk maddedir (Hatzelmann ve ark. 2010).

RFL 1993 yılında kapsamlı bir çalışma sonucu bir dizi benzeri geliştirilmiştir (Amschler 1998, Hatzelmann ve Schudt 2001). FDE-4 enziminin seçici, uzun etkili bir inhibitörü olarak işlev gören bir ilaçtır. Antienflamatuvar etkileri vardır ve KOAH gibi akciğer enflamatuvar durumlarının tedavisi için oral yoldan uygulanarak kullanılır (Boswell-Smith ve Spina 2007). Klinik olarak en gelişmiş seçici ikinci nesil FDE-4 inhibitörüdür. Türünün diğer ilaçlarıyla karşılaştırıldığında klinik olarak daha etkindir ve daha az yan etkiye sahiptir. Baş ağrısı, ishal, mide bulantısı vakalarının çoğu tedavinin ilk haftasında meydana gelmiştir ve 2 haftadan kısa sürdüğü gözlenmiştir (Vignola 2004). RFL'nin moleküler etki mekanizması, cAMP artışı ile birlikte FDE-4 izoenziminin inhibisyonudur. RFL'nin antienflamatuvar, anti-amfizem ve antibiyotik gibi birçok farmakolojik etkisi vardır (Cortijo ve Morcillo 2010).

RFL Haziran 2010'da Avrupa İlaç Ajansı'nda kronik bronşit ile ilişkili şiddetli KOAH için onaylanmıştır (European Medicines Agency 2018). Mart 2011'de ise, KOAH alevlenmelerini azaltmak için ABD'de FDA onayı almıştır (Mullard 2012).

RFL'nin, orta ve şiddetli KOAH hastalarında akciğer fonksiyonunu iyileştirdiği bulunmuştur (Lipworth 2005). Faz III klinik çalışmalarda RFL'nin steroid ve antibiyotik tedavisi gereksinimini azalttığı ve KOAH alevlenmelerinden kaynaklanan hastaneye yatışları azalttığı bulunmuştur (Calverley ve ark. 2009). Bu nedenle RFL, KOAH tedavisi için birinci sınıf FDE-4 inhibitörüdür ve doktorlara şiddetli KOAH hastaları için başka bir tedavi seçeneği sunmaktadır.

### 2.4.1. Farmakolojisi

**Farmakodinamik** - Güçlü ve seçici bir FDE-4 inhibitörü olan RFL, kronik bronşit ile ilişkili şiddetli KOAH ve alevlenme öyküsü olan hastalarda KOAH alevlenmesi riskini azaltmak için endikedir (Daliresp package insert 2015, Hatzelmann

ve ark. 2010). FDE-4'ün seçici inhibisyonu, iltihaplı hücrelerde cAMP hidrolizini inhibe eder (Sanz ve ark. 2005). Artan hücre içi cAMP, nötrofillerdeki enflamatuvar araçların, sitokinlerin salımının ve birçok hücre tipinde hücre yüzeyi belirteçlerinin ekspresyonunun azalmasına ve azalmış apoptoz dahil olmak üzere çok çeşitli anti-enflamatuvar etkilere yol açar. RFL'nin ayrıca alerjene bağlı enflamasyonu azalttığı (Gauvreau ve ark. 2011) ve lipopolisakkarit kaynaklı sistemik enflamasyonu stabilize ettiği gösterilmiştir. (Schick ve ark. 2012).

**Farmakokinetik** - RFL, biyoyararlanımı yaklaşık %80 olan günde bir kez oral olarak kullanılan tablet dozaj formunda (500 µg) mevcuttur. RFL'nin maksimum plazma konsantrasyonlarına ( $C_{max}$ ), tek bir dozdan sonra yaklaşık 1 saatte (0,5-2 saat olabilir) ulaşılır ve aktif N-oksit metabolitinin maksimum konsantrasyonları 8 saatte (4-13 saat olabilir) elde edilir. Yiyeceklerin toplam ilaç emilimi üzerinde hiçbir etkisi yoktur, fakat RFL'nin maksimum konsantrasyonuna kadar olan süreyi ( $T_{max}$ ) bir saat geciktirir ve  $C_{max}$ 'ı %40 kadar azaltır, ancak RFL N-oksitin  $C_{max}$  ve  $T_{max}$  değerleri etkilenmez. RFL ve aktif metaboliti sırasıyla %99 ve %97 oranlarında plazma proteinlerine bağlanır. Tek doz 500 µg RFL için dağılım hacmi yaklaşık 2,9 L/kg'dır. RFL Faz I sitokrom P450 (CYP) ve Faz II konjugasyonu reaksiyonları ile yoğun bir şekilde metabolize edilir ve yarılanma ömrü yaklaşık 17 saattir (Daliresp package insert 2015). N-oksit metaboliti, insan plazmasında gözlemlenen tek majör metabolittir. RFL, in vitro FDE-4 enziminin inhibisyonunda RFL N-oksitten üç kat daha güçlü olmasına rağmen, RFL N-oksitin plazma eğri altı alanı (EAA), RFL'nin plazma EAA'sından ortalama 10 kat daha büyüktür. Karaciğer fonksiyon bozukluğu olan hastalarda doz ayarlaması gerekli olmamasına rağmen, eliminasyon bozulmuş olabilir (Hermann ve ark. 2007). Böbrek yetmezliği için doz ayarlaması gerekli değildir (Daliresp package insert 2015). Bununla birlikte, RFL, güçlü CYP3A4 inhibitörleri veya çift CYP3A4 ve CYP1A2 inhibitörleri (eritromisin, ketokonazol, fluvoksamin, enoksasin, simetidin veya rifampisin) ile birlikte uygulanmamalıdır (Westphal 2000).

#### 2.4.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

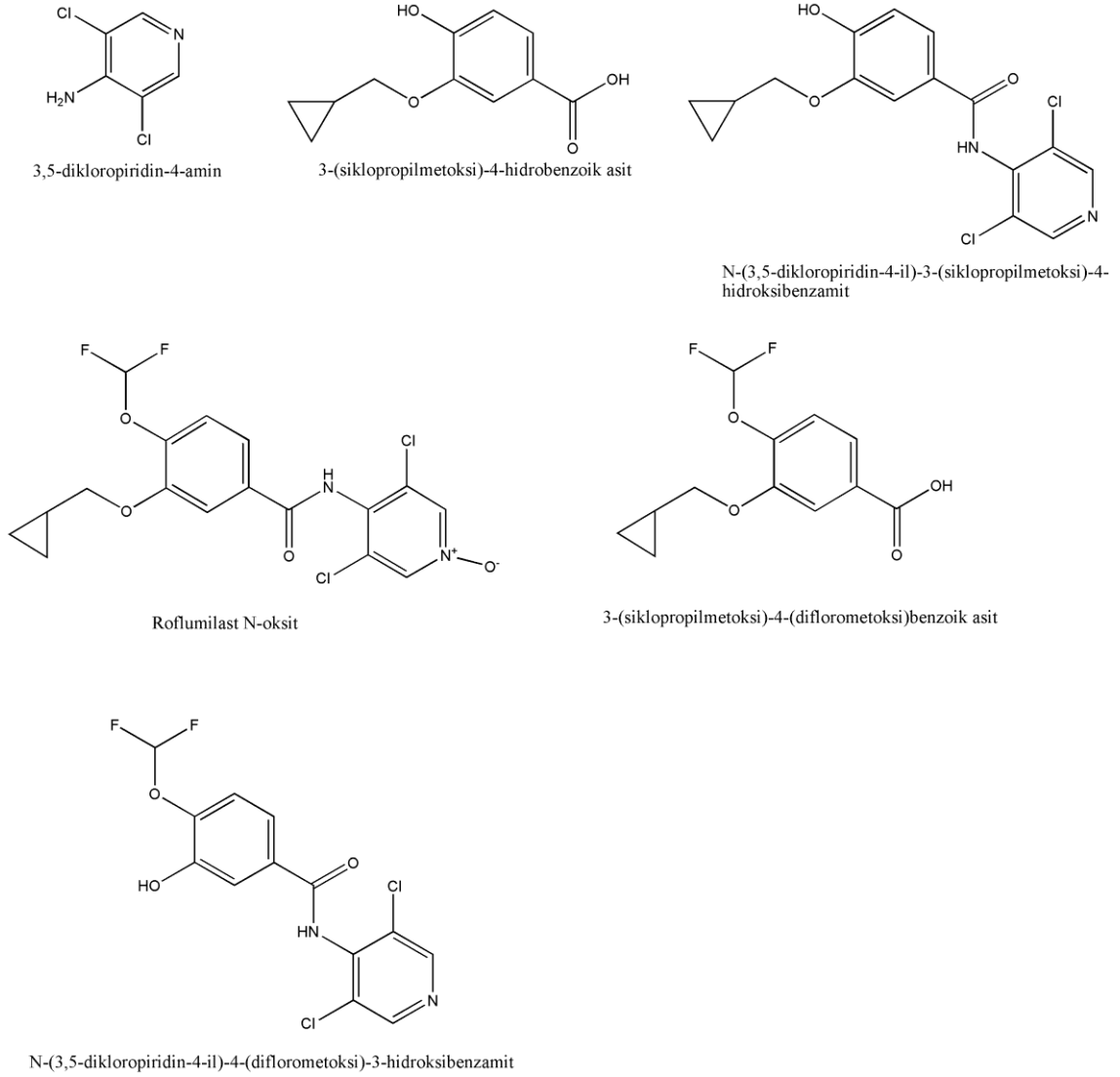
RFL'nin kimyasal adı 3-(siklopropilmetoksi)-N-(3,5-dikloro-4-piridinil)-4-(diflorometoksi) benzamittir (Şekil 2-1). Kapalı formülü  $C_{17}H_{14}Cl_2F_2N_2O_3$  olup molekül ağırlığı 403,21 g/mol'dür (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/roflumilast>).



### 2.4.3. Analiz Yöntemleri

#### 2.4.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizleri

Pinheiro ve ark. (2018) standart maddede RFL ve bozunma ürünlerinin (Şekil 2-3) tayini için tekrarlanabilir bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) metodu geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Ayırma, trietilamin (%0,5 h/h) içeren asetonitril ve amonyum asetat tamponu (5 mM, pH 4,2) çözeltilerinden oluşan hareketli faz ile bir C18 analitik kolon ( $250 \times 4,6$  mm, 5  $\mu$ m) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1,0 mL/dak ve kolon sıcaklığı 25°C olarak ayarlanmıştır. RFL'nin tanımlanması için iki dedektör karşılaştırılmıştır: bir diyot dizili dedektör (DAD) ve bir corona charged aerosol dedektörü. Corona charged aerosol dedektörünün altı bozunma ürününden birini saptayamaması, RP-HPLC ve DAD ile geliştirilen yöntemin RFL analizi için daha uygun olduğunu göstermiştir. Dalga boyu 245 nm'dir. Metodun doğrusal çalışma aralığı RFL için 0,3-0,7 mg/mL aralığında bulunmuştur. Geri kazanım değerleri %99,21 ve %101,63 aralığında hesaplanmıştır. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri ise sırasıyla 0,0051 mg/mL ve 0,0169 mg/mL olarak bulunmuştur. Yöntemin kesinliği için yüzde bağıl standart sapma (RSD) hesaplanmıştır (<%2) (Pinheiro ve ark. 2018).



**Şekil 2- 3: RFL'nin Bozunma Ürünleri (Pinheiro ve ark. 2018)**

Tan (2013) standart maddede RFL, ilgili maddeleri ve bozunma ürünlerinin analizi için bir RP- HPLC yöntemi geliştirmiş ve valide etmiştir. Çalışmada bir Ecosil C18 kolonu (250 × 4,6 mm, 5 µm) ile 48:52 (h/h) oranında bir asetonitril ve 0,005 mol/L amonyum dihidrojen fosfat tamponu içeren bir hareketli faz kullanılmış, akış hızı 1,0 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Dalga boyu 215 nm'dir. Enjeksiyon hacmi 20 µL ve kolon sıcaklığı 30°C'dir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2,6 ng/mL ve 8 ng/mL olarak bulunmuştur (Tan 2013). Tekrarlanabilirlik %RSD cinsinden %6,2 olarak belirlenmiştir. Doğruluk sonuçları verilmemiştir (Tan 2013).

Padma ve ark. (2013) RFL'nin tablet dozaj formunda hızlı analizi için basit, kesin ve doğru bir RP-HPLC yöntemi geliştirmiş ve valide etmiştir. Bu analizde bir C18 kolon

ile metanol ve asetonitrilden oluşan (25:75, h/h) bir hareketli faz kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL, akış hızı 1,0 mL/dk'dır. Ultra viyole (UV) dedektörde dalga boyu 244 nm olarak ayarlanmıştır. Doğruluk çalışmasında geri kazanım değerleri % 98,6-101,6 aralığında hesaplanmıştır. Metodun doğrusal çalışma aralığı 10-100 µg/mL aralığında bulunmuştur. LOD ve LOQ sırasıyla 0,01 µg/mL ve 0,05 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Yöntemin kesinliği için %RSD %2'den düşük bulunmuştur (Padma ve ark. 2013).

Tarek ve ark. (2014) RFL'nin tablet dozaj formunda tayini için stabilite gösteren bir HPLC-DAD yöntemi geliştirmiş ve valide etmiştir. Kromatografik ayırma bir C18 kolonda 0,0065 M amonyum asetat çözeltisi (pH 6,3), metanol ve asetonitrilden oluşan bir hareketli faz (30:35:35, h/h) kullanılarak izokratik elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1,3 mL/dk ve dalga boyu 251 nm olarak ayarlanmıştır. Yöntemin doğrusal aralığı 2,5–200 µg/mL, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,56 µg/mL ve 1,87 µg/mL olarak bulunmuştur. Doğruluk çalışmasında ise geri kazanım değerleri %99,42 ve %101,94 aralığında tayin edilmiştir. Yöntemin kesinliği için RSD yüzdesinin %3,6'yı aşmadığı bulunmuştur. Yöntemin özgünlüğü, ilacın çeşitli tıbbi kategorilerde 20'den fazla farmasötik etken maddeden ayrılması ile doğrulanmıştır (Belal ve ark. 2014).

Shah ve Patel (2014) RFL'nin tablet dozaj formunda tayini için bir RP-HPLC yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Geliştirilen yöntemde hareketli faz asetonitril ve potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 6) (65:35, h/h) karışımı ve akış hızı 1,0 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Yöntem bir C18 kolonda (150 mm x 4,6 mm, 5µm) ve 250 nm dalga boyunda geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin doğrusal aralığı 20-50 µg/mL, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,086 µg/mL ve 0,2565 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Doğruluk çalışmasında ise geri kazanım değerleri %98,00 ve %100,43 aralığındadır. Yöntemin kesinliği için RSD yüzdesi %2'den düşük bulunmuştur (Shah ve Patel 2014).

Barhate ve Deosthalee (2010) hidroliz, oksidasyon, termal ve fotoliz koşulları altında RFL'nin bozundurma çalışmalarını gerçekleştirmiş ve bozunma ürünleri yanında RFL tayini için bir HPLC yöntemi geliştirip valide etmişlerdir. Kromatografik ayırma, bir Zorbax SB C18 kolon (50 mm×4,6 mm, 1,8 µm) ile 0,005 M amonyum format tamponu (pH 3,5) ve asetonitril içeren hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 0,5 mL/dakika akış hızında bir gradient elüsyon programı kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C, enjeksiyon hacmi 3 µL, UV dedektör dalga boyu 215 nm olarak belirlenmiştir. Doğrusal aralık 15-225 µg/mL'dir. RFL için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,02 ve

0,065 µg/mL olarak bulunmuştur. Metodun doğruluk ve kesinlik sonuçları verilmemiştir (Barhate ve Deosthalee 2010).

RFL'nin tablet formülasyon ve standart maddede tayini için kullanılan HPLC yöntemleri Tablo 2.2'de özet olarak verildi.

#### 2.4.3.2. Spektrofotometrik Analizleri

Patel ve ark. (2013) tablet formülasyonunda RFL'nin kantitatif tayini için basit ve tekrarlanabilir bir UV-spektrofotometrik yöntem geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Doğrusallık, kesinlik ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. RFL'nin 248 nm'de maksimum absorpsiyon yaptığı belirlenmiştir. Analitik kalibrasyon eğrisinin 1-30 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu saptanmıştır. Geliştirilen yöntem doğrudan farmasötik tablet preparatlarının analizine uygulanmış ve %RSD değeri 0,166 olarak bulunmuştur. Geri kazanım değerleri %98,0 ve %102,0 aralığında bulunmuştur. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,0907 ve 0,275 µg/mL'dir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu önerilen yöntemin tablet formülasyonunda RFL'nin güvenilir bir şekilde tayin edilmesine uygun olduğu belirlenmiştir (Patel ve ark. 2013).

Atmaca ve Süslü (2016) farmasötik formülasyonlarda RFL'nin tayini için basit, hızlı ve güvenilir bir birinci derece türev spektrofotometrisi yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. İlacın kantitatif tayini, 190-350 nm dalga boyu aralığında 220 nm'de (n = 4) ölçülen birinci türev değerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Önerilen yöntem için doğrusal kalibrasyon aralığı 0,75-35,00 µg/mL olarak saptanmıştır. LOD ve LOQ değerleri, sırasıyla 0,03 ve 0,08 µg/mL olarak bulunmuştur. Aynı gün içinde ve farklı günler arasında yapılan çalışmaların RSD değerleri %0,68-2,18 arasında bulunmuştur. Geri kazanım değerleri %99,53-101,72 aralığında bulunmuştur (Atmaca ve Süslü 2016).

Ladani ve ark. (2012) tablet formülasyonunda RFL'nin kantitatif tayini için basit ve tekrarlanabilir bir UV-spektrofotometrik yöntem geliştirmiş ve valide etmiştir. Maksimum dalga boyu 250 nm olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi 2-35 µg/mL aralığında doğrusaldır. %RSD'nin 0,3'ten düşük olduğu saptanmıştır. Sistemin doğruluğu saptanmış ve geri kazanım değerleri %98,1-102 arasında bulunmuştur. LOD 0,04 µg/mL ve LOQ 0,12 µg/mL olarak saptanmıştır. Önerilen yöntemin, tablet formülasyonunda RFL'nin güvenilir bir şekilde tayini için kullanılabilir olduğu sonucuna varılmıştır (Ladani ve ark. 2012).

RFL'nin tablet formülasyonlarda tayini için kullanılan spektrofotometrik yöntemler Tablo 2.2'de özet olarak verildi.

#### **2.4.3.3. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) ile Analizleri**

Ushma ve Paresh (2016) sentetik karışımda RFL ve salmeterolün yan yana tayini için basit, hassas ve hızlı bir yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Bu analizde toluen:asetonitril:triethylamin (6:3:1, h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır. Noktaların tespiti absorpsiyon modunda 254 nm'de bir UV dedektörü kullanılarak dansitometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Yöntem doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve özgünlük parametreleri açısından valide edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri RFL ve salmeterol için sırası ile 200-1400 ng/nokta ve 100-700 ng/nokta konsantrasyon aralıklarında çizilmiştir. Geri kazanım değerleri %98,48-101,3 aralığında bulunmuştur. LOD ve LOQ değerlerinin RFL için sırasıyla 11,74 ve 35,58 ng/nokta ve salmeterol için ise sırasıyla 8,96 ve 27,14 ng/nokta olduğu hesaplanmıştır. Yöntemin kesinliği için RSD yüzdesi %2'den düşük bulunmuştur (Ushma ve Paresh 2016).

Suganthi ve ark. (2017) tabletlerde RFL tayini için bir HPTLC yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Hareketli faz olarak toluen:etil asetat (7:33, h/h) kullanılmış ve silika jel 60F254 ince tabaka kromatografisi plakaları üzerinde RFL'nin  $R_f$  değeri  $0,54 \pm 0,02$  olarak saptanmıştır. Dedeksiyon 254 nm'de gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde RFL için doğrusal aralık 0,6-2,6 µg/nokta olarak tespit edilmiş, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,444 ng/nokta ve 4,377 ng/nokta olarak bulunmuştur. İlacın tablet formülasyonundan geri kazanım yüzdesi standart ekleme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. RSD'nin %2'den az olduğu bulunmuştur (Suganthi ve ark. 2017).

RFL'nin tablet formülasyon ve standart maddede tayini için kullanılan HPTLC yöntemleri Tablo 2.2'de özet olarak verildi.

#### **2.4.3.4. Kapiler Elektroferez ile Analizleri**

Güray (2019), RFL'nin tablette tayini için UV dedeksiyonlu bir kapiler elektroferez yöntemi geliştirmiş ve valide etmiştir (Tablo 2.2). Ayırma işlemi bir fused-silika kapiler kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elektrolit çözeltisi olarak %15 (h/h) metanol içeren 20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  tamponu (pH 9,5) kullanılmıştır. 20 kV'luk bir

potansiyel uygulanmıştır. Geliştirilen yöntemin 0,75-15 µg/mL aralığında doğrusal olduğu belirtilmiştir. LOQ ve LOD değerleri sırasıyla 0,074 µg/mL ve 0,022 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Kesinlik için günler arası RSD yüzdesi %0,78 ve geri kazanım değerleri %98,63-100,97 arasında bulunmuştur. Bu çalışma kapiler elektroforez kullanılarak Daxas® katı dozaj formunda RFL tayini için ilk rapordur. Valide edilen yöntemin düşük numune ve organik çözücü hacmi, yüksek verim ve rezolüsyon gibi avantajlar ile birlikte hızlı, ucuz ve kolay uygulanabilir olduğu belirtilmiştir (Güray 2019).



Tablo 2- 2: RFL'nin Tayin Yöntemleri

| HPLC yöntemleri                            |                                                                                    |                     |                    |                     |                                                 |                            |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-------------------------------------------------|----------------------------|
| Kolon                                      | Hareketli faz                                                                      | Dedektör dalga boyu | Akış hızı (mL/dak) | Kalibrasyon aralığı | Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) | Kaynak                     |
| C18(250 × 4,6 mm, 5 µm)                    | Trietilamin (0,5% h/h) içeren asetonitril ve amonyum asetat tamponu (5 mM, pH 4,2) | 245nm               | 1,0                | 0,3-0,7 mg/mL       | LOD: 0,0051 mg/mL<br>LOQ: 0,0169 mg/mL          | Pinheiro ve ark. 2018      |
| C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm)                   | Asetonitril ve 0,005 mol/L amonyum dihidrojen fosfat tamponu (48:52 h/h)           | 215 nm              | 1,0                | -                   | LOD: 2,6 ng/mL<br>LOQ: 8 ng/mL                  | Tan 2013                   |
| C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm)                   | Metanol ve asetonitril (25:75, h/h)                                                | 244 nm              | 1,0                | 10-100 µg/mL        | LOD: 0,01 µg/mL<br>LOQ: 0,05 µg/mL              | Padma ve ark. 2013         |
| C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm)                   | 0,0065 M Amonyum asetat (pH 6,3), metanol ve asetonitril (30:35:35, h/h)           | 251 nm              | 1,3                | 2,5–200 µg/mL       | LOD: 0,56 µg/mL<br>LOQ: 1,87 µg/mL              | Belal ve ark. 2014         |
| C18 ACE (150 mm x 4,6 mm, 5µm)             | Asetonitril ve potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 6) (65:35, h/h)              | 250 nm              | 1,0                | 20-50 µg/mL         | LOD: 0,086 µg/mL<br>LOQ: 0,2565 µg/mL           | Shah ve Patel 2014         |
| Zorbax SB C18 kolon (50 mm×4,6 mm, 1,8 µm) | 0,005 M Amonyum format tampon (pH 3,5) ve asetonitril                              | 215 nm              | 0,5                | 15 – 225 µg/mL      | LOD: 0,02 µg/mL<br>LOQ: 0,065 µg/mL             | Barhate ve Deosthalee 2010 |

Tablo 2.2 - devam

| Spektrofotometrik yöntemler |                                                                                                          |        |   |                                                                            |                                                                                                                        |                       |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| -                           | -                                                                                                        | 248 nm | - | 1-30 µg/mL                                                                 | LOD: 0,0907 µg/mL<br>LOQ: 0,275 µg/mL                                                                                  | Patel ve ark. 2013    |
| -                           | -                                                                                                        | 220 nm | - | 0,75-35,00 µg/mL                                                           | LOD: 0,03 µg/mL<br>LOQ: 0,08 µg/mL                                                                                     | Atmaca ve Süslü 2016  |
| -                           | -                                                                                                        | 250 nm | - | 2-35 µg/mL                                                                 | LOD: 0,04 µg/mL<br>LOQ: 0,12 µg/mL                                                                                     | Ladani ve ark. 2012   |
| HPTLC yöntemleri            |                                                                                                          |        |   |                                                                            |                                                                                                                        |                       |
| Silika jel 60F254           | Toluen:asetonitril:trietaamin<br>(6:3:1, h/h)                                                            | 254 nm | - | Roflumilast:<br>200-1400<br>ng/nokta<br>Salmeterol:<br>100-700<br>ng/nokta | Roflumilast:<br>LOD: 11,74 ng/nokta<br>LOQ: 35,58 ng/nokta<br>Salmeterol:<br>LOD: 8,96 ng/nokta<br>LOQ: 27,14 ng/nokta | Ushma ve Pareshe 2016 |
| Silika jel 60F254           | Toluen:etil asetat (7:33, h/h)                                                                           | 254 nm | - | 0,6-2,6<br>µg/nokta                                                        | LOD: 1,444 ng/nokta<br>LOQ: 4,377 ng/nokta                                                                             | Suganthi ve ark. 2017 |
| CZE yöntemi                 |                                                                                                          |        |   |                                                                            |                                                                                                                        |                       |
| Fused-silika kapiler kolon  | Metanol içeren (%15, h/h)<br>20 mmol/L Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub><br>tamponu (pH 9,5) | 200 nm | - | 0,75-15<br>µg/mL                                                           | LOD: 0,074 µg/mL<br>LOQ: 0,022 µg/mL                                                                                   | Güray 2019            |

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Analizin Yapıldığı Yer

Bu yüksek lisans tezi çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında 2019-2020 yıllarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

##### 3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Analiz sürecinde kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler Tablo 3-1’de verilmiştir:

**Tablo 3- 1: Kimyasallar Maddeler ve Çözücüler**

| Kimyasallar maddeler ve çözücüler | Tedarikçi firma bilgileri             |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Roflumilast (RFL)                 | Abdi İbrahim İlaç (İstanbul, Türkiye) |
| Irbesartan (IRB)                  | Abdi İbrahim İlaç (İstanbul, Türkiye) |
| MeOH (HPLC saflığında)            | Isolab (Eschau, Germany)              |
| Asetonitril (HPLC saflığında)     | Isolab (Eschau, Germany)              |
| Ultra saf su (HPLC saflığında)    | ELGA-VEOLIA, PureLab Option           |
| Ortofosforik asit (OPA)           | Merck (Darmstadt, Germany)            |
| Formik asit                       | Merck (Darmstadt, Germany)            |
| DAXAS® tablet (500 µg RFL)        | Eczane (İstanbul, Türkiye)            |

##### 3.2.2. Çözeltiler

###### 3.2.2.1. Hareketli Faz Çözeltisi

Hareketli faz olarak, %0,08’lik OPA çözeltisi (suda) ve MeOH (20:80, h/h) içeren bir çözelti kullanıldı. Analiz öncesinde hareketli faz ultrasonik banyoda degaze edildi.

###### 3.2.2.2. RFL ve IRB Çözeltileri

Stok çözeltilerin (100 µg/mL) hazırlanması için 2,5 mg RFL ve 2,5 mg IRB ayrı ayrı tartıldı, 25 mL’lik balon jojelerde metanol (HPLC saflığında) ile çözülüp hacmine

tamamlandı. Analiz öncesi günlük olarak stok çözeltilerin hareketli fazla seyreltilmesiyle gereken konsantrasyonlardaki standart çözeltiler hazırlandı.

### 3.3. Cihaz ve Gereçler

1. HPLC Cihazı (Shimadzu LC-20A, Kyoto, Japan)
  - RF-20A Dedektör
  - LC-20AT Pompa Ünitesi
  - DGU-2015 Gaz Giderici Ünite
  - CTO-10ASVP Kolon Fırını
  - SIL-20AHT Otomatik Numune Örnekleyici
  - C18 Analitik Kolon (Intersil ODS-3, 250 × 4,6 mm, 5 µm ID)
2. Yazılımlar
  - MS Office Word Programı
  - MS Office Excel Programı
3. Hassas Terazı (OHAUS Adventurer)
4. Ultrasonik Banyo (WiseClean, Wisd)
5. Ultra Saf Su Cihazı (ELGA-VEOLIA, PureLab Option-Q DV 25)
6. pH Metre (markası) (Thermo, Orion 3 Star)
7. Otomatik Pipetler (Eppendorf, 1-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL)
8. Şırınga Ucu Filtre (Macherey-Nagel, Chromafil Xtra PTFE-20/25 ve GF/PET-45/25)
9. Enjektör (Set Inject, 20 mL)
10. Balonjojeler (5, 10, 25, 50 mL), Cam Vial, Kapak, Septum (Isolab)
11. Mezür (500, 1000 mL) (Isolab)
12. Beher (25, 50 mL) (Isolab)
13. Hesap Makinesi (Casio Fx-95 ms)

### 3.4. RFL'nin HPLC-FD ile Miktar Tayini için Yöntem Koşullarının Belirlenmesi

Analizler floresans dedektörlü (FD) bir Shimadzu LC20AT HPLC cihazı (RF20A) ile yapıldı. İlk önce hareketli faz, kolon, hareketli fazın akış hızı, kolon sıcaklığı, dedektör dalga boyları gibi kromatografik parametreler belirlendi. İç standart yöntemi ile çalışıldı. İç standardın seçilmesi için farklı maddeler ile denemeler gerçekleştirildi. Tayin

edilen parametreler kapsamında geliştirilen yöntem RFL'nin tabletlerdeki analizine uygulandı.

#### **3.4.1. Kromatografik Parametrelerin Seçimi**

Literatür taramaları sonucu RFL'in HPLC ile yapılan analizlerinde genellikle C18 kolonların kullanıldığı tespit edildi. Su, metanol, asetonitril, OPA ve formik asidin farklı oranlarda karışımlarından oluşan çeşitli hareketli faz sistemleri kullanılarak gradient ve izokratik elüsyon ile denemeler yapıldı. Dedektör dalga boylarının seçimi için RFL'nin hareketli fazda 200-400 nm aralığında eksitasyon ve emisyon spektrumları alındı. Sonuçlar 4.1.1.'de verildi.

#### **3.4.2. İç Standardın Seçilmesi**

Analiz sürecinde ortaya çıkabilecek sorunları minimuma indirmek amacıyla iç standart yöntemi ile çalışıldı. Olmesartan, IRB, amlodipin gibi RFL ile aynı koşullarda analizi gerçekleştirilebilecek maddeler ile denemeler gerçekleştirildi. Rezolüsyon, dedektör yanıtı gibi parametreler göz önünde bulundurularak iç standart seçildi. Elde edilen sonuçlar 4.1.2.'de verildi.

#### **3.4.3. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması**

Ölçü eğrisinin hazırlanmasında kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması için 100 µg/mL'lik stok RFL çözeltisinden 125, 250, 375, 500, 625, 750 ve 1000 µL hacimdeki çözeltiler ayrı ayrı 10 mL'lik balon jojelere transfer edildi. Her bir balon jojeye 250 µL 100 µg/mL'lik stok iç standart çözeltisi eklendi. Son olarak hacimler MeOH ile 10 mL'ye tamamlandı. Analiz öncesi çözeltilerden 500 µL alınarak HPLC viallerine aktarıldı. HPLC sistemine 20 µL enjeksiyon yapıldı. Her bir analiz 3 farklı günde 3 tekrarla gerçekleştirildi. Elde edilen RFL pik alanları iç standart pik alanlarıyla oranlanarak ölçü eğrileri hazırlandı. Sonuçlar 4.1.3'de verildi.

#### **3.4.4. Tabletten Ekstraksiyon**

Tablet çözeltisinin hazırlanması için, on adet DAXAS® tableti ayrı ayrı tartıldı ve ortalama tablet ağırlığı hesaplandı (0,2660 g). Daha sonra tabletler bir porselen havanda öğütüldü ve ortalama tablet ağırlığına eşit miktarda tablet tozu 100 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı. Sonrasında 60 mL MeOH ve 2,50 mL IRB stok çözeltisi ilave edildi ve çözelti 30 dakika boyunca bir ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim, MeOH ile 100 mL'ye tamamlandı. Sonuç olarak, RFL ve IRB konsantrasyonları sırasıyla 5,00 µg/mL

ve 2,50 µg/mL olan tablet çözeltisi elde edildi. Standart katılmış tablet çözeltileri, hacmin MeOH ile 100 mL'ye tamamlanması aşamasından önce çözeltiye 1,00; 2,50 ve 5,00 mL stok RFL çözeltisi ilave edilerek hazırlandı. Tüm çözeltiler, HPLC-FD sistemine enjeksiyondan önce 0,45 µm'lik şırınga ucu filtreden süzüldü.

### 3.5. Geliştirilen Yöntemin Validasyon Parametreleri

Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmaları ICH kılavuzu Q2 (R1)'e göre yapıldı (ICH, 2005).

#### 3.5.1. Seçicilik (Özgünlük)

Bir analitik yöntemin seçiciliği, fiziksel ya da kimyasal girişimler varlığında analizi yapılacak maddenin/maddelerin doğru olarak değerlendirilebilmesi yeteneğidir.

Geliştirilen yöntemin seçiciliğini kontrol etmek için RFL ve IRB içermeyen hareketli faz çözeltisinin enjeksiyonu yapıldı. Sonuçlar Bölüm 4.2.1.'de verildi.

#### 3.5.2. Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, belirli bir aralıkta örnekteki analit konsantrasyonu ile doğru orantılı yanıt verme yeteneğidir.

Geliştirilen yöntemin doğrusallığı belirlenirken determinasyon katsayısı ( $R^2$ ), ölçü eğrisinin y eksenini kestiği nokta ve ölçü eğrisinin eğimi incelendi. Ölçü eğrisinin denklemi ve  $R^2$  değeri, en küçük kareler yöntemine dayanan doğrusal regresyon analizi kullanılarak hesaplandı. Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı gibi 1,25-10,0 µg/mL aralığında 7 farklı konsantrasyonda çalışıldı. Üç farklı günde 3 tekrar ile gerçekleştirilen analizlerde RFL pik alanlarının iç standart pik alanlarına oranları bulundu. Pik alanları oranına karşı konsantrasyona grafiği çizildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.2'de verildi.

#### 3.5.3. Uygunluk Parametreleri

Uygunluk parametrelerinden alıkonma süresi ( $t_R$ ), ayırma gücü ( $R_s$ ), kuyruklanma faktörü (T), alıkonma faktörü ( $k'$ ), teorik plaka sayısı (N) ve teorik plaka eşdeğer yüksekliği (HETP) değerlendirildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.3'te verildi.

#### 3.5.4. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen sonuçların gerçek ya da gerçek kabul edilen değere olan yakınlığıdır.

Geliştirilen yöntemin doğruluğu önce 3 farklı konsantrasyondaki (1,25; 5,00 ve 10,00 µg/mL) standart çözeltilerin analiz sonuçları ile bağlı ortalama hata (%) (% RME) olarak hesaplandı. Daha sonra tablet çözeltisi ve 3 farklı konsantrasyonda (1,00; 2,50 ve 5,00 µg/mL) RFL katılmış tablet çözeltileri ile çalışıldı. Geri kazanım (%) değerleri hesaplandı. Sonuçlar 4.2.4'te verildi.

### 3.5.5. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, belirli analiz koşulları altında analitin tekrarlı analizlerinden elde edilen sonuçların birbirine yakınlığıdır. Kesinlik genellikle standart sapma (SD) ve/veya bağlı standart sapma (RSD) olarak ifade edilir.

Geliştirilen yöntemin kesinliği 1,25; 5,00 ve 10,00 µg/mL'lik standart çözeltiler ve 3 farklı konsantrasyonda (1,00; 2,50 ve 5,00 µg/mL) RFL katılmış tablet çözeltileri ile tekrarlanabilirlik (gün içi) ve ara kesinlik (gün arası) olarak incelendi. Sonuçlar SD ve %RSD cinsinden hesaplandı. Tekrarlanabilirlik, aynı günde 3 kez tekrarlanan, ara kesinlik ise 3 farklı günde 3 kez tekrarlanan analizlerin verileri ile belirlendi. Sonuçlar 4.2.4'te verildi.

### 3.5.6. Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Bir analitik yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD), analitin örnek içinde kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile tespit edilebildiği en düşük konsantrasyondur.

Geliştirilen yöntemin LOD değeri aşağıdaki formülle hesaplandı ve sonuç 4.2.5'te verildi:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

S = Ölçü eğrisinin eğimi,  $\sigma$  = Eğrinin y eksenini kestiği noktanın standart sapması

### 3.5.7. Tayin Sınırı (LOQ)

Bir analitik yöntemin tayin sınırı (LOQ) analitin örnek içinde kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile kantitatif tayinin yapılabildiği en düşük konsantrasyonudur.

Geliştirilen yöntemin LOQ değeri aşağıdaki formülle hesaplandı ve sonuç 4.2.6'da verildi:

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

S = Ölçü eğrisinin eğimi,  $\sigma$  = Eğrinin y eksenini kestiği noktanın standart sapması

### 3.5.8. Sağlamlık

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, yöntem parametrelerindeki küçük değişimlerden etkilenmeden kalabilme yeteneğidir.

Geliştirilen yöntemin sağlamlığı akış hızı, hareketli faz bileşimi ve kolon sıcaklığı parametreleri incelenerek belirlendi. Akış hızı  $\pm 0,1$ , hareketli faz bileşimi ve kolon sıcaklığı değerleri ise  $\pm 1$  birim değiştirildi. Tüm koşullar altında tablet çözeltisi analizleri gerçekleştirildi. Sonuçlar %RME cinsinden Bölüm 4.2.7’de verildi.

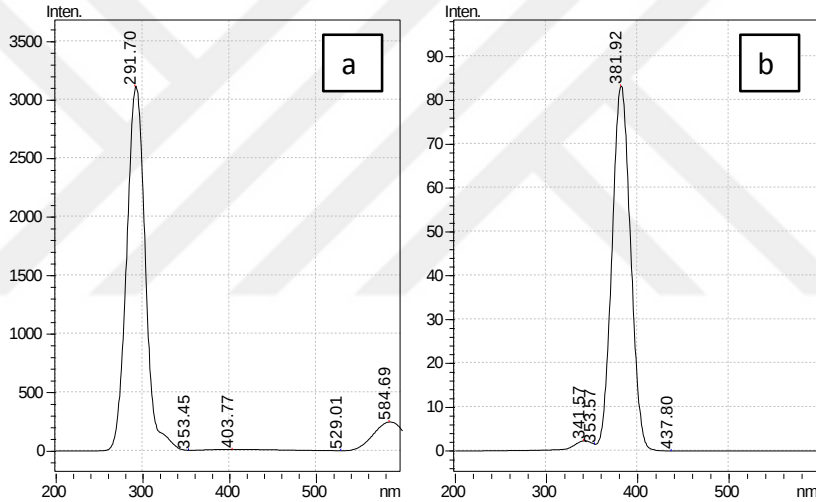


## 4. BULGULAR

### 4.1. RFL'nin HPLC-FD ile Miktar Tayini için Geliştirilen Yöntemin Koşulları

#### 4.1.1. Kromatografik Parametreler

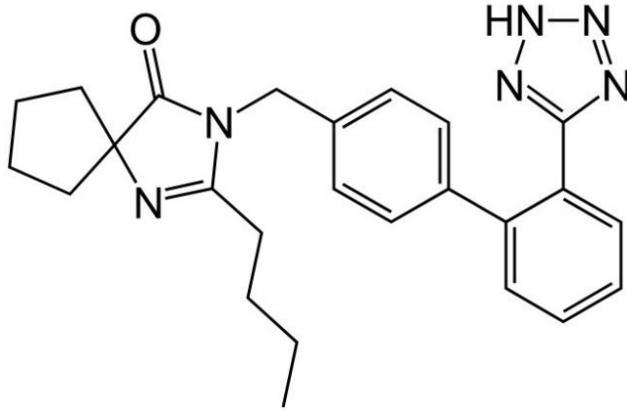
Analizler için boyutları  $250 \times 4,6$  mm, tanecik boyutu 5  $\mu$ m olan bir C18 analitik kolon kullanıldı ve ayırmalar 40°C'de gerçekleştirildi. Sistem uygunluk parametreleri dikkate alınarak %20 sulu OPA çözeltisi (%0,08) ve %80 MeOH'den oluşan bir hareketli faz ile izokratik elüsyon uygulandı. Hareketli fazın pH değerini RFL'nin pKa değerinin altında tutmak için mobil faza OPA dahil edildi. RFL'nin eksitasyon ve emisyon dalga boyları ilgili floresans spektrumlarının yardımı ile sırasıyla 290 ve 380 nm'de olarak belirlendi (Şekil 4-1). Akış hızı 1,0 mL/dak ve enjeksiyon hacmi 20  $\mu$ L olarak ayarlandı.



Şekil 4- 1: RFL'nin Absorpsiyon (a) ve Emisyon (b) Spektrumları

#### 4.1.2. İç Standardın Seçilmesi

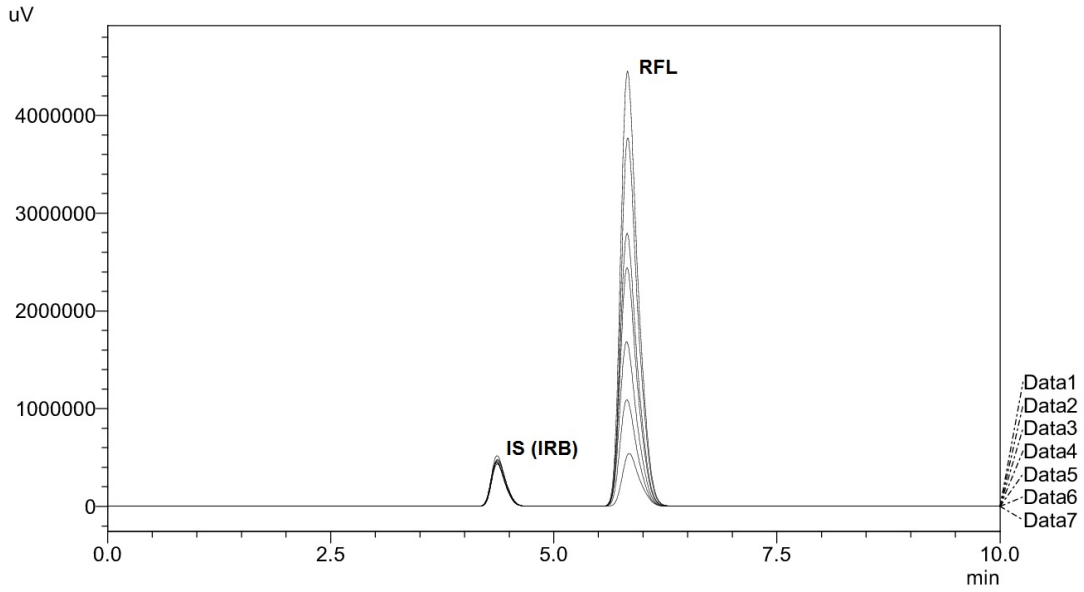
İç standardın seçilmesinde pek çok farklı madde ile denemeler gerçekleştirildi. En iyi rezolüsyon sonuçları bir anjiyotensin II reseptör antagonisti olan IRB ile elde edildi. Belirlenen kromatografik koşullar ile IRB analizinde stabil veriler elde edildi. Bu sebeplerle iç standart olarak kapalı kimyasal formülü  $C_{25}H_{28}N_6$  olan IRB tercih edildi (Şekil 4-2).



**Şekil 4- 2: IRB'nin Kimyasal Yapısı**

#### 4.1.3. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Ölçü eğrisinin hazırlanmasında Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı üzere her biri 2,50 µg/mL IRB ve 1,25; 2,50; 3,75; 5,00; 6,25; 7,50 ve 10,00 µg/mL RFL içeren standart çözeltiler ile 3 farklı günde 3 tekrarlı çalışıldı. Standart çözeltilere ait kromatogramlar Şekil 4-3'te verildi.



**Şekil 4- 3: Ölçü Eğrisinin Hazırlanmasında Kullanılan Standart Çözeltilere Ait Kromatogramlar**

Her bir konsantrasyonun elde edilen pik alanları iç standardın pik alanlarına oranlandı. Ölçü eğrisi, pik alanları oranına karşı konsantrasyon grafiği çizilerek hazırlandı.

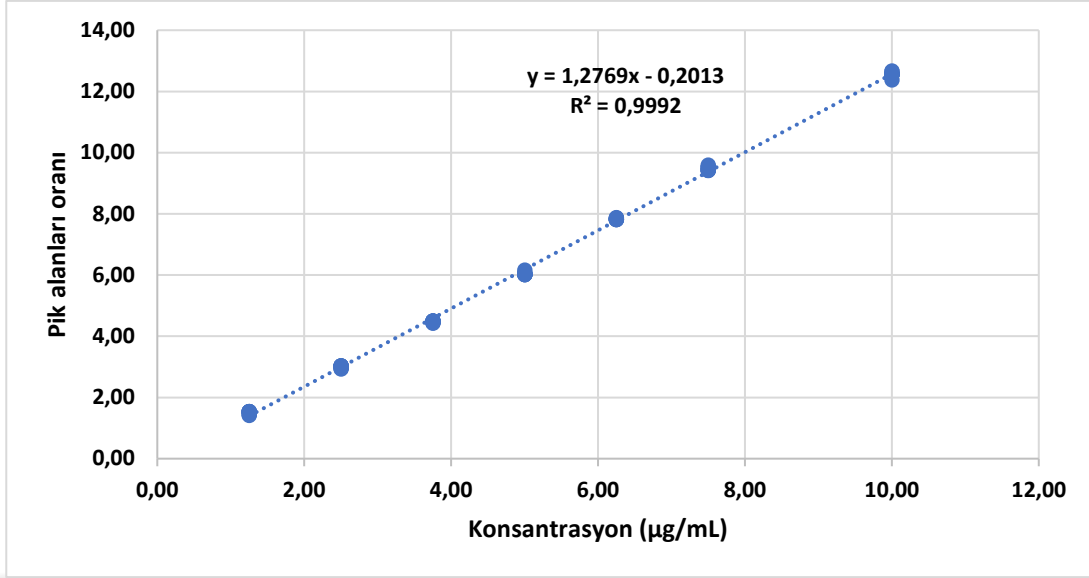
Pik alanları oranları ve ortalamaları ( $\bar{A}$ ), SD, ve %RSD değerleri Tablo 4-1’de verildi. Tablo 4-2’de tüm pik alanları oranları kullanılarak elde edilen regresyon analizi sonuçları verildi. Şekil 4-4’de RFL’nin 1,25-10,0  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi gösterildi.

**Tablo 4- 1: Ölçü Eğrisi Verileri**

|           | C ( $\mu\text{g/mL}$ )    |                           |                           |                           |                           |                           |                            |
|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
|           | 1,25                      | 2,50                      | 3,75                      | 5,00                      | 6,25                      | 7,50                      | 10,00                      |
|           | $A_{1,25}/A_{\text{IRB}}$ | $A_{2,50}/A_{\text{IRB}}$ | $A_{3,75}/A_{\text{IRB}}$ | $A_{5,00}/A_{\text{IRB}}$ | $A_{6,25}/A_{\text{IRB}}$ | $A_{7,50}/A_{\text{IRB}}$ | $A_{10,00}/A_{\text{IRB}}$ |
| Analiz-1  | 1,41                      | 2,92                      | 4,43                      | 6,16                      | 7,84                      | 9,52                      | 12,64                      |
| Analiz-2  | 1,44                      | 2,95                      | 4,45                      | 6,02                      | 7,86                      | 9,51                      | 12,37                      |
| Analiz-3  | 1,46                      | 2,97                      | 4,46                      | 6,08                      | 7,88                      | 9,53                      | 12,67                      |
| Analiz-4  | 1,54                      | 3,03                      | 4,49                      | 6,01                      | 7,81                      | 9,59                      | 12,57                      |
| Analiz-5  | 1,54                      | 3,03                      | 4,49                      | 6,01                      | 7,82                      | 9,42                      | 12,56                      |
| Analiz-6  | 1,53                      | 3,02                      | 4,49                      | 6,01                      | 7,81                      | 9,44                      | 12,56                      |
| Analiz-7  | 1,53                      | 3,02                      | 4,49                      | 6,02                      | 7,82                      | 9,42                      | 12,55                      |
| Analiz-8  | 1,53                      | 3,02                      | 4,49                      | 6,01                      | 7,82                      | 9,42                      | 12,55                      |
| Analiz-9  | 1,53                      | 3,02                      | 4,49                      | 6,03                      | 7,82                      | 9,42                      | 12,55                      |
| $\bar{A}$ | 1,50                      | 3,00                      | 4,47                      | 6,04                      | 7,83                      | 9,47                      | 12,56                      |
| SD        | 0,05                      | 0,04                      | 0,03                      | 0,05                      | 0,02                      | 0,07                      | 0,08                       |
| RSD (%)   | 3,33                      | 1,33                      | 0,67                      | 0,83                      | 0,26                      | 0,74                      | 0,64                       |

**Tablo 4- 2: Regresyon Analizi Sonuçları**

|                                                              |         |
|--------------------------------------------------------------|---------|
| <b>Eğrinin y ekseninin kestiği nokta</b>                     | -0,2013 |
| <b>Eğrinin y ekseninin kestiği noktanın standart sapması</b> | 0,0278  |
| <b>Eğrinin eğimi</b>                                         | 1,2769  |
| <b>Eğimin standart sapması</b>                               | 0,0047  |
| <b>Determinasyon katsayısı (<math>R^2</math>)</b>            | 0,9992  |

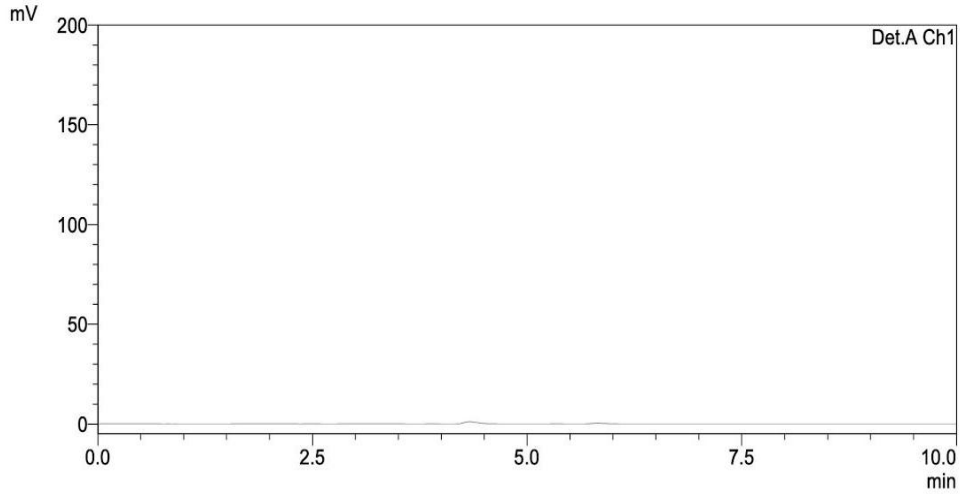


Şekil 4- 4: RFL'nin 1,25-10,0 µg/mL Konsantrasyon Aralığında Hazırlanan Ölçü Eğrisi

## 4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyon Sonuçları

### 4.2.1. Seçicilik

Hareketli fazın enjeksiyonu, optimize edilmiş kromatografik koşullar altında herhangi bir girişim etkisi olmadığını gösterdi (Şekil 4-5).



Şekil 4- 5: Hareketli Fazın HPLC-FD Kromatogramı

### 4.2.2. Doğrusallık

Geliştirilen yöntem ile hazırlanan 7 noktalı ölçü eğrisi (Şekil 4-4) ve regresyon analizi ile RFL için 1,25-10,00 µg/mL aralığında doğrusal olduğu belirlendi. Regresyon

verileri sonucu  $R^2$  değeri 0,9992 bulundu. RFL'nin regresyon analizi verileri tablo 4-2'de verildi.

#### 4.2.3. Uygunluk Parametreleri

Uygunluk parametreleri sonuçları Tablo 4-3'te verildi. Kuyruklanma faktörü değerlerinin 1,5'in altında, ayırma gücünün ise 2'nin üstünde olduğu belirlendi.

**Tablo 4- 3:** Uygunluk Parametreleri\*

| Analit | $t_R$ (dk)  | Kuyruklanma faktörü (t) | Ayırma gücü ( $R_s$ ) | Alıkonma faktörü ( $k'$ ) | Teorik plaka sayısı (N) | Teorik plaka eşdeğer yüksekliği (HETP) |
|--------|-------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------------------|
| IRB    | 4,359±0,001 | 1,242±0,014             | -                     | 4,812±0,001               | 3272±50                 | 45,86±0,70                             |
| RFL    | 5,801±0,002 | 1,270±0,002             | 4,075±0,014           | 6,094±0,051               | 3321±12                 | 45,17±0,16                             |

\*5,00 µg/mL RFL ve 2,50 µg/mL IRB içeren standart çözelti için (n=3)

#### 4.2.4. Doğruluk ve Kesinlik

Geliştirilen yöntemin doğruluğu ve kesinliği önce 1,25; 5,00 ve 10,00 µg/mL'lık standart çözeltiler ile incelendi.

Doğruluk çalışmalarında tüm analizler 3 kez tekrar edildi. Sonuçlar %RME olarak hesaplandı ve değerlerin %-0,58-0,84 aralığında olduğu tespit edildi.

Kesinlik, tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik olarak SD ve %RSD cinsinden hesaplandı. Tekrarlanabilirlik çalışmaları aynı gün içinde 3 tekrarlı analizler ile, ara kesinlik ise 3 farklı günde 3 tekrarlı analizler ile gerçekleştirildi. Tüm %RSD değerleri %2'den düşük bulundu.

Standart çözeltiler ile gerçekleştirilen doğruluk ve kesinlik çalışmalarının sonuçları Tablo 4-4'te verildi.

**Tablo 4- 4:** Standart Çözeltiler ile Gerçekleştirilen Doğruluk ve Kesinlik Çalışmalarının Sonuçları

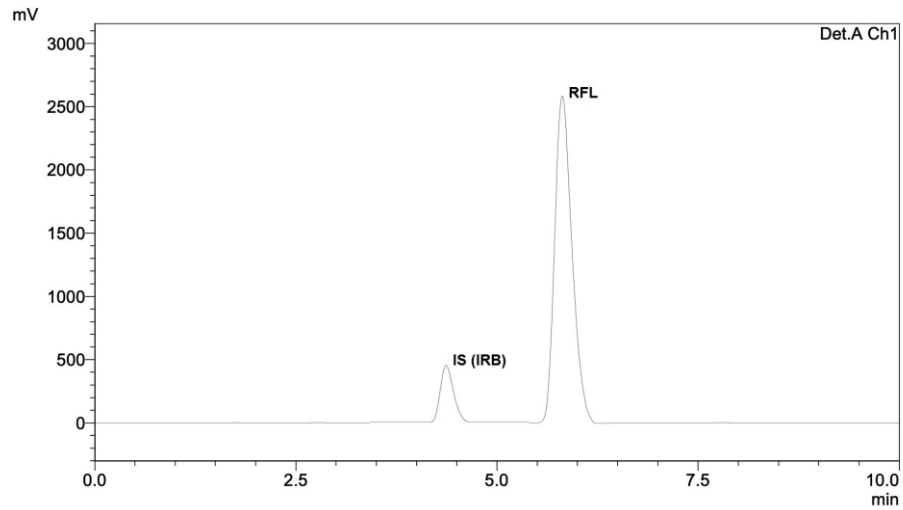
|                       | Konsantrasyon<br>(µg/mL) | Bulunan konsantrasyon<br>(µg/mL) ± SD | RME<br>(%) | RSD<br>(%) |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------------------|------------|------------|
| <b>Gün içi*</b>       | 1,25                     | 1,25±0,01                             | -0,22      | 0,71       |
|                       | 5,00                     | 5,04±0,02                             | 0,84       | 0,38       |
|                       | 10,00                    | 10,06±0,01                            | 0,61       | 0,14       |
| <b>Günler arası**</b> | 1,25                     | 1,24±0,01                             | -0,58      | 0,96       |
|                       | 5,00                     | 5,03±0,02                             | 0,61       | 0,49       |
|                       | 10,00                    | 10,05±0,01                            | 0,54       | 0,10       |

\*aynı gün içinde 3 tekrarlı analiz sonuçları

\*\*farklı 3 günde 3 tekrarlı analiz sonuçları

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği daha sonra tablet çözeltisi ve 1,00; 2,50 ve 5,00 µg/mL RFL eklenmiş tablet çözeltileri ile incelendi. Tablet çözeltisine ait kromatogram Şekil 4-6’da verildi.

Doğruluk % geri kazanım, kesinlik ise %RSD olarak hesaplandı. Geri kazanım değerlerinin %99,43-101,05 aralığında, %RSD değerlerinin ise %2’den düşük olduğu tespit edildi (Tablo 4-5).

**Şekil 4- 6:** Tablet Çözeltisinin HPLC-FD Kromatogramı

**Tablo 4- 5:** Tablet Çözeltisi ve RFL Katılmış Tablet Çözeltieri ile Gerçekleştirilen Doğruluk ve Kesinlik Çalışmalarının Sonuçları

| Örnek                                       | Konsantrasyon<br>(µg/mL) | Bulunan konsantrasyon<br>(µg/mL)* | Geri kazanım (%)* | RSD (%)     |                   |
|---------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------|-------------------|
|                                             |                          |                                   |                   | Gün<br>içi* | Günler<br>arası** |
| Orijinal tablet çözeltisi                   | 5,00                     | 5,05±0,01                         | 101,05±0,23       | 0,20        | 0,23              |
| 1,00 µg/mL RFL katılmış tablet<br>çözeltisi | 6,00                     | 6,05±0,03                         | 100,78±0,55       | 0,09        | 0,54              |
| 2,50 µg/mL RFL katılmış tablet<br>çözeltisi | 7,50                     | 7,50±0,09                         | 100,03±1,14       | 0,36        | 1,14              |
| 5,00 µg/mL RFL katılmış tablet<br>çözeltisi | 10,00                    | 9,94±0,03                         | 99,43±0,31        | 0,29        | 0,31              |

\*aynı gün içinde 3 tekrarlı analiz sonuçları

\*\*farklı 3 günde 3 tekrarlı analiz sonuçları

#### 4.2.5. Gözlenebilme Sınırı (LOD)

LOD değeri bölüm 3.5.6.'de verilen denklem ve Tablo 4-2'de verilen veriler ile 0,07 µg/mL olarak hesaplandı.

#### 4.2.6. Tayin Sınırı (LOQ)

LOQ değeri bölüm 3.5.7.'de verilen denklem ve Tablo 4-2'de verilen veriler ile 0,22 µg/mL olarak hesaplandı.

#### 4.2.7. Sağlamlık

Akış hızı  $\pm 0,1$ , hareketli faz bileşimi ve kolon sıcaklığı değerleri  $\pm 1$  birim değiştirildi ve tablet çözeltisi yeni koşullarda analiz edilerek yöntemin sağlamlığı kontrol edildi. Akış hızının 0,9 mL/dak ve 1,1 mL/dak, hareketli faz bileşiminin 19:81 ve 21:79 (h/h) (%0,08 OPA:MeOH) ve kolon sıcaklığının 39°C ve 41°C olduğu denemeler gerçekleştirildi (Tablo 4-6). Akış hızının, sonuçlar üzerinde yüksek etkiye sahip olduğu belirlendi. İncelenen diğer parametrelerdeki değişikliklerin sebep olduğu %RME değerlerinin %1,2'den düşük olduğu görüldü.

**Tablo 4- 6: Yöntemin Sağlamlığı\***

| Akış Hızı       |                  | Hareketli Faz Bileşimi |                      | Kolon Sıcaklığı  |                  |
|-----------------|------------------|------------------------|----------------------|------------------|------------------|
| 0,9 mL/dk       | 1,1 mL/dk        | OPA 19%:<br>MEOH 81%   | OPA 21%:<br>MEOH 79% | 39°C             | 41°C             |
| 7,23 $\pm$ 0,92 | -8,38 $\pm$ 0,25 | -0,73 $\pm$ 0,23       | -0,76 $\pm$ 0,59     | -0,64 $\pm$ 0,15 | -1,19 $\pm$ 0,84 |

\* Çalışmalar tablet çözeltisi ile yapıldı ve sonuçlar %RME  $\pm$  SD olarak verildi (n=3)

## 5. TARTIŞMA

Roflumilast, KOAH tedavisinde kullanılan non-steroidal antienflamatuvar bir FDE-4 inhibitörüdür. RFL, cAMP artışı ile birlikte FDE-4 izoenziminin inhibe edilmesini sağlar. Ayrıca antienflamatuvar, antiamfizem ve antibiyotik gibi farklı farmakolojik etkileri mevcuttur. Biyoyararlanımı yaklaşık %80'dir ve yetişkinlerde günlük dozu 500 µg'dır.

Yapılan literatür araştırması ile tablet formülasyonlarda RFL miktar tayini için başta HPLC-UV olmak üzere HPTLC, kapiler elektroforez ve spektrofotomerik yöntemlerin kullanıldığı tespit edildi. Bu yüksek lisans tezi kapsamında RFL'nin tablet formülasyonda tayini için ilk defa bir floresans dedeksiyonlu HPLC yöntemi geliştirildi ve valide edildi.

HPLC-FD yönteminin geliştirilmesi aşamasında mevcut HPLC çalışmaları göz önüne alınarak bir C18 kolon (250 × 4,6 mm, 5,0 µm) seçildi. Hareketli faz seçimi için farklı oranlarda su, MeOH, asetonitril, OPA ve formik asit içeren karışımlar ile gradient ve izokratik elüsyon denemeleri gerçekleştirildi. Uygunluk parametreleri gözönünde bulundurularak hacimce %20 sulu OPA çözeltisi (%0,08) ve %80 MeOH'den oluşan bir hareketli faz tercih edildi. İzokratik elüsyon uygulandı. Akış hızı 1,0 mL/dk, kolon sıcaklığı 40°C ve enjeksiyon hacmi 20 µL'ye ayarlandı. Floresans spektrumları incelenerek eksitasyon dalga boyu 290 nm ve emisyon dalga boyu 380 nm olarak belirlendi. Analiz sırasında enjeksiyon hatası gibi aksaklıklardan meydana gelebilecek olan hataları minimuma indirmek için iç standart yöntemi ile çalışıldı. İç standart olarak IRB kullanıldı.

IRB ve RFL için alıkonma sürelerinin sırasıyla 4,359±0,001 ve 5,801±0,002 olduğu belirlendi. Analiz süresi 10 dakika olarak ayarlandı. Gözlenen piklerin kuyruklanma faktörleri, ayırma gücü, alıkonma faktörleri, teorik plaka sayıları ve teorik plaka eşdeğer yükseklikleri incelendi. Kuyruklanma faktörleri 1,5'ten düşük ve ayırma gücü 2'den yüksek bulundu. Genellikle 2-20 aralığında olması istenen alıkonma faktörü, RFL için 6,094±0,051, IRB için 4,812±0,001 olarak hesaplandı. Teorik plaka sayılarının 3000'den yüksek olduğu tespit edildi.

RFL miktar tayini için geliştirilen yöntemin validasyonu için doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı ve sağlamlık parametreleri incelendi.

Ölçü eğrisi oluşturulurken konsantrasyonu 1,25-10,00 µg/mL aralığındaki 7 standart çözeltinin 9 tekrarlı analiz sonuçları kullanıldı. En küçük kareler yöntemine dayanan doğrusal regresyon analizi ile yöntemin bu aralıkta doğrusal olduğu belirlendi. Determinasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0,9992 olarak bulundu.

Geliştirilen yöntemin doğruluğu 3 farklı konsantrasyondaki standart çözeltilerin (1,25; 5,00 ve 10,00 µg/mL) ve 3 farklı konsantrasyonda RFL katılmış (1,00; 2,50 ve 5,00 µg/mL) tablet çözeltilerinin analiz sonuçları ile belirlendi. Standart çözeltiler ile gerçekleştirilen analizlerin sonuçları RME (%) olarak değerlendirildi ve %-0,58-0,84 aralığında oldukları tespit edildi. RFL katılmış tablet çözeltilerinin analiz sonuçları geri kazanım (%) cinsinden incelendi. Bu değerler %99,43-101,05 arasında bulundu.

Geliştirilen yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik olarak incelendi. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmaları için, sırasıyla, aynı gün ve 3 farklı gün içinde 3 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler (1,25; 5,00 ve 10,00 µg/mL) ve 3 farklı konsantrasyonda RFL katılmış (1,00; 2,50 ve 5,00 µg/mL) tablet çözeltileri 3 tekrarlı analiz edildi. RSD (%) değerleri 0,09-1,14 aralığında bulundu.

Geliştirilen yöntemin LOD ve LOQ değerleri, ölçü eğrisinin y eksenini kestiği noktanın standart sapmasının eğime oranının ( $\sigma/S$ ) sırasıyla 3,3 ve 10 katı alınarak hesaplandı. LOD'nin 0,07 µg/mL ve LOQ'nun 0,22 olduğu tespit edildi.

Geliştirilen yöntemin sağlamlığı akış hızı, hareketli faz bileşimi ve kolon sıcaklığı parametreleri ile incelendi. Akış hızının negatif ve pozitif yönde 0,1 birim değiştirilmesinin sonuçlarda  $\pm\%7,00$ 'den daha yüksek RME değerlerine sebep olduğu görüldü. Hareketli faz bileşimi ve kolon sıcaklığındaki 1 birimlik değişimler sonucu ise  $\pm\%1,2$ 'den daha düşük RME değerleri gözlemlendi.

RFL miktarının belirlenmesi için resmi bir monograf olmaması sebebi ile analizler sadece geliştirilen ve valide edilen HPLC yöntemi ile gerçekleştirildi. Bir kıyas yöntemi ile çalışılmadı.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında geliştirilen ve valide edilen HPLC yöntemi literatürdeki diğer yöntemler ile kıyaslandığında kullanılan hareketli fazın daha az uçucu ve daha düşük toksisiteye sahip bileşenlerden meydana geldiği görülmektedir. Pinheiro ve ark. (2013) mobil faz olarak trietilamin (0,5% h/h) içeren asetonitril ve amonyum asetat tamponu (5 mM, pH 4,2), Tan ve ark. (2013) asetonitril ve 0,005 mol/L amonyum

dihidrojen fosfat tamponu (48:52 h/h), Padma ve ark. (2013) metanol ve asetonytril (25:75, h/h) kullanmışlardır. Asetonytril, metanolden hem daha toksik hem de daha pahalıdır. Diğer pek çok çalışmada kullanılan hareketli fazlar da asetonytril bazlıdır (Barhate ve Deosthalee 2010, Belal ve ark. 2014, Shah ve Patet 2014). Bu çalışmada tercih edilen mobil faz ise %20 sulu OPA çözeltisi (%0,08) ve %80 MeOH (h/h) içermesi sebebi ile hem sağlık üzerinde daha az etkili hem de daha ucuzdur.

Geliştirilen ve valide edilen yöntemde RFL'nin alıkonma süresi  $5,801 \pm 0,002$  dakikadır. Bu değerin Belal ve ark. (2014) tarafından geliştirilen metotta 6,24, bir diğer çalışmada ise 8,64 dakika olduğu tespit edilmiştir (Barhate ve Deosthalee 2010). Görüldüğü üzere bu çalışmadaki HPLC koşulları ile RFL bazı mevcut yöntemlerden daha kısa sürede analiz edilebilmiştir.

Bu çalışmada LOD ve LOQ değerleri yöntemin doğrusal aralığını da göz önünde bulundurmak amacı ile ölçü eğrisinin y eksenini kestiği noktanın standart sapması ve eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Geliştirilen ve valide edilen yöntemin LOD ve LOQ değerleri Tarek ve ark. (2014) ve Shah ve Patel (2014) tarafından önerilen HPLC yöntemlerin LOD ve LOQ değerlerinden daha düşüktür.

Sonuç olarak bu yüksek lisans tez çalışmasında tablet formülasyonlarda RFL miktar tayini için ilk defa bir HPLC-FD yöntemi geliştirildi ve valide edildi. Yöntemin yüksek doğruluk ve kesinliğe sahip olduğu belirlendi. Önerilen yöntemin gelecekteki çalışmalarda RFL'nin biyolojik sıvılarda HPLC-FD ile tayini için yol gösterici olabileceği tespit edildi.

## KAYNAKLAR

- Agusti, A. (2006). Thomas A. Neff Lecture. Chronic obstructive pulmonary disease: a systemic disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(6): 478-481.
- Amschler, H. (1998). U.S. Patent No. 5,712,298. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Atmaca, M., & Süslü, İ. (2016). Farmasötik formülasyonlarda roflumilast'ın türev spektrofotometrik yöntem ile tayini. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 1(1), 27-49.
- Barhate, V. D., & Deosthalee, P. (2010). Rapid liquid chromatographic method for the determination of roflumilast in the presence of degradation products. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(3), 401.
- Barnes, P. J. (1999). Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 54(3), 245-252.
- Barnes, P. J., & Celli, B. R. (2009). Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *European Respiratory Journal*, 33(5), 1165-1185.
- Belal, T. S., Ahmed, H. M., Mahrous, M. S., Daabees, H. G., & Baker, M. M. (2014). Validated stability-indicating HPLC-DAD method for determination of the phosphodiesterase (PDE-4) inhibitor roflumilast. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 52(1), 79-89.
- Boswell-Smith, V., & Spina, D. (2007). PDE4 inhibitors as potential therapeutic agents in the treatment of COPD-focus on roflumilast. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2(2), 121-129.
- Burge, P. S., Calverley, P. M. A., Jones, P. W., Spencer, S., Anderson, J. A., & Maslen, T. K. (2000). Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial. *The BMJ*, 320(7245), 1297-1303.
- Calverley, P. M., Rabe, K. F., Goehring, U.-M., Kristiansen, S., Fabbri, L. M., & Martinez, F. J. (2009). Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *The Lancet*, 374(9691), 685-694.

Celli, B. R., MacNee, W. A. T. S., Agusti, A. A. T. S., Anzueto, A., Berg, B., Buist, A. S., Calverley, P. M. A., Chavannes, N., Dillard, T., Fahy, B., Fein, A., Heffner, J., Lareau, S., Meek, P., Martinez, F., McNicholas, W., Muris, J., Austegard, E., Pauwels, R., Rennard, S., Rossi, A., Siafakas, N., Tiej, B., Vestbo, J., Wouters, E., & ZuWallack, R. (2004). Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *European Respiratory Journal*, 23(6), 932-946.

Cook, D., Guyatt, G., Wong, E., Goldstein, R., Bedard, M., Austin, P., Ramsdale, H., Jaeschke, R., & Sears, M. (2001). Regular versus as-needed short-acting inhaled  $\beta$ -agonist therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(1), 85-90.

Cortijo, J. G., & Morcillo, E. S. (2010). Pharmacological profile of roflumilast. *Archivos de Bronconeumologia*, 46, 19-24.

Culpitt, S. V., de Matos, C., Russell, R. E., Donnelly, L. E., Rogers, D. F., & Barnes, P. J. (2002). Effect of theophylline on induced sputum inflammatory indices and neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165(10), 1371-1376.

Currie, G. P., Butler, C. A., Anderson, W. J., & Skinner, C. (2008). Phosphodiesterase 4 inhibitors in chronic obstructive pulmonary disease: a new approach to oral treatment. *British Journal of Clinical pharmacology*, 65(6), 803-810.

Çelik, G., Kaya, A., Çiledağ, A. (2010). KOAH'da bronkodilatör tedavi ve destek tedavileri. *TTD Toraks Cerrahisi Bülteni*. 1(2), 124-135.

Daliresp (roflumilast) tablets [package insert]. Wilmington, DE: AstraZeneca Pharmaceuticals LP; 2015.

European Medicines Agency. (2018). Daxas (roflumilast): An overview of Daxas and why it is authorised in the EU. EMA/154550/2018. EMEA/H/C/001179.

Ezzati, M. (2005). Indoor air pollution and health in developing countries. *The Lancet*, 366(9480), 104-106.

Fabbri, L. M., Luppi, F., Beghe, B., & Rabe, K. F. (2008). Complex chronic comorbidities of COPD. *European Respiratory Journal*, 31(1), 204-212.

Gauvreau, G. M., Boulet, L. P., Schmid-Wirlitsch, C., Côté, J., Duong, M., Killian, K. J., Milot, J., Deschesnes, F., Strinich, T., Watson, R. M., Bredenbröker, D., &

- O'Byrne, P. M. (2011). Roflumilast attenuates allergen-induced inflammation in mild asthmatic subjects. *Respiratory Research*, 12(1), 1-10.
- Gooptu, B., Ekeowa, U. I., & Lomas, D. A. (2009). Mechanisms of emphysema in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights. *European Respiratory Journal*, 34(2), 475-488.
- Griffin, M. R., Coffey, C. S., Neuzil, K. M., Mitchel, E. F., Wright, P. F., & Edwards, K. M. (2002). Winter viruses: influenza-and respiratory syncytial virus-related morbidity in chronic lung disease. *Archives of Internal Medicine*, 162(11), 1229-1236.
- Grootendorst, D. C., Gauw, S. A., Verhoosel, R. M., Sterk, P. J., Hoshers, J. J., Bredenbröker, D., Bethke, T. D., Hiemstra, P. S., & Rabe, K. F. (2007). Reduction in sputum neutrophil and eosinophil numbers by the PDE4 inhibitor roflumilast in patients with COPD. *Thorax*, 62(12), 1081-1087.
- Güray, T. (2019). A new validated method for determination of roflumilast in tablet by CZE-UV. *Química Nova*, 42(5), 522-526.
- Hanania, N. A., Müllerova, H., Locantore, N. W., Vestbo, J., Watkins, M. L., Wouters, E. F. M., Rennard, S. I., & Sharafkhaneh, A. (2011). Determinants of depression in the ECLIPSE chronic obstructive pulmonary disease cohort. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(5), 604-611.
- Hatzelmann, A., & Schudt, C. (2001). Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297(1), 267-279.
- Hatzelmann, A., Morcillo, E. J., Lungarella, G., Adnot, S., Sanjar, S., Beume, R., Schudt, C., & Tenor, H. (2010). The preclinical pharmacology of roflumilast: A selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 23(4), 235-256.
- Hermann, R., Nassr, N., Lahu, G., Peterfai, E., Knoerzer, D., Herzog, R., Zech, K., & de Mey, C. (2007). Steady-state pharmacokinetics of roflumilast and roflumilast N-oxide in patients with mild and moderate liver cirrhosis. *Clinical Pharmacokinetics*, 46(5), 403-416.
- Hogg, J. C., & Timens, W. (2009). The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1), 435-459.

- Hohlfeld, J. M., Schoenfeld, K., Lavae-Mokhtari, M., Schaumann, F., Mueller, M., Bredenbroeker, D., Krug, N., & Hermann, R. (2008). Roflumilast attenuates pulmonary inflammation upon segmental endotoxin challenge in healthy subjects: A randomized placebo-controlled trial. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 21(4), 616-623.
- Hvidsten, S. C., Storesund, L., Wentzel-Larsen, T., Gulsvik, A., & Lehmann, S. (2010). Prevalence and predictors of undiagnosed chronic obstructive pulmonary disease in a Norwegian adult general population. *The Clinical Respiratory Journal*, 4(1), 13-21.
- ICH (2005, Kasım). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Erişim 19.20.2020, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf)
- Kar, S., & Zengin, N. (2019). KOAH'lı hastalarda sağlık durumunun sosyodemografik ve hastalık ile ilgili özelliklere göre incelenmesi. *Sağlık Profesyonelleri Araştırma Dergisi*, 1(1), 1-7.
- Kesten, S., Jara, M., Wentworth, C., & Lanes, S. (2006). Pooled clinical trial analysis of tiotropium safety. *Chest*, 130(6), 1695-1703.
- Kocabaş, A., Atış, S., Çöplü, L., Erdinç, E., Ergen, B., Gürgün, A., Köktürk, N., Polatlı, M., & Şen, E. N. Y. (2014). Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) koruma, tanı ve tedavi raporu. *Official Journal of the Turkish Thoracic Society*, 15(2), 1-56.
- Ladani, J. J., Bhimani, R. D., Vyas, K. B., & Nimavat, K. S. (2012). Method development and validation of roflumilast in tablet dosage form by UV spectrophotometry. *Journal of Atoms and Molecules*, 2(5), 369-374.
- Li, H., Zuo, J., & Tang, W. (2018). Phosphodiesterase-4 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9, Article1048.
- Lipworth, B. J. (2005). Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, 365(9454), 167-175.
- Mahler, D. A. (2002). The effect of inhaled  $\beta_2$ -agonists on clinical outcomes in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(6), S298-S303.

- Mannino, D. M., Homa, D. M., Akinbami, L. J., Ford, E. S., & Redd, S. C. (2002). Chronic obstructive pulmonary disease surveillance-United States, 1971-2000. *Respiratory Care*, 47(10), 1184-1199.
- McGarvey, L. P., John, M., Anderson, J. A., Zvarich, M., & Wise, R. A. (2007). Ascertainment of cause-specific mortality in COPD: operations of the TORCH Clinical Endpoint Committee. *Thorax*, 62(5), 411-415.
- Miravittles, M., Soriano, J. B., Garcia-Rio, F., Muñoz, L., Duran-Tauleria, E., Sanchez, G., Sobradillo, V., & Ancochea, J. (2009). Prevalence of COPD in Spain: impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. *Thorax*, 64(10), 863-868.
- Mullard, A. (2012). 2011 FDA drug approvals. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11, 91-94.
- Orozco-Levi, M., Garcia-Aymerich, J., Villar, J., Ramirez-Sarmiento, A., Anto, J. M., & Gea, J. (2006). Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 27(3), 542-546.
- Oxman, A. D., Muir, D. C. F., Shannon, H. S., Stock, S. R., Hnizdo, E., & Lange, H. J. (1993). Occupational dust exposure and chronic obstructive pulmonary disease: A systematic overview of the evidence. *American Review of Respiratory Disease*, 148(1), 38-48.
- Padma, J., Hamalatha, R., Manikanteswari, D.D.V.S.N.N., Davudala, C., Vathi, U.S., & Kuchi, R. (2013). A novel RP-HPLC method for the quantification of roflumilast in formulations. *The Experiment*, 7(2), 388-394.
- Papi, A., Bellettato, C. M., Braccioni, F., Romagnoli, M., Casolari, P., Caramori, G., Fabbri, L. M., & Johnston, S. L. (2006). Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(10), 1114-1121.
- Patel, K. R., Desai, D. G., Zanwar, A., Sen, A. K., & Seth, A. K. (2013). Development and validation of UV spectroscopy method for estimation of roflumilast in bulk and tablet dosage form. *Pharma Science Monitor*, 4(3), 274-280.
- Pauwels, R. A., Buist, A. S., Calverley, P. M., Jenkins, C. R., & Hurd, S. S. (2001). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung

Disease (GOLD) Workshop summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(5), 1256-1276.

Pauwels, R. A., Löfdahl, C.-G., Laitinen, L. A., Schouten, J. P., Postma, D. S., Pride, N. B., & Ohlsson, S. V. (1999). Long-Term treatment with inhaled budesonide in persons with mild chronic obstructive pulmonary disease who continue smoking. *New England Journal of Medicine*, 340(25), 1948-1953.

Peeters, A., Barendregt, J. J., Willekens, F., Mackenbach, J. P., Mamun, A. A., & Bonneux, L. (2003). Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Annals of Internal Medicine*, 138(1), 24-32.

Pinheiro, M. S., Marins, R. D. C. E. E., Cabral, L. M., & de Sousa, V. P. (2018). Development and validation of a RP-HPLC method for Roflumilast and its degradation products. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 41(5), 223-231.

Rabe, K. F., Bateman, E. D., O'Donnell, D., Witte, S., Bredenbröker, D., & Bethke, T. D. (2005). Roflumilast—An oral anti-inflammatory treatment for chronic obstructive pulmonary disease: A randomised controlled trial. *The Lancet*, 366(9485), 563-571.

Rabe, K. F., Hurd, S., Anzueto, A., Barnes, P. J., Buist, S. A., Calverley, P., Fukuchi, Y., Jenkins, C., Rodriguez-Roisin, R., van Weel, C., & Zielinski, J. (2007). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(6), 532-555.

Rennard, S. I. (2004). Treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, 364(9436), 791-802.

Rennard, S., Knobil, K., Rabe, K. F., Morris, A., Schachter, N., Locantore, N., Canonica, W. G., Zhu, Y., & Barnhart, F. (2008). The efficacy and safety of cilomilast in COPD. *Drugs*, 68(2), 3-57.

Rodrigo, G. J., Nannini, L. J., & Rodríguez-Roisin, R. (2008). Safety of long-acting  $\beta$ -agonists in stable COPD. *Chest*, 133(5), 1079-1087.

Roflumilast N-oxide, Erişim: 17.03.2020  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Roflumilast-N-oxide>

Roflumilast, Erişim: 17.03.2020  
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.395793.html>

- Roflumilast, Erişim: 17.03.2020  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/roflumilast>  
 Roflumilast, Erişim: 17.03.2020 <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01656>
- Sanz, M. J., Cortijo, J., & Morcillo, E. J. (2005). PDE4 inhibitors as new anti-inflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. *Pharmacology & Therapeutics*, 106(3), 269-297.
- Sassi-Dambron, D. E., Eakin, E. G., Ries, A. L., & Kaplan, R. M. (1995). Treatment of dyspnea in COPD: a controlled clinical trial of dyspnea management strategies. *Chest*, 107(3), 724-729.
- Schick, M. A., Wunder, C., Wollborn, J., Roewer, N., Waschke, J., Germer, C. T., & Schlegel, N. (2012). Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic approach to treat capillary leakage in systemic inflammation. *The Journal of Physiology*, 590(11), 2693-2708.
- Shah, A. D., & Patel, C. N. (2014). Implementation of QbD approach to the RP-HPLC method development and validation of roflumilast in bulk and tablet dosage form: An application in degradation study. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(6), 2281-2307.
- Sin, D. D., Anthonisen, N. R., Soriano, J. B., & Agustí, A. G. (2006). Mortality in COPD: Role of comorbidities. *European Respiratory Journal*, 28(6), 1245-1257.
- Soler, N., Agustí, C., Angrill, J., De la Bellacasa, J. P., & Torres, A. (2007). Bronchoscopic validation of the significance of sputum purulence in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 62(1), 29-35.
- Sovani, M. P., Whale, C. I., & Tattersfield, A. E. (2004). A benefit-risk assessment of inhaled long-acting  $\beta$  2-agonists in the management of obstructive pulmonary disease. *Drug Safety*, 27(10), 689-715.
- Spina, D. (2009). PDE4 inhibitors: current status. *British Journal of Pharmacology*, 155(3), 308–315.
- Stockley, R. A., O'Brien, C., Pye, A., & Hill, S. L. (2000). Relationship of sputum color to nature and outpatient management of acute exacerbations of COPD. *Chest*, 117(6), 1638-1645.
- Suganthi, A., Arthi, K., & Ravi, T. K. (2017). A validated stability-indicating hptlc method for the determination of roflumilast in tablets and application to accelerated stability studies. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79(2), 287-293.

- Tan, F. (2013). Development and validation of stability-indicating HPLC method for roflumilast and related substances. *Advanced Materials Research*, 781-784, 68-71.
- Turato, G., Zuin, R., & Saetta, M. (2001). Pathogenesis and pathology of COPD. *Respiration*, 68(2), 117-128.
- Ushma, P. B., & Paresh, P. U. (2016). Development and validation of high performance liquid thin layer chromatographic method for simultaneous estimation of roflumilast and salmeterol in synthetic mixture. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research*. 5(2), 1107-1117.
- Vignola, A. M. (2004). PDE4 inhibitors in COPD—A more selective approach to treatment. *Respiratory Medicine*, 98(6), 495-503.
- Vogelmeier, C. F., Criner, G. J., Martinez, F. J., Anzueto, A., Barnes, P. J., Bourbeau, J., Celli, B. R., Chen, R., Decramer, M., Fabbri, L. M., Frith, P., Halpin, D. M. G., Varela, M. V. L., Nishimura, M., Roche, N., Rodriguez-Roisin, R., Sin, D. D., Singh, D., Stockley, R., Vestbo, J., Wedzicha, J. A., & Agustí, A. (2017). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease report: GOLD Executive Summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 195(5), 557-582.
- Westphal, J. F. (2000). Macrolide-induced clinically relevant drug interactions with cytochrome P-450A (CYP) 3A4: An update focused on clarithromycin, azithromycin and dirithromycin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 50(4), 285-295
- World Health Organization Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) 2017. Erişim: 25.03.2020. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ROFLUMİLASTİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR YÜKSEK  
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİNİN  
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

## ORIJİNALLIK RAPORU

|                   |                        |            |                  |
|-------------------|------------------------|------------|------------------|
| % <b>10</b>       | % <b>8</b>             | % <b>2</b> | % <b>3</b>       |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET<br>KAYNAKLARI | YAYINLAR   | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

## BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |                                                           |             |
|----------|-----------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b> | <b>www.toraks.org.tr</b><br>İnternet Kaynağı              | % <b>3</b>  |
| <b>2</b> | <b>Submitted to Istanbul University</b><br>Öğrenci Ödevi  | % <b>1</b>  |
| <b>3</b> | <b>Submitted to TechKnowledge Turkey</b><br>Öğrenci Ödevi | % <b>1</b>  |
| <b>4</b> | <b>acikarsiv.ankara.edu.tr</b><br>İnternet Kaynağı        | % <b>1</b>  |
| <b>5</b> | <b>mafiadoc.com</b><br>İnternet Kaynağı                   | <% <b>1</b> |
| <b>6</b> | <b>docplayer.biz.tr</b><br>İnternet Kaynağı               | <% <b>1</b> |
| <b>7</b> | <b>Submitted to Marmara University</b><br>Öğrenci Ödevi   | <% <b>1</b> |
| <b>8</b> | <b>aves.istanbul.edu.tr</b><br>İnternet Kaynağı           | <% <b>1</b> |

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|                 |                           |                 |              |
|-----------------|---------------------------|-----------------|--------------|
| <b>Adı</b>      | Ulvi                      | <b>Soyadı</b>   | Mehdizade    |
| <b>Doğ.Yeri</b> | Azerbaycan, Shamkir       | <b>Doğ.Tar.</b> | 24/02/1996   |
| <b>Email</b>    | ulvi.mehdizade3@gmail.com | <b>Uyruğu</b>   | Azerbaycanlı |

### Eğitim Düzeyi

|                 | Mezun Olduğu Kurumun Adı                        | Mez. Yılı |
|-----------------|-------------------------------------------------|-----------|
| <b>Doktora</b>  | -                                               | -         |
| <b>Yük.Lis.</b> | İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi       | 2020      |
| <b>Lisans</b>   | Azerbaycan Tıp Üniversitesi Eczacılık Fakültesi | 2017      |
| <b>Lise</b>     | Azerbaycan Shamkir lisesi                       | 2013      |

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

|    | Görevi | Kurum | Süre (Yıl - Yıl) |
|----|--------|-------|------------------|
| 1. | -      | -     | -                |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* | KPDS/ÜDS Puanı | (Diğer) Puanı |
|-----------------|-------------------|----------|--------|----------------|---------------|
| İngilizce       | İyi               | Orta     | Orta   | -              | -             |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

|                      | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|----------------------|---------|--------------|-------|
| <b>LES Puanı</b>     | -       | -            | -     |
| <b>(Diğer) Puanı</b> | -       | -            | -     |

### Bilgisayar Bilgisi

| Program          | Kullanma becerisi |
|------------------|-------------------|
| Microsoft Office | Orta              |

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Mehdizade U., Köseoğlu Yılmaz P. Determination of roflumilast by a new HPLC method. 8<sup>th</sup> Drug Chemistry Conference, Antalya, Türkiye, 27 Şubat - 01 Mart 2020. Poster sunumu

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Tiyatro

