



**LAKOZAMİD, TOPİRAMAT ve LEVETİRASETAMIN KAPİLER
ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ ile AYRIMI**

Doktora Tezi

Nurlan RASHIDOV

Eskişehir 2025

**LAKOZAMİD, TOPİRAMAT ve LEVETİRASETAMIN KAPİLER
ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ ile AYRIMI**

Nurlan RASHIDOV

DOKTORA TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül DAL POÇAN

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Mayıs 2025

Eskişehir

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından kabul edilen 2111S197 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nurlan RASHIDOV'un "Lakozamid, Topiramat ve Levetirasetamın Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Ayrımı" başlıklı tezi 16/05/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programı'nda, Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Ünvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Danışman)	: Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül DAL POÇAN	
Üye	: Prof. Dr. Göksel ARLI	
Üye	: Prof. Dr. Tufan GÜRAY	
Üye	: Prof. Dr. Sena ÇAĞLAR ANDAÇ	
Üye	: Dr.Öğr.Üy. Sema KOYUTÜRK	

Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

LAKOZAMİD, TOPIRAMAT ve LEVETİRASETAMIN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ ile AYRIMI

Nurlan RASHIDOV

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Mayıs, 2025

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül DAL POÇAN

Lakozamid (LCM), topiramat (TPM) ve levetirasetam (LEV), epilepsi hastalarında nöbet kontrolünü sağlamak amacıyla kullanılan yeni nesil antiepileptik ilaçlardır. Bu çalışmada, LCM, TPM ve LEV bileşiklerinin eş zamanlı analizine olanak tanıyan basit, hızlı ve duyarlı bir kapiler elektroforez (KE) yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemi ile karşılaştırılmıştır. KE yönteminde tespit, 210 nm dalga boyunda bir fotodiyot dizisi (DAD) detektörü ile gerçekleştirilmiş ve 75 µm iç çaplı, 40 cm efektif uzunlukta kapiler kullanılmıştır. Optimum koşullar, 37 mM SDS içeren, 5 mM borat ve 10 mM fosfat tamponu (pH 8,00) ile 20 kV potansiyel uygulanarak sağlanmıştır. Bu koşullarda LCM, TPM ve LEV'in göç süreleri sırasıyla 3,97, 10,62 ve 3,61 dakika olarak belirlenmiştir. YPSK yönteminde ise C18 (4.6 × 150 mm; 5 µm i.ç.) kolon kullanılmıştır. LCM, TPM ve LEV için elde edilen alıkonma süreleri sırasıyla 5,61, 9,17 ve 3,61 dakika olarak belirlenmiştir. Geliştirilen her iki yöntem, ICH Q2(R2) kılavuzuna uygun valide edilmiştir. Saptama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla; KE yönteminde LCM için $1,03 \times 10^{-8}$ M (0,0025 µg/mL) ve $3,13 \times 10^{-8}$ M (0,078 µg/mL), TPM için $9,17 \times 10^{-9}$ M (0,0031 µg/mL) ve $2,78 \times 10^{-8}$ M (0,094 µg/mL), LEV için ise $1,06 \times 10^{-8}$ M (0,0018 µg/mL) ve $3,23 \times 10^{-8}$ M (0,0055 µg/mL), YPSK yönteminde ise LCM için $4,46 \times 10^{-8}$ M (0,011 µg/mL) ve $1,35 \times 10^{-7}$ M (0,033 µg/mL), TPM için $5,16 \times 10^{-8}$ M (0,017 µg/mL) ve $1,56 \times 10^{-7}$ M (0,052 µg/mL), LEV için ise $5,32 \times 10^{-8}$ M (0,009 µg/mL) ve $1,61 \times 10^{-7}$ M (0,027 µg/mL) olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemler farmasötik preparatların analizine başarıyla uygulanmış ve USP 47-NF 42 standartlarına uygun bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Lakozamid, Topiramat, Levetirasetam, Kapiler Elektroforez, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ABSTRACT

SEPARATION of LACOSAMIDE, TOPIRAMATE and LEVETIRACETAM by CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD

Nurlan RASHIDOV

Department of Analytical Chemistry

Graduate School of Anadolu University, May, 2025

Supervisor: Asst. Prof. Arın Gül DAL POÇAN

Lacosamide (LCM), topiramate (TPM) and levetiracetam (LEV) are novel antiepileptic drugs used to achieve seizure control in patients with epilepsy. In this study, a simple, rapid, and sensitive capillary electrophoresis (CE) method was developed for the simultaneous analysis of LCM, TPM, and LEV. This method was compared with a high performance liquid chromatography (HPLC) method. In the CE method, detection was performed at 210 nm using a photodiode array detector (DAD), and a capillary with an internal diameter of 75 μm and an effective length of 40 cm was employed. Optimum conditions were achieved using a buffer solution consisting of 37 mM SDS, 5 mM borate, and 10 mM phosphate (pH 8.00), applying a potential of 20 kV. The migration times for LCM, TPM, and LEV were determined to be 3.97, 10.62, and 3.61 minutes, respectively. In the HPLC method, detection was carried out using a C18 column (4.6 $\times$ 150 mm; 5 μm i.d.). The retention times for LCM, TPM, and LEV were found to be 5.61, 9.17, and 3.61 minutes, respectively. Both developed methods were validated according to the ICH Q2(R2) guidelines. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated as follows: for the CE method, 1.03×10^{-8} M (0.0025 $\mu\text{g/mL}$) and 3.13×10^{-8} M (0.078 $\mu\text{g/mL}$) for LCM, 9.17×10^{-9} M (0.0031 $\mu\text{g/mL}$) and 2.78×10^{-8} M (0.094 $\mu\text{g/mL}$) for TPM, and 1.06×10^{-8} M (0.0018 $\mu\text{g/mL}$) and 3.23×10^{-8} M (0.0055 $\mu\text{g/mL}$) for LEV; for the HPLC method, 4.46×10^{-8} M (0.011 $\mu\text{g/mL}$) and 1.35×10^{-7} M (0.033 $\mu\text{g/mL}$) for LCM, 5.16×10^{-8} M (0.017 $\mu\text{g/mL}$) and 1.56×10^{-7} M (0.052 $\mu\text{g/mL}$) for TPM, and 5.32×10^{-8} M (0.009 $\mu\text{g/mL}$) and 1.61×10^{-7} M (0.027 $\mu\text{g/mL}$) for LEV. The developed methods were successfully applied to the analysis of pharmaceutical preparations and were found to comply with the USP 47-NF 42 standards.

Keywords: Lacosamide, Topiramate, Levetiracetam, Capillary electrophoresis, High-Performance Liquid Chromatography

ÖNSÖZ

Bu çalışmada LCM, TPM ve LEV'in KE yöntemi ile ayrımının gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda KE yönteminin karşılaştırılması için bir YPSK yöntemi geliştirilmiş, her iki yöntem de farmasötik dozaj formlarına uygulanmıştır.

Bu uzun ve zorlu doktora yolculuğumda bilgi birikimi ve engin tecrübesiyle her zaman yolumu aydınlatan, akademik titizliği, yapıcı eleştirileri, her daim gösterdiği sabır ve destekle bu çalışmanın ortaya çıkmasında hayati bir rol oynadığı ve bilgeliğiyle tecrübesiyle bana sadece akademik anlamda değil, aynı zamanda bilimsel düşünceye bakış açımı da derinleştirmemde eşsiz bir katkı sağladığı için değerli rehberim ve kıymetli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül DAL POÇAN'a

Değerli tez savunma jüri üyelerine, geri bildirimleri, yapıcı eleştirileri ve çalışmamın gelişimine sundukları kıymetli katkılar için Prof. Dr. Göksel ARLI, Prof. Dr. Tufan GÜRAY, Prof. Dr. Sena ÇAĞLAR ANDAÇ ve Dr. Öğr. Üyesi Sema KOYUTÜRK'e, Başta Doç. Dr. Erol ŞENER ve Dr. Öğr. Üyesi Sakine ATILA KARACA olmak üzere, Anadolu Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda bulunan tüm hocalarıma ve değerli çalışma arkadaşlarıma,

Değerli desteklerini esirgemeyen ve deneysel çalışmalarımda ihtiyaç duyduğum örnekler konusunda her zaman yanımda olan kıymetli Uzm. Ecz. Cavid AYDIN'a

Bu doktora sürecinde bana her zaman inanan, destekleriyle güç veren kıymetli kuzenim Samir ABDUZADA, onun değerli eşi Aytaj ABDUZADA ve sevgili arkadaşım Bakhtiyar GARAYEV'e,

Hayatım boyunca olduğu gibi, bu zorlu ve uzun doktora sürecinde de beni bir an olsun yalnız hissettirmeyen; sevgileriyle yüreğimi ısıtan, sabırlarıyla bana rehber olan ve her daim yanımda olarak güç veren canım aileme,

Bu yolculukta bana en büyük desteği veren, sabrıyla, anlayışıyla ve sevgisiyle her zaman yanımda duran hayat arkadaşım Nurana RASHIDOVA'ya; gülüşüyle yorgunluğumu unutturan, varlığıyla yaşamıma bambaşka bir anlam ve umut katan sevgili oğlum Alparslan MAARİF'e

Teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait özgün bir çalışma olduğunu, çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Nurlan RASHIDOV

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

Bu tezi hazırlarken üretken yapay zekâ programlarından destek almadığımı beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Nurlan RASHIDOV

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Epilepsi.....	2
2.1.1. Epileptik nöbet	3
2.1.2. Epilepsinin etiyolojisi.....	4
2.1.3. Epilepsi nöbetlerinin tiplerinin sınıflandırması	5
2.1.4. Epilepsiyle ilişkili iyon kanalları.....	6
2.2. Antiepileptik İlaçlar	7
2.3. Lakozamid	9
2.3.1. Fiziksel ve kimyasal özellikler.....	10
2.3.2. Farmakokinetik özellikler	11
2.3.3. Farmakodinamik özellikler	12
2.4. Topiramat	13
2.4.1. Fiziksel ve kimyasal özellikler.....	14
2.4.2. Farmakokinetik özellikler	14
2.4.3. Farmakodinamik özellikler	15
2.5. Levetirasetam	16
2.5.1. Fiziksel ve kimyasal özellikler.....	17
2.5.2. Farmakokinetik özellikler	18
2.5.3. Farmakodinamik özellikler	18

2.6. LCM, TPM ve LEV'in Miktar Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar	19
2.7. Kapiler Elektforez	22
2.7.1. Miseller Elektrokinetik Kromatografisi Yöntemi.....	26
2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	27
3. GEREÇLER	31
3.1. Kimyasal Maddeler	31
3.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler.....	31
4. YÖNTEMLER	32
4.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	32
4.1.1. Stok çözeltiler ve iç standardın hazırlanması.....	32
4.1.2. TPM türevlendirilmesi ve türev ajanının hazırlanması	32
4.2. Kapiler Elektforez Yöntemi	33
4.2.1. Cihazla ilgili koşullar	33
4.2.2. Çalışma tamponu	34
4.2.3. Optimizasyon çalışmaları	34
4.2.3.1. <i>Tampon bileşimi ve derişimi</i>	35
4.2.3.2. <i>pH</i>	35
4.2.3.3. <i>Organik çözücü oranı</i>	36
4.2.3.4. <i>Potansiyel</i>	36
4.2.3.5. <i>Dalga boyu</i>	36
4.2.4. Validasyon çalışmaları.....	36
4.2.4.1. <i>Seçicilik</i>	36
4.2.4.2. <i>Doğrusallık</i>	37
4.2.4.3. <i>Kesinlik</i>	37
4.2.4.4. <i>Doğruluk</i>	37
4.2.4.5. <i>Duyarlılık</i>	37
4.2.4.6. <i>Kararlılık</i>	38
4.2.4.7. <i>Sağlamlık</i>	38
4.3. YPSK Yöntemi	38
4.3.1. Cihaz koşulları.....	38
4.3.2. Optimizasyon çalışmaları	38
4.3.2.1. <i>Hareketli faz</i>	39
4.3.2.2. <i>Dalga boyu</i>	39

4.3.2.3. Akış hızı	39
4.3.3. Validasyon.....	39
4.3.3.1. Seçicilik.....	40
4.3.3.2. Doğrusallık	40
4.3.3.3. Kesinlik	40
4.3.3.4. Doğruluk.....	40
4.3.3.5. Duyarlılık.....	40
4.3.3.6. Kararlılık	41
4.3.3.7. Sağlamlık	41
4.4. Yöntemlerin Uygulanması.....	41
5. BULGULAR	42
5.1. KE Yöntemi	42
5.1.1. Yöntemin Optimizasyonu.....	42
5.1.1.1. Tampon bileşimi ve derişimi	43
5.1.1.2. pH.....	45
5.1.1.3. Organik çözücü yüzdesi	46
5.1.1.4. Uygulanan potansiyel.....	47
5.1.1.5. Dalga boyu.....	47
5.1.1.6. İç standart.....	48
5.1.2. Validasyon.....	49
5.1.2.1. Seçicilik.....	49
5.1.2.2. Doğrusallık	50
5.2.2.3. Kesinlik	52
5.2.2.4. Doğruluk.....	53
5.2.2.5. Duyarlılık.....	55
5.2.2.6. Kararlılık	56
5.2.2.7. Sağlamlık	57
5.2.3. Sistem uygunluk testleri	57
5.3. YPSK Yöntemi	58
5.3.1. Optimizasyon.....	58
5.3.1.1. Hareketli faz	58
5.3.1.2. Akış hızı	59
5.3.1.3. Dalga boyu.....	60

5.3.2. Validasyon.....	61
5.3.2.1. Seçicilik.....	62
5.3.2.2. Doğrusallık.....	62
5.3.2.3. Kesinlik.....	64
5.3.2.4. Doğruluk.....	66
5.3.2.5. Duyarlılık.....	68
5.3.2.6. Kararlılık.....	69
5.3.2.7. Sağlamlık.....	69
5.3.3. Sistem uygunluk testleri	70
5.4. Yöntemlerin Uygulanması.....	71
6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER.....	76
KAYNAKÇA.....	78
ÖZ GEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 Nöbet tiplerinin taksonomisi	5
Tablo 2.2 Epilepsiyle ilişkili iyon kanalları	6
Tablo 2.3 Antiepileptik ilaçların moleküler hedefleri	9
Tablo 2.4 LCM, TPM ve LEV'in tayinine yönelik yapılmış çalışmalar.....	22
Tablo 2.5 Kolon kromatografisi yöntemlerinin sınıflandırılması	28
Tablo 5.1 LEV'in KE yöntemi ile kalibrasyon verileri.....	51
Tablo 5.2 LCM'in KE yöntemi ile kalibrasyon verileri.....	51
Tablo 5.3 TPM'in KE yöntemi ile kalibrasyon verileri	51
Tablo 5.4 LEV'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri.....	52
Tablo 5.5 LCM'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri.....	52
Tablo 5.6 TPM'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri	53
Tablo 5.7 LEV'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri	53
Tablo 5.8 LCM'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri	54
Tablo 5.9 TPM'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri.....	55
Tablo 5.10 KE yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin duyarlılık verileri	56
Tablo 5.11 KE yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin kararlılık verileri	56
Tablo 5.12 KE yönteminin sağlamlık verileri	57
Tablo 5.13 KE yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin sistem uygunluk verileri.....	58
Tablo 5.14 Hareketli faz gradient programı	59
Tablo 5.15 Optimum çalışma koşulları	60
Tablo 5.16 LEV'in YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri.....	63
Tablo 5.17 LCM'in YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri	64
Tablo 5.18 TPM'in YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri	64
Tablo 5.19 LEV'nin YPSK yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri.....	65
Tablo 5.20 LCM'nin YPSK yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri.....	65
Tablo 5.21 TPM'nin YPSK yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri	65
Tablo 5.22 LEV'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri	66
Tablo 5.23 LCM'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri	67
Tablo 5.24 TPM'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri.....	67
Tablo 5.25 YPSK yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin duyarlılık verileri.....	68
Tablo 5.26 YPSK yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin kararlılık verileri	69

Tablo 5.27 YPSK yönteminin sağlamlık verileri	70
Tablo 5.28 YPSK yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin sistem uygunluk verileri.....	70
Tablo 5.29 LEV, LCM ve TPM içeren farmasötik preparatların KE ve YPSK yöntemleri ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi	73
Tablo 5.30 Geliştirilen KE ve YPSK yöntemlerinin literatürdeki benzer yöntemlerle karşılaştırmalı değerlendirmesi	75



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Antiepileptik ilaçların etki mekanizmaları	8
Şekil 2.2 LCM'nin kimyasal yapısı	11
Şekil 2.3 TPM'nin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.4 LEV'in moleküler yapısı.....	17
Şekil 2.5 KE metodunda elektroozmotik akışının istikameti	24
Şekil 2.6 KE yönteminde elektroozmotik akış ve elektroforetik hareketlilik ile ayırım prensibi	25
Şekil 2.7 KE cihazının prensip şeması	26
Şekil 2.8 YPSK cihazı sisteminin şematik gösterimi	29
Şekil 5.1 Çalışma tamponunda anyonik sürfaktan derişimi incelemesi	43
Şekil 5.2 Çalışma tamponunda borat derişimi incelemesi.....	44
Şekil 5.3 Çalışma tamponunda fosfat derişimi incelemesi	45
Şekil 5.4 Çalışma tamponu pH incelemesi	45
Şekil 5.5 Tampon çözeltisinde organik çözücü oranlarının kıyaslanması	46
Şekil 5.6 Uygulanan potansiyelin incelemesi	47
Şekil 5.7 Uygulanan dalga boylarının incelemesi	48
Şekil 5.8 Optimum şartlarda LEV, LCM, TPM ile CAT (IS)'ye ait elektroferogram ...	48
Şekil 5.9 Matriks ortamlarına ait blank elektroferogramı.....	49
Şekil 5.10 KE yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi.....	50
Şekil 5.11 Hareketli faz gradient programı ile yapılan analize ait kromatogram	59
Şekil 5.12 Akış hızı incelenmesi.....	59
Şekil 5.13 Farklı dalga boylarında gözlemlenen kromatogramlar.....	60
Şekil 5.14 Optimum çalışma koşulları altında kromatogram	61
Şekil 5.15 Matriks ortamlarına ait blank kromatogramı	62
Şekil 5.16 YPSK yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi.....	63
Şekil 5.17 LEV içeren farmasötik preparatlara ait elektroferogramlar	71
Şekil 5.18 LCM içeren farmasötik preparata ait elektroferogram	71
Şekil 5.19 TPM içeren farmasötik preparata ait elektroferogram	72

Şekil 5.20 LEV içeren farmasötik preparatlara ait kromatogramlar	72
Şekil 5.21 LCM içeren farmasötik preparata ait kromatogram	72
Şekil 5.22 TPM içeren farmasötik preparata ait kromatogram.....	73



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Seçicilik faktörü
a	: Eğitim
AMPA	: Alfa-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazolpropiyonik Asit
b	: Kesim
BH	: Bağlı Hata
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CA	: Karbonik anhidraz (Carbonic anhydrase)
CAT	: Katekol
CYP	: Cytochrome P450
DAD	: Diyot Dizisi Detektörü
dk	: Dakika
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency)
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)
Fmoc-Cl	: 9-fluorenilmetiloksikarbonil klorür
GABA	: Gama-Aminobutirik Asit
GK	: Geri Kazanım
h	: Hacim
ICH	: International Conference of Harmonization
IS	: İç Standart
k'	: Kapasite faktörü
KE	: Kapiler Elektroforez
KS	: Kütle Spektrometresi
LCM	: Lakozamid

LEV	: Levetirasetam
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
MEKK	: Miseller elektrokinetik kapiler kromatografi
MRP	: Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein (Multidrug Resistance Protein)
n	: Deney sayısı
NaOH	: Sodyum hidroksit
NMDA	: N-metil-D-aspartat (N-methyl-D-aspartate)
Ort	: Ortalama
P-gp	: Para glikoprotein
PN	: Pik normalizasyonu
rpm	: Döngü/dakika
R _s	: Ayrım gücü, çözünürlük
SK	: Sıvı Kromatografisi
SS	: Standart Sapma
SV	: Sinaptik Vezikül Glikoprotein
TPM	: Topiramet
UHPLC	: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	: Ultraviyole
V _d	: Dağılım hacmi
YPSK	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ

Epilepsi, dünya nüfusunun yaşam kalitesine önemli ölçüde zarar vermekte olan küresel düzeyde en yaygın kronik, nörolojik hastalıktır (Falco-Walter, 2020). Tedavi amacıyla uygulanan çeşitli yaklaşımlar içinde en yaygın ve etkin olanı antiepileptik ilaçlarla tedavi yöntemidir (Perucca, French ve Bialer, 2007). Antiepileptik ilaçlar, hastaların büyük bir kısmında nöbetlerin kontrol altına alınmasını sağladığından dolayı epilepsi için birincil tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir. LCM, TPM ve LEV epilepsi tedavisinde kullanılan farklı etki mekanizmalarına sahip üçüncü nesil antiepileptik ilaçlardır (Çarçak ve Özkara, 2017).

Literatürde LCM, TPM ve LEV miktarlarının eş zamanlı tayinine yönelik geliştirilmiş bir KE yöntemi bulunmamaktadır. Bu nedenle, çeşitli matrislerde LCM, TPM ve LEV'in eş zamanlı tayinini sağlayacak basit, hızlı ve güvenilir bir KE yönteminin geliştirilmesi, hem analitik kimya hem de farmakoloji alanlarında önemli bir araştırma ihtiyacı olarak öne çıkmaktadır. Bu durum, söz konusu analitlerin KE sistemleriyle tayinine yönelik literatürde validasyonu yapılmış bir yöntem bulunmadığını ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, çalışmamız KE ve karşılaştırma için YPSK metodu kullanılarak geliştirilecek yeni ve geçerli bir yöntemle bu eksikliği gidermeyi amaçlamaktadır.

Bu çalışmada LCM, TPM ve LEV'in eş zamanlı analizleri için yeni KE ve karşılaştırma için YPSK yöntemleri geliştirilmiştir. Yöntemin optimizasyonu tamamlandıktan sonra, doğrusalık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, seçicilik, kararlılık ve sağlamlık gibi analitik parametreler hesaplanarak ICH Q2(R2) kılavuzuna uygun olarak yöntem validasyonu sağlanmıştır (ICH, 2024). LCM, TPM ve LEV farmasötik preparatlara uygulanarak elde edilen sonuçlar istatistiksel analizlerle değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

Epilepsi, dünya genelinde yaklaşık 65 milyon kişinin hayatını olumsuz anlamda etkileyen en yaygın kronik nörolojik hastalıktır (Thurman vd., 2011). Mevcut en eski patolojilerden biri olan epilepsi, beyindeki elektrokimyasal değişikliklerin kontrolsüz artmasıyla oluşan tekrarlanabilir nöbetlerle karakterize edilmektedir (Senanayake ve Roman, 1993). Genel perspektiften bakıldığında epilepsi, Uluslararası Epilepsiyle Mücadele Birliği (ILAE) tarafından, teorik açıdan “beynin epileptik nöbetler üretimine yönelimi ve bunun sonucunda sosyal, zihinsel, nörobiyolojik ve psikolojik sorunların ortaya çıkması” olarak tanımlanabilmektedir (Fisher vd., 2005). Yaş, ırk, cins, coğrafi konum, sosyal ve ekonomik durum farketmeksizin tüm toplumlarda gözlemlenmektedir (Gaitatzis vd., 2004).

Epilepsinin tarihini araştırdıkta yazılı ilk kaynaklara M.Ö. 2000’li yıllarda Mezopotamya’da rastlanmaktadır. Akad dilinde yazılan metinlerde bir kişinin nöbet geçirerek, el ve ayaklarının gerginleşmesi, bilinçsiz davranışları yer almaktadır (Labat, 1951). Benzer yazıları Eski Mısır metinlerinde de görmek mümkündür. Babil tıbbi kaynaklarından Sakikku’da antasubba ve miqtu tanımlamalarıyla epilepsi nöbetlerini, ruhani varlıklar tarafından alıkonmak olarak tasvir etmiştir (Longrigg, 2000). M.Ö. 1790 yıllarında Benu teriminin yer aldığı Hammurabi Kanunlarında epilepsiden bahsedilmiştir (Scurlock ve Andersen, 2005). Epilepsi kökeni Yunanca’da “epilambanein” kelimesinden türetilmiş olup kavramak, yakalamak anlamına gelmektedir (Eşkazan, 2008).

Gelir düzeyi yüksek ülkelerde aktif epilepsi prevalansı 1000 kişide 5-8 (Hirtz vd., 2007), ekonomisi düşük ülkelerde ise 1000 kişide 10 olarak kaydedilmiştir (Ngugi vd., 2010). Yetersiz kaynaklardan ve risk faktörlerinden dolayı kırsal bölgelerde bu oran daha yüksektir (Newton ve Garcia, 2012). Epilepsinin yıllık insidansı, yüksek ekonomili gelişmiş ülkelerde 100.000 kişide 45 iken, orta ve düşük ekonomili ülkelerde 100.000 kişide 82’dir (Ngugi vd., 2011).

Epilepsi yaşam süresini ve kalitesini ciddi şekilde etkilemektedir. Hastaların ömrü kriptojenik veya idiyopatik epilepsilerde 2 yıl, semptomatik epilepsilerde ise 10 yıl kısalabilmektedir (Gaitatzis vd., 2004). Epilepsili hastalarda ölüm oranı yüksek gelirli ülkelerde genel popülasyona kıyasla 2-5 kat (Neligan vd., 2010), düşük gelirli ülkelerde 37 kat daha yüksektir (Ding vd., 2013). Epilepsi ile ortak etki mekanizmalara sahip veya

ilişkili komorbiditeler (bireyde aynı anda birden fazla hastalık bulunması) (Kanner, 2013), hastalarda rahatsızlık ve ölüm oranını yükseltmektedir (Fazel vd., 2013). Epilepsili hastaların yaklaşık %30'unda anksiyete veya depresyon gibi psikiyatrik problemler gözlemlenmektedir (Rai vd., 2012).

Epilepsinin teşhisi için hastaların aile genetik bilgileri, yaşam faaliyetleri, ekonomik durumu dahil olmakla sistematik özel incelenmesi gerekmektedir (Smith, Defalla ve Chadwick, 1999). Hastanın nöbet süresinde video kaydına alınan görüntüleri teşhis aşamasına gelişme sağlamaktadır (Duncan vd., 2006). Epilepsi nöbetleri ile konvülsif senkop ve psikojenik non-epileptik nöbetler (LaFrance vd., 2013) arasında farkı analiz edemeyen doktorlar tarafından yanlış teşhis konulabilmektedir (Petkar vd., 2012).

Epilepsi hastalarının %70'i doğru tıbbi tedaviyle sağlığına kavuşabilmektedir. İlaçla tedavi epilepside oldukça etkilidir. Teşhis sonrası ilk reçete edilen ilaç seçimi ile kaydadeğer sonuçlar alınmaktadır (Perucca ve Tomson, 2011). İlaçlara karşı dirençli olan epilepsi hastalarında cerrahi tedavi yöntemi seçilmekte olup %50 oranında başarı elde edilmektedir (de Tisi vd., 2011). Temporal lob epilepsisi olan hastalarda diğer yöntemlerle kıyasla cerrahi tedavi daha büyük avantajlar sağlamaktadır (Wiebe vd., 2001). İlaçlara dirençli ve aynı zamanda cerrahi tedaviye uygun olmayan epilepsi hastaları için palyatif bir tedavi olarak nörostimülasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu tekniklerden olan vagus sinir stimülasyonu, dünya genelinde son 15 yılda yaygın kullanılan bir yöntemdir. Vagus sinir stimülasyonu hastaların yarısından fazlasında nöbetleri %50 veya daha fazla azaltmasına rağmen tamamen nöbetten kurtulan birey sayısı %5'in altındadır (Englot, Chang ve Auguste, 2011).

2.1.1. Epileptik nöbet

Beyindeki nöronların eksitasyon ve inhibisyon dengesi bozulduğunda belirli bir grup nöron hipersenkron halde ani ve tekrarlanan elektriksel aktiviteler oluşturmaktadır. Bu da epileptik nöbetlere yol açmaktadır. Epileptik nöbetin unsurları, başlama ve sonlanma şekli, klinik belirtiler ve anormal gelişmiş senkronizasyon olarak tanımlanmaktadır (Fisher vd., 2005). Bu aksiyon, korteks veya hipokampusun bir bölgesinde başlamakta (Crunelli, Leresche ve Childhood, 2002) ve devamında diğer kortikal, kortikal altı yapılara yayılmaktadır (Kaur, Kumar ve Medhi, 2016). Klinik belirtiler büyük farklılıklar göstermektedir. Nöbet olarak değerlendirilmesi için en az bir klinik belirti ortaya

çıkmalıdır. Nöbet odağı, süresi, hipersenkron aksiyonun özellikleri nöbetin profilini oluşturmaktadır (Moshe vd., 2015). Epileptik nöbetler provoke edilmemiş tekrarlanan nöbetlerle karakterize olunmaktadır. Onları psikojenik non-epileptik nöbetlerden ayırmak gerekmektedir (Stafstrom ve Carmant 2015).

2.1.2. Epilepsinin etiyolojisi

Hastalığın seyri ve tedavisinin belirlenmesi için öncelikle etiyolojisi bulunmalıdır. Epilepsinin etiyolojisi intrinsik veya ekstrensik olabilmektedir (Shorvon, 2011). Epilepsinin türü birden fazla etiyolojik kategoride sınıflandırılmaktadır. Etiyolojiler hiyerarşik sisteme uygun olmamakta ve hastanın gösterdiği tepkilere göre etiyolojik grubuna verilen önem durumu değişebilmektedir. İlk nöbette hastaneye başvuran kişinin MRI gibi görüntüleme yöntemleri ile ILAE kılavuzuna esasen hastalık etiyolojisi araştırılmalıdır. Epilepsi, etiyolojilerine göre 6 gruba ayrılmış olup aşağıdaki şekilde açıklanmaktadır (Scheffer vd., 2017).

Yapısal; kaza veya darbe sonucu oluşan kafa travması, beyin damarlarında kanama veya tıkanmasıyla ortaya çıkan inme, beyin dokusunda hasar, lezyon gibi durumların tetiklediği epileptik nöbetlerdir. Bu etiyoloji tipi MRI görüntüleme yöntemi ile tespit edilebilmektedir.

Genetik; en sık rastlanan etiyoloji tipi olup ortaya çıkma nedeni gen mutasyonuna dayanmaktadır. Mutasyonun çok fazla çeşitliği ve karmaşıklığından kaynaklı spesifik alt genler ve davranış karakterizasyonu bilinmemektedir.

Enfeksiyon; beyin dokusunda farklı enfeksiyonlardan kaynaklı oluşan komplikasyon sonucu ortaya çıkan nöbetlerdir. Bu etiyoloji gruba tüberküloz, menenjit, HIV, serebral sıtma, konjenital enfeksiyonlar (sitomegalovirüs, zika virüsü) gibi rahatsızlıklar başlangıç vermektedir.

Metabolik; organizmadaki biyokimyasal dengesizliklerin beyin işlevlerine negatif etkisiyle meydana gelen epileptik ataklardır. Amino asitlerin eksikliği (aminoasidopeni), böbrek işlevsizliği sonucu kanda biriken atıklar (üremi), hemoglobin üretimindeki dengesizlik (porfiri) gibi metabolik hastalıklardan kaynaklanan nöbetlerdir.

İmmün; bağışıklık sisteminde meydana gelen dengesizlik üzerine oluşan hastalıkların beyin dokusuna etkisi sonucu ortaya çıkan nöbetlerdir. Antikor testleriyle epileptik nöbetlerin etimoloji teşhisi edilebilmektedir.

Bilinmeyen; hastaların yaklaşık %40'ında, veri yetersizliği nedeniyle epileptik nöbetin etimolojisi bulunamamaktadır. Etiyolojisi bilinmeyen nöbetlerin tedavisi çok daha zor olmaktadır (ILAE, 2017).

2.1.3. Epilepsi nöbetlerinin tiplerinin sınıflandırması

Uluslararası alanda kabul gören en güncel nöbet tipleri taksonomisi, 2017 yılında Uluslararası Epilepsi ile Mücadele Birliği (ILAE) tarafından sistematize edilmiştir. Bu revize edilmiş sınıflandırma, nöbetlerin patofizyolojik başlangıç mekanizmalarını temel alarak üç ana eksenle yapılandırılmıştır: unifokal nöronal ağlardan kaynaklanan fokal başlangıçlı nöbetler, bilateral serebral hemisferlerde eş zamanlı deşarjlarla karakterize jeneralize başlangıçlı nöbetler ve etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamış başlangıç nedeni belirsiz nöbetler.

Tablo 2.1

Nöbet tiplerinin taksonomisi (ILAE, 2017)

Fokal	Motor	• Otomatizm • Atonik • Klonik • Epileptik spazmlar • Hiperkinetik • Miyoklonik • Tonik
	Motor olmayan	• Otomatik • Davranışsal tutukluk • Bilişsel • Duygusal • Duyusal
Jeneralize	Motor	• Tonik-Klonik • Tonik • Klonik • Miyoklonik • Miyoklonik-tonik-klonik • Miyoklonik-atonik • Atonik • Epileptik spazmlar
	Motor olmayan (Absans)	• Tipik • Atipik • Miyoklonik • Gözkapağı miyoklonisi
Bilinmeyen	Motor	• Tonik-Klonik • Epileptik spazmlar
	Motor olmayan	• Davranışsal tutukluk
	Sınıflandırılmayan	

Fokal nöbetler, serebral korteksin sınırlı bir bölgesindeki nöronal aktivitenin anormal senkronizasyonu sonucu ortaya çıkarken, jeneralize nöbetler kortikal ve subkortikal devrelerin karşılıklı etkileşimiyle yaygın bir şekilde tetiklenmektedir. Başlangıç nedeni saptanamayan vakalar ise "bilinmeyen" kategorisi altında incelenmektedir. Nöbet tiplerinin bu kapsamlı sınıflandırması, ILAE'nin 2017 tarihli yayınında detaylı bir şekilde sunulmuş ve Tablo 2.1 aracılığıyla detaylı bir şekilde gösterilmektedir. (ILAE, 2017).

2.1.4. Epilepsiyle ilişkili iyon kanalları

Beynin normal işlevini sürdürebilmesi için eksitator (uyarıcı) ve inhibitör (baskılayıcı) nörotransmitterlerin dengesi sağlanmalıdır. Glutamat ve aspartat, en önemli eksitator nörotransmitterlerdir. Bu nörotransmitterler yönünde dengenin bozulması halinde nöronlar kolay uyarılabilmekte ve aşırı eksitasyon, epileptik nöbetleri tetiklemektedir. Beyindeki esas inhibitör nörotransmitter GABA (gama-aminobutirik asit), nöronların aşırı aktivitesini engellemektedir.

Tablo 2.2

Epilepsiyle ilişkili iyon kanalları (Wei vd., 2017)

İyon kanalı	Ana fonksiyonu
Sodyum kanalları	Aksiyon potansiyellerinin meydana gelmesi ve yayılımını sağlama
Voltaj kapılı potasyum kanalları	Dışa doğru potasyum akımlarının ve aksiyon potansiyellerinin düzenlenmesi, nörotransmitter salınım modülasyonu
Ca ²⁺ ile aktive olunan	Nöronal ateşleme parametrelerinin ve eksitabilitesinin düzenlenmesi
Na ⁺ ile aktive olunan	Gecikmeli, I _{KNa} akımlarının temini ve ateşleme hızının adaptasyonuna katkısı
Kalsiyum kanalları	Hücre membranı depolarize olması sonucu açılan kanalların içine hücre içi Ca ²⁺ iyonlarının girmesini sağlama
Klor kanalları	Dinlenme membran potansiyelinin düzenlenmesi, hücrenin normal işlevlerini sürdürebilmesi ve hücre zarının yapısının korunması
γ-Aminobutirik asit tip A reseptör	Merkezi sinir sisteminde inhibitör işlevlerin aracılığı
İyonotropik glutamat reseptörleri	Eksitator sinaptik iletim, plastisite ve merkezi sinir sisteminin eksitotoksitesisi
Nikotinik asetilkolin reseptörleri	Sodyum ve potasyum geçirgenliği ve nörotransmitter salınımının modülasyonu
Hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid kapılı kanallar	Sodyum ve potasyum geçirgenliği

GABAerjik sistemde bu inhibitörlerin nitelik ve niceliğindeki değişiklik, akımı etkilemekte ve epileptik nöbetlerle sonuçlanmaktadır (Moldrich vd., 2003). Epilepsinin etkilediği iyon kanalları ve fonksiyonları aşağıdaki Tablo 2.2’de yer almıştır (Wei vd., 2017).

2.2. Antiepileptik İlaçlar

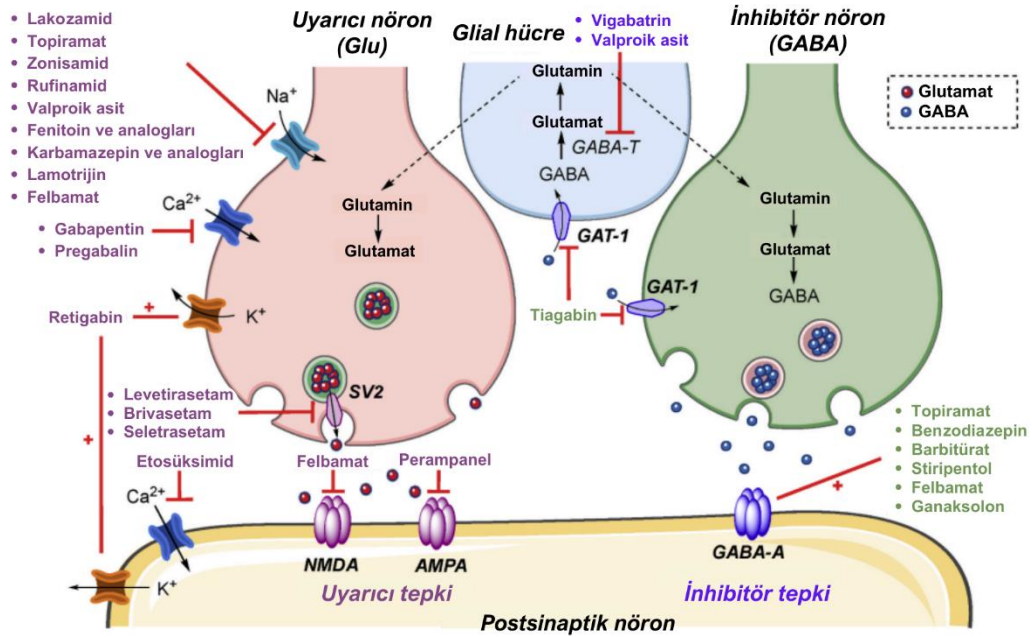
Epilepsi kronik doğası gereği ömür boyu tedavi gerektirmektedir. Uygulanan tedavilere karşı direnç geliştirebilmektedir (Kwan ve Brodie, 2000). Birkaç ana yöntem bulunmaktadır: ilaç tedavisi, cerrahi müdahale, ketojenik diyet, vagus sinir stimülasyonu. Tedavi hastanın sağlık durumuna, nöbetin tipine, frekansına, neden olan faktöre uygun olarak kişiselleştirilmektedir (Brodie vd., 2012).

İlaç tedavisinde, doğru antiepileptik ilacın seçilmesi için belirli adımlar izlenilmektedir. İlaç tedavisine başlama kararı, nöbetlerin şiddeti, frekansı, günlük yaşama etkisi gibi çeşitli faktörlere dayanmaktadır. Ayrıca, risk değerlendirmesi ve hasta ile ailesinin tercihleri de göz önüne alınmaktadır (McCorry, Chadwick ve Marson, 2004). Genellikle 24 saat aralığında gözlemlenen iki nöbet sonrasında ilaç tedavisine başlanabilir. İlk nöbet yüksek tekrar riski oluşturuyorsa ilaç kullanımı daha erken uygulanabilir. İlaç seçimi zamanı nöbet kontrolünü sağlamak için yan etkileri minimum düzeyde tutacak tedavi rejimi uygulanmalıdır. Nöbetin türü, hastanın yaşı, cinsiyeti, diğer sağlık sorunları, ilacın dozu, maliyeti, erişilebilirliği gibi faktörler dikkatle izlenilmelidir (Beghi, 2004). Klinik yanıtı esasen ilaç uygulaması olabilecek en düşük doz olarak hedeflenmektedir. Tedavi süreci başarılı olmazsa süreç yeniden gözden geçirilmelidir. Nöbet etimolojisi ve sınıflandırması yeniden değerlendirilmelidir. Alternatif daha etkili ilaç tedavisine geçiş yapılmalıdır (Vazquez, 2004). İlaç tedavisi etki etmiyorsa alternatif tedavi seçenekleri uygulanmalıdır. İlaç tedavisinin başarılı olduğu, 2 yıl nöbet görülmediği durumda antiepileptik ilaç uygulaması kademeli olarak sonlandırılabilir (LaRoche ve Helmers, 2004).

Antiepileptik ilaçlar farklı etki mekanizmalarına sahiptir. İnhibitör iletimi arttırmak, eksitator iletimi azaltmak ve voltaj kapılı iyon kanallarının blokajı olmakla üç genel sınıfa ayrılmaktadır. Antiepileptik ilaçların etki mekanizmaları Şekil 2.1 bu durumu tasvir etmektedir (Sanchez vd., 2024).

Şekil 2.1

Antiepileptik ilaçların etki mekanizmaları (Sanchez vd., 2024)



İyon kanalları, insan genomunda bulunan, sinyal moleküllerinden ibaret bir grup transmembran proteindir (Lerche vd., 2013). Voltaj kapılı sodyum, kalsiyum, potasyum kanalları, iyon akışını sağlayarak nöronal uyarılabilirliği kontrol etmekte kritik bir rol oynamaktadır. Bu kanallar, antiepileptik ilaç geliştirilmesinde ve nöbetlerin kontrolünde işlevsel olmaktadır (Catterall, 2014). Merkezi sinir sisteminde bilgi akışı, amino asitler olan glutamat ve GABA gibi nörotransmitterler tarafından gerçekleşmektedir. Glutamat, nöronal uyarılmayı sağlarken, GABA inhibisyonu düzenlemektedir. Beyin fonksiyonlarının sağlıklı işlevi için bu iki nörotransmitterin dengesi sağlanmaktadır. GABA_A reseptör antagonistleri ve glutamat reseptörleri (NMDA, AMPA ve kainat) epileptik nöbet oluşumunda rol oynamaktadır (Petroff, 2002). pH oranındaki değişiklik nöronal uyarılabilirliği etkilemektedir. Bu değişiklik sonucunda epileptik nöbetler oluşabilmektedir. Karbonik anhidraz (CA) enzimleri, pH dengesini düzenleyerek nöronal uyarılabilirliğe, nöbet oluşumuna etki göstermektedir (Ruusuvari ve Kaila, 2014). Antiepileptik ilaçların moleküler hedefleri Tablo 2.3 bu durumu anlaşılır bir şekilde ifade etmektedir.

Tablo 2.3*Antiepileptik ilaçların moleküler hedefleri (Rho, 1999; McNamara, 2001; Rang, 2012)*

Hücre türü	Hedef	İlaç
Uyarıcı nöron	➤ Na ⁺ kanalı	• Lakozamid • Fenitoin • Karbamazepin • Okskarbazepin • Eslikarbazepin • Lamotrijin • Zonisamid • Rufinamid • Valproik asit
	➤ Ca ²⁺ kanalı	• Lamotrijin • Zonisamid • Gabapentin • Pregabalin
	➤ K ⁺ kanalı	• Retigabin
	➤ HCN kanalı	• Lamotrijin
	➤ SV2A proteini	• Levetirasetam • Brivarasetam
	➤ Na ²⁺ kanalı	• Topiramat • Felbamat
Postsinaptik nöron	➤ Ca ²⁺ kanalı	• Topiramat • Etosüksimid • Fenobarbital • Felbamat
	➤ GABA _A reseptör	• Topiramat • Benzodiazepin • Barbitürat • Fenobarbital • Stiripentol • Ganaksolon • Felbamat
	➤ AMPA reseptörü	• Topiramat • Fenobarbital • Perampanel
	➤ NMDA reseptörü	• Topiramat • Felbamat
İnhibitör nöron	➤ GAT-1 reseptörü	• Tiagabin
Glial hücre	➤ GABA-T reseptörü	• Vigabatrin

2.3. Lakozamid

LCM, üçüncü nesil bir antiepileptik ilaçtır (Cawello vd., 2014). LCM yetişkinlerde, ergenlerde ve 4 yaşından büyük çocuklarda sekonder jeneralizasyonla birlikte olan veya olmayan parsiyel başlangıçlı nöbetlerin tedavisinde monoterapi ve yardımcı tedavi olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA ve Avrupa Birliği'nde EMA'nın onayını almıştır. Ek olarak, 4 yaş ve üzeri idiyopatik jeneralize epilepsili bireylerde, primer jeneralize karakterli tonik-klonik türü tedavisi amacıyla da uygun bir seçenek olarak

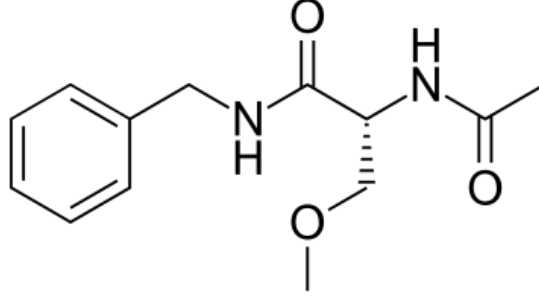
değerlendirilmektedir. (Carona vd., 2021). Diğer antiepileptik ilaçlarla kıyasla daha az yan etki ve daha olumlu farmakokinetik özellikler göstermektedir. Hastalar tarafından iyi tolere edilebilir ve vücutta diğer ilaçlarla etkileşimi öngörülebilir. Tedavi sırasında oral kontraseptiflerle (doğum kontrol hapları) de birlikte kullanılabilir. İlaç kolay anlaşılabilir metabolizmaya ve düşük potansiyele sahip olduğundan istenmeyen etkileşimlerle sorun çıkarma olasılığı düşüktür. Bu özellikler ele alındığında yeni epilepsi teşhisi konulan hastalar için LCM güvenli ve etkili bir seçenek haline gelmektedir (Baulac vd., 2017). Yeni nesil antiepileptik ilaçlar içerisinde LCM hem oral, hem de intravenöz uygulanabilirliğe sahiptir. Uzun süreli ve durdurulması zor olan epileptik nöbetlerle gözlemlenen, acil tıbbi müdahale gerektiren status epileptikus tedavilerinde de kullanılmaktadır. Klinik sonuçlar, ilacın ciddi nöbetlerde etkili ve güvenli seçenek olduğunu göstermektedir (Bauer vd., 2017). Diğer antiepileptik ilaçların uygulanmasıyla ilk aşamada tedavinin etki etmediği (Glauser vd., 2016) ve minimum 20 dakika devam eden nöbetlerle karakterize olunan durumlarda, status epileptikus için ikinci basamak tedavi olarak LCM önerilmektedir (Mazurkiewicz-Beldziska vd., 2014). LCM epilepsi dışında sinir hasarına bağlı nöropatik ağrılarda ve huzursuz bacak sendromu gibi durumlarda kullanılsa da, bu rahatsızlıkların tedavisi için resmi olarak onaylanmamıştır (Patsalos, Spencer ve Berry, 2018).

2.3.1. Fiziksel ve kimyasal özellikler

UIPAC ismi (R)-2-Asetamido-N-benzil-3-metoksipropiyonamid olan LCM, D-serin'in fonksiyonelleştirilmiş bir amino asit analogu (Şekil 2.2) olarak kabul edilmiştir, molekül formülü $C_{13}H_{18}N_2O_3$ şeklindedir. (de Biase vd., 2017). Beyaz ile açık sarı arasında değişen kristal bir toz olup, molekül ağırlığı 250.30 g/mol'dur (Beyreuther vd., 2007). LCM için erime noktası 140-146°C, kaynama noktası 536,447 °C iken, pKa değeri ise 14.2'dir. Suda çözünürlüğü 10-33.3 g/L olup (http-1) asetonitril ve etanolde ise az çözünmektedir (Chakravarthy ve Sankar, 2011). Fosfat tamponlu salin (pH 7.5, 25°C) çözeltisi içinde çözünürlüğü 20.1 mg/mL'dir (Beyreuther vd., 2007). LCM amfifilik özelliklere sahiptir. Bir yandan oral dozdan sonra tam ve hızlı emilimi desteklemek için yeterince suda çözünür, diğer yandan kan-beyin bariyerini geçmek için yeterince lipofiliktir (Hovinga, 2003).

Şekil 2.2

LCM'nin kimyasal yapısı (Drugbank, 2025)



2.3.2. Farmakokinetik özellikler

LCM, oral alımdan sonra hızla ve tamamen absorbe olmaktadır. Emilim oranı ve gıda alımından etkilenmez, biyoyararlanımı yaklaşık %100'dür (Cawello vd., 2004). Tek dozdan sonra 0,5-4 saat içinde plazma pik konsantrasyonlarına ulaşmaktadır (Cawello vd., 2014). Günde iki dozdan sonra 3 gün içinde kararlı duruma gelmektedir. LCM'nin farmakokinetiği doğrusaldır, yükleme dozu ile hızlı etkili konsantrasyon elde edilebilir (Horstmann vd., 2002). Klinik çalışmalarda, tablet ve şurup formları arasında biyoeşdeğerlik sağlandığı gözlemlenmiştir (Cawello vd., 2013). Plazma proteinlerine bağlanma oranı %15'in altında olduğundan ilaçlar arası etkileşim riski düşüktür. Yaklaşık olarak 0,6 L/kg'lık bir dağılım hacmine (V_d) sahiptir. LCM'nin metabolizmasında uygulanan dozun %40'ı değiştirilmeden böbrekler atılırken, geri kalan %60'ı metabolik bozunmaya uğramaktadır (Ben-Menachem vd., 2007). CYP2C19 farmakogenetik varyasyon gösterebilen bir enzim olarak LCM'nin inaktif bir metabolite katalize eder. LCM karaciğerde minimal düzeyde metabolize olur (Bialer vd., 2009). O-desmetil metaboliti, farmakolojik aktivite göstermeyen bir dönüşüm ürünüdür ve bu metabolitin oluşumundan çoğunlukla CYP2C19 sorumludur, ancak bu metabolit farmakolojik olarak aktif değildir. LCM'nin hastalarda yaklaşık 12-13 saatlik bir eliminasyon yarı ömrüne sahiptir. Büyük oranda hem değişmemiş hali, hem de metabolitleri böbrekler yoluyla idrarla atılmaktadır (Landmark ve Patsalos, 2010).

2.3.3. Farmakodinamik özellikler

LCM günlük dozları 200 mg ile 600 mg arasında değişmektedir. Dozları artırıldıkça nöbet sıklığında azalma ve tedaviye olumlu yanıt veren hasta yüzdesi artmaktadır (Hoy, 2013). Bu bulgular, LCM'in dozunun artırılmasının tedavi etkilerini olumlu yönde etkileyebileceğini göstermektedir (Sperling vd., 2014). LCM 200 mg/gün dozu ile nöbet frekansı %33.3, 400 mg/gün ile %36.8 ve 600 mg/gün ile %39.4 oranında bir azalma bildirilmiştir. Yani, doz arttıkça nöbetlerin sıklığı azalmaktadır (Chung vd., 2010). En iyi nöbet azalmasını sağlayan plazma konsantrasyonu 4.6 µg/mL olarak belirlenmiştir (Laveille, Schoemaker ve Stockis, 2012). LCM'in tedavi sırasında en yaygın bildirilen yan etkileri baş dönmesi, baş ağrısı, mide bulantısı, çift görme, kusma, hazımsızlık, uyku hali, burun-boğaz iltihabı ve yorgunluk olarak gözlemlenmiştir (Doty vd., 2007; Beydoun vd., 2009). LCM'in hamilelik zamanı kullanımıyla ilgili az veri olmasına rağmen mevcut vaka çalışmalarına göre ilacın etkinliği ve güvenliği konusunda olumlu bulgular elde edilmiştir (Lattanzi vd., 2017). Anne sütündeki LCM seviyeleri düşük olduğundan emzirilen bebeklerde yan etki gözlemlenmemiştir. Emziren annenin ağırlığına göre ayarlanmış ilacın günlük dozunun yaklaşık %1.8'nin bebeklere geçtiği görülmüştür (Ylikotila vd., 2015). LCM'in antiepileptik ilaçlar veya diğer ilaçlarla farmakokinetik etkileşim potansiyeli düşüktür (Kropeit vd., 2005). LCM'in CYP izoenzimlerini indükleyici veya inhibitör bir etkisi yoktur. CYP2C19 enzimini in vitro çalışmalarda inhibe ettiği gözlemlenmiştir, ancak bu etkisi klinik olarak anlamlı değildir (Thomas vd., 2006). Bu durum, LCM'in güvenli bir şekilde diğer ilaçlarla birlikte kullanılabileceğini göstermektedir (Cawello, Mueller-Voessing ve Fichtner, 2014).

LCM etki mekanizması sodyum kanalı yavaş inaktivasyonuna dayanmaktadır (Sheets vd., 2008). Voltaj kapılı sodyum kanalları uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyellerinin oluşumu ve yayılımını gerçekleştirmektedir. Uyarı aldıklarında kanallar aktifleşerek nöron içine Na⁺ girişini sağlamaktadır. Bu süreç, nöron repolarizasyon ile sona ermekte ve kanallar tekrar deaktive olan ilk pozisyonlarına geri dönmektedir. Hücrelerin uyarılabilirliği, aktivasyon için mevcut olan voltaj kapılı sodyum kanallarının sayısına bağlıdır. Epilepsi nöbetlerinde gözlemlendiği şekilde uyarılar sürekli devam ettiğinde sodyum kanalları inaktive duruma geçmektedir. Bu inaktivasyon iki fazda olabilmektedir: milisaniyelik bir zaman ölçeğinde meydana gelen hızlı inaktivasyon ve saniyeler içinde oluşan yavaş inaktivasyon (Beyreuther vd., 2007). LCM voltaj kapılı sodyum kanallarının hızlı inaktivasyonu üzerinde hiçbir etkisi olmadan, yavaş

inaktivasyonunu selektif olarak artırmaktadır (Cawello vd., 2014). Yavaş inaktivasyon tekrarlanan nöronal ateşleme ve dinlenme membran potansiyelinden sürekli depolarizasyon olmakla iki farklı şekilde indüklenmektedir (Fleiderish, Friedman ve Gutnick, 1996; Mickus, Jung ve Spruston, 1999; Blair ve Bean, 2003). Sonuçta LCM nöronal membranların elektriksel dengesini sağlamakta ve aşırı nöronal ateşlenmeyi önlemektedir (Zwierzyńska ve Pietrzak, 2021). LCM, voltaj kapılı sodyum kanallarının hızlı inaktivasyonunu etkilemeden, yavaş inaktivasyonunu artırarak aşırı nöronal uyarılmayı baskılayan modern mekanizmaya sahip olmaktadır (Curia vd., 2009).

2.4. Topiramet

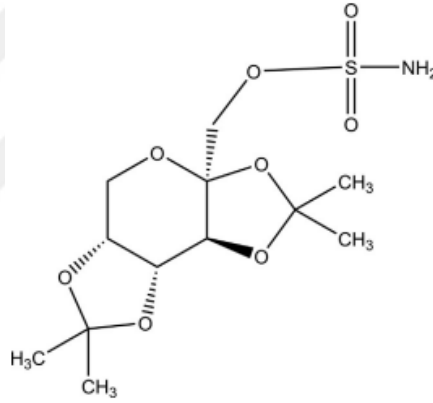
TPM, yetişkin ile pediyatrik hastalarda epilepsi ve migren tedavisi için etkinliği kanıtlanmış, yapısal olarak yeni geniş spektrumlu lisanslı bir antiepileptik ilaçtır (LaRoche ve Helmers, 2004). TPM, 1979 yılında üretilmiş, tedavi amaçlı İngiltere’de 1995 yılında kullanıma sunulmuştur (Maryanoff, 2016; Khalil vd., 2019). Yetişkinlerde ve 6 yaştan itibaren çocuk hastalarda jeneralize tonik-klonik, sekonder jeneralize olan veya olmayan parsiyel epilepsi nöbetlerinde monoterapi tedavisi için onaylanmıştır (Ferrari vd., 2011). Aynı zamanda 2 yaş üstü hastalarda yardımcı tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Lyseng-Williamson ve Yang, 2007). Ayrıca, Lennox-Gastaut sendromu ile parsiyel nöbetlerin tedavisinde lisanslı olarak uygulanmaktadır (Meurs, 2006). TPM’nin lisanssız kullanımları da mevcuttur. TPM, kısa süreli bilinç kaybı ile gözlemlenen absans nöbetleri, bebeklerde (West sendromu) infantil spazmlar, gençlerde kas seğirmesi nöbetleri (juvenil miyoklonik epilepsi), kas tonusu kaybı ile görülen (Doose sendromu) nöbetler, progresif miyoklonik epilepsi ve bebeklik döneminde şiddetli miyoklonik epilepsi (Dravet sendromu) nöbetlerinin tedavisinde onaysız da olsa uygulanabilmektedir. Bundan başka epilepsi dışındaki yeme bozukluğu, bipolar bozukluk, şiddetli küme baş ağrıları ve nöropatik ağrı gibi durumlarda da lisanssız kullanılmaktadır (Patsalos, Spencer ve Berry, 2018). TPM ilk olarak şeker hastalığının tedavisi amaçlı tasarlanmasına rağmen asetazolamid adlı ilaçla yapısal benzerlik göstermesinden dolayı nöbet önleyici karakterizasyonu incelenerek antikonvülzan olarak bu yönde geliştirilmiştir (Manhapra, Chakraborty ve Arias, 2019).

2.4.1. Fiziksel ve kimyasal özellikler

TPM, D-fruktozdan türetilen bir sülfamat ikameli monosakkarittir (Shank vd., 1994). Moleküler formülü $C_{12}H_{21}NO_8S$ olan TPM'nin moleküler ağırlığı 339,359 gr/mol'dür. Acı tadı olan katı, beyaz kristal toz halinde olan TPM 125-126 °C'de erimeye, 438.7 °C'de kaynamaya başlamaktadır. TPM en çok pH değeri 9-10 olan sodyum fosfat veya sodyum hidroksit alkali çözeltilerde, ayrıca dimetil sülfoksit, kloroform, aseton ve etanolde serbest çözünmektedir. TPM'nin sudaki çözünürlüğü 9.8 mg / mL, pKa değeri 8.6 olup, doymuş çözeltisinin pH'ı 6.3'tür. TPM'nin yapısal formülü Şekil 2.3'de verilmiştir (Khalil vd., 2019).

Şekil 2.3

TPM'nin kimyasal yapısı (Drugbank, 2025)



2.4.2. Farmakokinetik özellikler

TPM 400 mg ile oral uygulama sonrası gastrointestinal sistemden hızla emilerek 1–4 saat sürede 25.8 µg/mL (Lyseng-Williamson ve Yang, 2007) maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{max}) ulaşmaktadır (Nayak vd., 1994). TPM %81–95 arasında biyoyararlanıma sahiptir, diğer gıdalarla birlikte uygulama zamanı emilim hızı azalsa da, ilacın etkinliği korunur ve emilim oranı değişmez. Mutlak biyoyararlanım belirlenmemektedir (Britzi vd., 2005). V_d 0.6 ila 0.8 l/kg arasında değişir (Sachdeo vd., 1996). Böbrekleri sağlam hastalarda 4 günde kararlı duruma ulaşır, yarı ömrü 18–24 saat'dir (Doose vd., 1996). TPM plazma proteinlerine bağlanma oranı %9–41 aralığındadır. TPM plazma konsantrasyonu arttıkça, bağlanma oranı azalır (Perucca ve Bialer, 1996). TPM karaciğerde çok az metabolize olur. Başlıca metabolizma yolları hidroksilasyon, hidroliz ve glukuronidasyondur (Perucca ve Bialer, 1996). TPM'nin

karaciğerde parçalanarak oluşan altı metaboliti (iki hidroksi metabolit, iki diol metabolit, bir 10-hidroksi glukuronid ve bir 2,3-diol glukuronid) (Langtry, Gillis ve Davis, 1997) toplam radyoaktivitenin %5'den fazlasını oluşturmaz ve herhangi bir anlamlı farmakolojik aktivite göstermez (Johannessen, 1997). Oral dozun %55-97'si değişmeden idrarla atılmaktadır (Perucca, 1996). TPM'nin eritrositlere yüksek oranda bağlanması, maddenin kan ve plazmadaki yarı ömrünü uzatır, sonuçta metabolizmayı etkileyebilir (Shank vd., 2005). TPM yaygın CYP enzimlerinin inhibitörü değildir ve sadece çok yüksek dozlarda CYP2C19 enzimini inhibe eder, dolayısıyla bu enzimler aracılığıyla metabolize edilen ilaçlarla etkileşim riski düşüktür (Bialer, vd. 2004).

2.4.3. Farmakodinamik özellikler

TPM, 15–400 mg/gün aralığında kullanılabilir (Shank ve Maryanoff, 2008), TPM'nin plazma konsantrasyonundaki artışı, alınan dozla doğrusal ve orantılıdır (Christensen vd., 2001), öngörülebilir kinetikler sergilemektedir (Doose vd., 1996). TPM, hamilelik sırasında plasental bariyeri geçerek fetüse ulaşabilir. Ayrıca, TPM anne sütüne geçebilir ve anne sütündeki konsantrasyonu ile anne plazmasındaki konsantrasyon oranı 0.7–1.1 arasında değişir. Bu da, emzirme sırasında bebeğe ilacın geçebileceğini ve bebekte bulunabileceğini göstermektedir (Ohman vd., 2002). TPM metabolize eden enzimleri inhibe etme veya onların aktivitesini indüklemeye eğilimi azdır. Günlük TPM 50-200 mg dozlarında, norethindrone ve etinil estradiol içeren oral kontraseptiflerle etkileşime girmez (Doose vd., 1996; Doose ve Streeter 2002). TPM genellikle diğer anti-epileptiklerle etkileşimde bulunmamaktadır. Buna rağmen, valproik asit (Rosenfeld, Liao ve Kramer, 1997), karbamazepin (Sachdeo vd., 1996) ve fenitoin (Gisclon, Curtin ve Kramer 1994) gibi ilaçlar, kanda TPM seviyelerini azaltabilir (Perucca, 1999). Oral kontraseptiflerin verimliliğini etkileyebilir (Perucca 2006; Garnett, 2000).

TPM kullanımı bazı yan etkiler meydana getirebilmektedir. Bunlar arasında merkezi sinir sistemi bozuklukları, metabolik asidoz, kilo kaybı ve böbrek taşı oluşumu, hatta bazı çalışmalarda belirli gelişimsel kusurlara neden olduğu gözlemlenmektedir (Lyseng-Williamson ve Yang, 2007). Gebelikte TPM kullanımının sonuçlarıyla ilgili kayda değer veri bulunmamaktadır (Palmieri ve Canger, 2002). Bazı raporlar TPM ile hypospadias gibi genetik anormallikler arasında ilişkilendirmiş, ancak net olarak kanıtlanamamıştır (Lyseng-Williamson ve Yang, 2007).

TPM çeşitli aktiviteler yoluyla etki mekanizmalarına sahiptir (Shank ve Maryanoff, 2008; White, Smith ve Wilcox, 2007).

1. Voltaj kapılı sodyum (Na^+) kanalları ile etkileşim sonucu nöronların uyarılabilirliği değiştirilir ve depolarize durumdaki sinir hücrelerinde tekrarlayan elektriksel ateşleme bloke edilir. Bu aşırı eksitasyon engelleyici etki nöbetlerin sıklığını ve şiddetini azaltır (Mc Lean, Bukhari ve Wamil, 2000).
2. L-tipi yüksek voltajla aktive olan kalsiyum kanallarına inhibitör etki ederek membran depolarizasyonunu ve aşırı nörotransmitter salınımını azaltır. Nöronların eksitasyonunu ve nörolojik semptomlarını düzenleyerek nöbet durumunu hafifletir (Zhang vd., 2000).
3. Glutamat reseptörlerinin AMPA/kainat alt tiplerinin üzerindeki negatif modülatör etkisiyle glutamat aracılı nöronların somatik veya dendritik membranlarındaki depolarizasyonu azaltır ve nöbet oluşumunu engeller (Kaminski, Banerjee ve Rogawski 2004).
4. GABA_A reseptörünün farklı bir bölgesine bağlanarak GABA'nın etkisini artırır. Bu, GABA aracılıklı klorür akımlarını güçlendirir (White, 2000). Pozitif modülatör etki sonucu nöronların daha az uyarılmasına, fokal ateşlemenin azalmasına ve nöbet eşiğinin yükselmesine sebep olur (Herrero vd., 2002).
5. CA enzimi $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ reaksiyonunu iki yönlü katalize eder. TPM sülfamat grubu içerdiği için bu grup, CA enzimlerini inhibe eder. Karbonik anhidrazın bilinen 16 izoenzimi bulunur. TPM'in CA-II ve CA-IV formlarının güçlü bir şekilde inhibe eder. Bununla da pH'a bağlı voltaj ve reseptör kapılı iyon kanallarını modülasyonu antikonvülzan etkisine katkıda bulunabilir (White, 2005). Hücre içi HCO_3^- konsantrasyonunu artırarak membran depolarizasyonuna yol açar ve bu süreç nöbetleri engeller (Pasternack, Voipio ve Kaila, 1993).

2.5. Levetirasetam

LEV, ikinci nesil bir antiepileptik olarak oral ve intravenöz uygulama olarak FDA tarafından onaylanmıştır (Wright vd., 2013). 16 yaş ve üstü hastalarda sekonder jeneralizasyon olan veya olmayan parsiyel nöbetlerin monoterapi tedavisinde doğrulanmıştır (Patsolos, 2004). Epilepsili bir aylık bebeklerde veya daha büyük çocuklarda kısmi nöbetlerin (Nevitt vd., 2017), 12 yaşından itibaren hastalarda juvenil miyoklonik nöbetlerin (Hakami, 2021), aynı zamanda, idiopatik jeneralize epilepsi ile ilişkili primer jeneralize tonik-klonik nöbetlerin yardımcı tedavisinde lisanslı

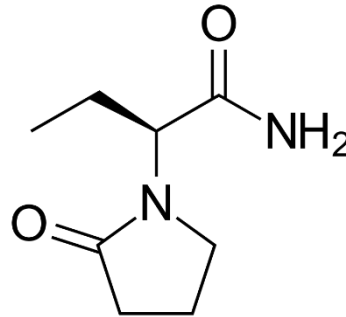
kullanılmaktadır (Rheims ve Ryvlin, 2014). Uzun süren ve ciddi acılarla gözlemlenen nöbetlerle karakterize olunan status epileptikusta, beyin ile zarı arasındaki boşluğa kan sızması sonucu oluşan subaraknoid kanamada (Dewolfe ve Szaflarski, 2013), travmatik beyin hasarı zamanı oluşabilecek nöbetlerde (Fang, Valdes ve Frontera, 2022), palyatif bakımdaki hastalarda lisanssız uygulanabilmektedir (Howard vd., 2018). Unverricht-Lundborg sendromu (progresif miyoklonik epilepsi), Dravet sendromu (infantil dönemdeki ağır miyoklonik epilepsi), Benign Rolandik epilepsi (çocuklarda yüz, dil ve boğazdaki kasların kasılması), oksipital epilepsisi (çocuklarda görme ile ilgili oksipital lobdaki anormallikler), absans nöbetlerinde ruhsatsız kullanımda da yer almaktadır (Patsalos vd., 2018).

2.5.1. Fiziksel ve kimyasal özellikler

LEV, pirrolidin türevi olup (S)- α -etil-2-okso-1-pirrolidin asetamid, pirasetamin etil analogunun (S)-enantiomeridir (Shorvon, 2001). IUPAC adı, (S)-2-(2-okso-1-pirrolidin-1-il) butanamid şeklindedir (Contreras-García vd., 2022). $C_8H_{14}N_2O_2$ kimyasal formülüne sahiptir, moleküler ağırlığı ise 170.21'dir. Beyaz kristal toz halinde, tadı acı, hafif kokulu maddedir. Suda (0.104 g/mL) iyi, metanolde (0.054 g/mL) serbest, kloroformda (0.065 g/mL), etanolde (0.016 g/mL) normal, asetonitrilde (0.006 g/mL) az çözünmektedir (Pastalos, 2004). LEV 115-119 °C'de erimeye, 396 °C'de kaynamaya başlamaktadır. pKa değeri 15.74 olup, LEV'in fosfat tamponlu salin çözeltisinde pH değeri 7.2'dir (http-3). Şekil 2.4 LEV'in yapısal formülünü detaylandırmaktadır.

Şekil 2.4

LEV'in moleküler yapısı (Drugbank, 2025)



2.5.2. Farmakokinetik özellikler

LEV oral uygulama sonrası hızlı şekilde emilim sağlar. Yüksek oranda biyoyararlanıma (>%95) sahip olup yaklaşık 1 saat içinde maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{max}) ulaşır (Patsalos, 2000). Uygulamadan itibaren 2 gün içinde kararlı duruma geçer. Plazma konsantrasyonları alınan doz ile doğru orantılıdır (Trinka vd., 2002). İntravenöz kullanımda ise plazma pik konsantrasyonuna 5–15 dakika aralığında ulaşılır (Perucca, Gidal ve Bates, 2003). Bunun haricinde, farmakokinetik profil oral uygulama ile aynıdır (Gidal vd., 2003). LEV'in V_d 0,5 ve 0,7 l/kg arasında değer almaktadır, protein bağlanma oranı (<%10) düşüktür. (Benedetti vd., 2003). LEV, metabolize edici enzimleri inhibe etmez veya indüklemey (Stockis vd., 2009). Farmakolojik aktivite göstermeyen metabolitler renal olarak atılır. Karaciğerde CYP450 enzimleriyle metabolize edilmemesinden kaynaklı diğer maddelerle etkileşim ihtimali düşük (%2,5) olduğu sonucuna varılmıştır (Li vd., 2021). Eliminasyon yarı ömrü LEV için 7,4 saattir (Coupez vd., 2003). LEV'in uyguladandan itibaren metabolize olmadan 24 saat sonra yaklaşık %66'sı böbreklerden idrarla, %24'si hidroliz sonucu oluşan karboksilik asit metaboliti (Benedetti vd., 2003), %0.3'nü dışkı yoluyla atılır (Patsalos, 2000).

2.5.3. Farmakodinamik özellikler

LEV, 1000-3000 mg/gün doz aralığında kullanılabilir (Snoeck vd., 2008). LEV plasenta yoluyla fetüse ve anne sütüne geçmektedir. Bebeklerde düşük seviyede bulunmakta, yetişkinlerle kıyasla yenidoğanlarda vücuttan yavaş hızla atılmaktadır (Stockis vd., 2009). Fenobarbital, klonazepam, karbamazepin, valproik asit gibi GABAerjik (Klitgaard ve Matagne, 2002) ilaçlarla birlikte kullanımı zamanı aktivitesinin sinerjik arttığı gözlemlenmektedir (Patsalos, 2004). Ayrıca, diazepam ile kombinasyon kullanımında status epileptikus nöbetlerinde etkili olduğu izlenmektedir (Mazarati vd., 2004). Yapılan çalışmalarda LEV'in kan beyin bariyerinde bulunan, yabancı maddelerin (ilaçlar gibi) beyin dokusuna girişini kısıtlayarak beyni zararlı maddelerden koruyan P-gp ve MRP proteinlerine bağlanmadığı gözlemlenmiştir (Potschka, Baltes ve Löscher, 2004). Nöbet kontrolünde LEV tercih edilme nedenlerinden biri de uygulama sonrası serum ve ekstraselüler sıvıda hızlı etkisi sonucu kan-beyin bariyerini kısa sürede geçmesidir (Harada vd., 2013). LEV'in en yaygın başlıca yan etkileri depresyon, huzursuzluk, baş dönmesi, hafıza kaybı, intihara meyilli olma (Mula ve Sander, 2007)

gibi sinir sistemi ve ruh sağlığını etkileyen rahatsızlıklar içermektedir (Cramer vd., 2003). Sağlık kalitesini düşüren diğer durumlar arasında iştahsızlık, enfeksiyonlar, kas ağrıları ve nezle yer almaktadır (Wright vd., 2013). LEV tedavisi sürecinde akut psikoz başlangıcı da gözlemlenmektedir (Kossoff vd., 2001; Youroukos vd., 2003). Akut psikoz (Bayerlein vd., 2004) ve intihar riski de göze alındığında bu yan etkilerden dolayı LEV kullanımı sonlandırılması mümkündür (Givon vd., 2011).

LEV'in epilepsi nöbetlerine temel etki mekanizması sinaptik vezikül proteini SV2A'ya bağlanması dayanmaktadır (Klitgaard ve Verdru, 2007). Beyinde baskın olan SV2'in (sinaptik vezikü glikoproteinleri 2) üç izoformundan (SV2A, SV2B, SV2C) biri olan SV2A, nörotransmisyonun doğru şekilde sağlanması hizmet etmektedir (Lynch vd., 2004). SV2A, bir membran proteini olup sinaptik veziküllerde bulunmakta, nörotransmitter salınımını düzenlemektedir (Janz vd., 1999). SV2A, sinaptik vezikül döngüsünde hem ekzositoz (hücre içindeki maddenin hücre zarının dışına çıkarmak için kullandığı mekanizma) hem de endositoz (hücre dışındaki maddenin hücre içine almak için kullandığı mekanizma) süreçlerinde önemli işleve sahiptir (Chang ve Südhof, 2009). Bu protein Ca^{2+} iyonları ile etkileşimi sonucu nörotransmitter salınımını artırmakta ve veziküllerin salınma hazır hale gelmesini sağlamaktadır (Pichardo vd., 2016). LEV, SV2A'ya bağlandığında, bu veziküllerin salınma hızını azalması gözlemlenmektedir. Nörotransmitterlerin sinir hücrelerinden salgılanmasını yavaşlatır, sinir hücreleri arasındaki iletişimin azalmasıyla epileptik nöbetlerin kontrol altına alınmasına yardımcı olur (Sills ve Rogawski, 2020).

2.6. LCM, TPM ve LEV'in Miktar Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar

Shihabi, Oles ve Hinsdale, (2003) LEV'in analizinde uygulanan bir KE yöntemi geliştirmişdir. LEV, çalışma tamponu olarak SDS ve metanol içeren borat tamponu (140 mM, pH 8.9) ve silika kapiler (50 µm; 35 cm) kullanılarak 6.5 dakika içinde ayrılmıştır. Yöntem, hastaların serum örneklerine uygulanmış ve YPSK ile karşılaştırılmıştır.

Mandriolia vd., (2010) TPM için insan plazmasında hızlı bir KE yöntemi geliştirilmiştir. Analiz kaplamasız füzyonlu silika kapilerde (75 µm i.ç, 375 µm d.ç.; 48.5 cm, 40.0 cm e.u.) gerçekeştirilmiştir. Çalışma tamponu olarak sülfametoksazol içeren fosfat tamponu (25 mM, pH 12.0) kullanılmıştır. TPM analizi 4,3 dakikada gerçekeşmiş saptama sınırı ve tayin sınırı sırasıyla 0,8 µg/mL ve 2,0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Yöntem, %7.3'ten

düşük bir göreceli standart sapma ile oldukça kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar sunmuştur. Doğrusallık, kesinlik, doğruluk gibi validasyon parametreleri incelenmiştir.

Ishikawa vd., (2018) TPM'nin plazmadaki miktar tayinini belirlemek için KE yöntemi geliştirilmiştir. Analizde füzyonlu silika kapiler (75 µm i.ç, 360 µm d.ç., 52 cm t.u., 40.0 cm e.u.) ve iletkenlik detektörü kullanılmıştır. Çalışma tamponu trietilamin (15 mmol/L, pH 11.3), TPM'in alıkonma süresi 2.5 dakika olmuştur. LOQ değeri 1 µg/mL olarak belirlenmiştir. Doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, stabilite gibi validasyon parametreleri araştırılmıştır.

Salido-Fortuna vd., (2021) LCM'in (R ve S enantiyomerler) ayrımında kullanılmak için bir KE yöntemi geliştirilmiş ve tablet üzerinde uygulanmıştır. Analiz için silika kapiler (58,5 cm, e.u. 50 cm; 50 µm i.ç.) ve çalışma tamponu olarak süksinil-β-CD ve ChCl-D-sorbitol eklenmiş borat tamponu (100 mM, pH 9.0) kullanılmıştır. 15,5 dakika içinde analiz gerçekleşmiş, saptama sınırı 1,5 mg/L olmuştur. Tayin sınırı ise 5,1 mg/L değerleri gözlemlenmiştir.

Pucci vd., (2004) LEV'in belirlenmesi için DAD kullanılan bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada, hareketli faz olarak metanol, asetonitril ve içinde trietilamin bulunan fosfat tamponundan oluşan (6:5:89, v/v/v) çözelti (3 mM, pH 6.0), sabit faz olarak ise C₈ kolonu (150 × 4.6 mm i.ç., 5 µm p.ç.) kullanılmıştır. LEV'in kolonda alıkonma süresi 7.3 dakika olarak gözlemlenmiştir. Saptama 500 ng/mL ve tayin sınırı ise 150 ng/mL bulunmuştur. Yöntem, %2'den düşük bir standart sapma ile oldukça kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar ortaya koymuştur.

Bahrami vd. (2005), TPM'nin YPSK analizi için bir yöntem doğrulama çalışması gerçekleştirmiştir. Testlerde, 150 mm'ye 6 mm boyutlarında ve 5 µm partikül büyüklüğünde bir fenil kolon ile 2,5 mL/dakika akış hızında 0,05 M fosfat tamponu, trietilamin ve metanol karışımından oluşan bir hareketli faz sistemi kullanılmıştır. Yöntem, 40 ng/ml ile 40 µg/ml arasındaki doğrusal aralıkta sonuçlar vermiş, tayin limiti 40 ng/ml olarak belirlenmiştir. Yöntem korelasyon katsayısı 0.992 bulunmuştur.

LCM'nin tablet örneğindeki nicel analizine yönelik bir YPSK metodu, Chakravarthy ve Shankar (2011) tarafından tanımlanmış ve iyileştirilmiştir. Bu metotta, 250 mm uzunluğa ve 4.6 mm iç çapa sahip, 5 µm partikül boyutlu bir C18 kolonu sabit faz görevini görmüş, mobil faz olarak ise etanol kullanılmıştır. LCM'nin alıkonma zamanı 7.1 dakika olarak kaydedilmiş olup, saptama ve tayin limitleri sırasıyla 0.04 µg/mL ve 0.13 µg/mL olarak saptanmıştır. Elde edilen %2'nin altındaki kesinlik değeri, yöntemin yüksek bir tekrar

üretilebilirliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. Validasyon çalışmaları kapsamında doğrusalılık, keskinlik, doğruluk, sağlamlık gibi parametreleri incelenmiştir. Aşağıdaki tabloda LCM, TPM ve LEV'in tayinine yönelik yapılmış çalışmalara dair bilgiler yer almaktadır.

Kuhn ve Knabbe, (2013) LCM, LEV, TPM ve birkaç antiepileptik maddenin aynı zamanda plazma ve serum örneklerinde miktar tayinini sağlayan bir UPSK–elektrosprey iyonizasyonlu tandem KS yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemde, 2.1 mm iç çapına ve 50 mm uzunluğa sahip, 1.7 µm partikül büyüklüğündeki bir fenil kolon sabit fazı oluşturmuş, mobil faz olarak ise 2 mM formik asit içeren amonyum asetat çözeltisi kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında, saptama limiti 0.05 mg/L ve tayin limiti 0.10 mg/L olarak elde edilmiş olup, analiz süresi 2.5 dakika içerisinde sonlanmıştır. Kapsamlı validasyon çalışmaları yürütülmüş, yöntem doğrulanmıştır.

TPM analitik ayrımı ve nicel tespiti için Majnooni vd. (2014) tarafından bir YPSK metodu geliştirilmiş ve bu metodun güvenilirliği gösterilmiştir. Metotta, 150 mm × 6 mm ölçülerinde ve 5 µm partikül çapında bir fenil kolon sabit faz olarak işlev görmüş, hareketli faz ise 0,05 M fosfat tamponu çözeltisi olarak kullanılmıştır. 2.2 mL/dk gibi akış hızı uygulanmıştır. Absorbans seviyelerini yükseltmek amacıyla bir türevlendirme basamağı entegre edilmiştir. Yöntemin tayin alt sınırı 500 ng/mL ve saptama alt sınırı 1 ng/mL olarak belirlenmiştir. Bu metodoloji, geçerlilik kriterleri açısından ilgili düzenleyici otoritelerin beklentilerini karşılamaktadır.

LEV'in plazma ve serumdaki miktarının tayini için Engelbrecht, Grobler ve Rheeders (2017) tarafından yüksek verimli kromatografi metodu kullanılmıştır. Bu teknikte, C18 kolonu sabit faz olarak yer alırken, hareketli fazı ACN ve KH₂PO₄ (10:90, h/h) oluşturduğu bir tampon çözeltisi (50 mM, pH 5.5) oluşturmuştur. LEV'in alıkonma süresi 8.5 dakika olarak görülmüştür. Keskinlik oranının 3.5%'den düşük olmasına esasen tekrarlanabilirliği yüksek değerlendirilmiştir. Plazma örneklerinde tayin sınırı 0.5 µg/mL olmuştur. Validasyon çalışmaları kapsamında doğrusalılık, keskinlik, doğruluk, özgüllük, sağlamlık, stabilite parametreleri hesaplanmıştır.

Gonçalves vd., (2018) LCM, LEV ve zonisamid için miktar tayini belirlemek amaçlı YPSK yöntemi geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Mobil faz olarak su, metanol, asetonitrilden (64:30:6, v/v/v) ibaret çözelti, sabit fazolarak ise C₁₈ kolonu (55 mm × 4mm, 3 µm p.ç.) kullanılmıştır. Alıkonma süresi LEV için 6.4, LCM için ise 9.3 dakika olarak bulunmuştur. LEV için belirlenen saptama ve tayin sınırları sırasıyla 0.625 ve 2.5

$\mu\text{g/mL}$ olarak rapor edilmiştir. Aynı koşullar altında incelenen LCM için ise saptama sınırı 0.25 ve tayin sınırı 0.50 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Bu veriler, söz konusu analitik yaklaşımların LEV ve LCM'yi belirtilen konsantrasyon düzeylerinde güvenilir bir şekilde tespit ve tayin edebilme kapasitesini ortaya koymaktadır. Güvenilir, doğru ve kesin bir yöntemi geliştirilmesi için kılavuza uygun valide edilmiştir. Tablo 2.4'te literatürde LCM, TPM ve LEV'in tayinine yönelik yapılmış çalışmalar yer almaktadır.

Tablo 2.4

LCM, TPM ve LEV'in tayinine yönelik yapılmış çalışmalar

Çalışma	Madde	Yöntem	Doğrusallık aralığı	Saptama sınırı (LOD)	Tayin sınırı (LOQ)
Shihabi, Oles ve Hinsdale, 2003	LEV	KE	7-77 mg/L	3 mg/L	8,87 mg/L
Mandriolia vd., 2010	TPM	KE	2-60 $\mu\text{g/mL}$	0,8 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$
Ishikawa vd., 2018	TPM	KE	1-30 $\mu\text{g/mL}$	0,35 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
Salido-Fortuna vd., 2021	LCM	KE	15-90 mg/L	1,5 mg/L	5,1 mg/L
Pucci vd., 2003	LEV	SK	5-100 $\mu\text{g/mL}$	150 ng/mL	500 ng/mL
Bahrami vd., 2005	TPM	SK	40 ng/mL – 40 $\mu\text{g/mL}$	5 ng/mL	40 ng/mL
Chakravarthy ve Shankar, 2011	LCM	SK	0,12-3,1 $\mu\text{g/mL}$	0,04 $\mu\text{g/mL}$	0,13 $\mu\text{g/mL}$
Kuhn ve Knabbe, 2013	LCM LEV TPM	SK- KS/KS	0,05-50 mg/L	0,05 mg/L	0,1 mg/L
Majnooni vd., 2014	TPM	SK	1-300 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$	1,5 $\mu\text{g/mL}$
Engelbrecht, Grobler ve Rheeders, 2017	LEV	SK	1-60 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$
Gonçalves vd., 2018	LCM LEV	SK	0,5-30 $\mu\text{g/mL}$ 2,5-40 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$ 0,625 $\mu\text{g/mL}$	0,75 $\mu\text{g/mL}$ 1,88 $\mu\text{g/mL}$
Mohamed vd., 2019	LEV LCM	SK	0,1-70 $\mu\text{g/mL}$	0,026 $\mu\text{g/mL}$ 0,023 $\mu\text{g/mL}$	0,096 $\mu\text{g/mL}$ 0,093 $\mu\text{g/mL}$

2.7. Kapiler Elektroferez

Elektroforetik ayırma, uygulanan bir elektrik potansiyeli gradyanı aracılığıyla, iletken bir matris içindeki yüklü analitlerin farklı hareketliliklerinden yararlanılarak gerçekleştirilen bir separasyon prosesidir. Bu teknik, elektrik alanının etkisiyle iyonize olmuş türlerin ortamda farklı hızlarda ilerlemesi temeline dayanır. Bu yöntem, moleküllerin boyutlarına ve yüklerine göre ayrılmasını sağlamaktadır. Negatif yüklü moleküller anoda, pozitif yüklü moleküller ise katoda doğru hareket etmektedir (Kuhn ve Hoffstetter-Kuhn, 1993).

Elektroforez, basit, hızlı ve çok hassas bir teknik olup, moleküllerin yükü, şekli, boyutu ve ortamın fiziksel özellikleri gibi faktörler göç hızını etkilemektedir (Baker, 1995).

Elektroforez yöntemi, ilk kez 1937 yılında Arnes Tiselius tarafından serum proteinlerinin analizine yönelik yapılan deneylerde uygulanmıştır. Tiselius'un çalışması, elektroforezin biyolojik moleküllerin analizi ve ayrıştırılmasındaki potansiyelini ortaya koymuştur (Tiselius, 1937). Bu yöntem, bilim alanında önemli bir adım olarak kabul edilerek 1948 yılında Nobel Ödülü kazanmıştır.

KE yöntemi, çok küçük hacimdeki (nL düzeyinde) örneklerde uygulanan yüksek voltaj altında iyonların elektroforetik hareketliliğine göre ayrılmasını sağlayan bir analitik tekniktir. Bu yöntemde, uçları elektrolit veya çalışma tamponu olarak bilinen sulu bir çözeltiye daldırılmış kılcal damar (kapiler) biçiminde ince bir tüp kullanılmaktadır (Camille, 1993).

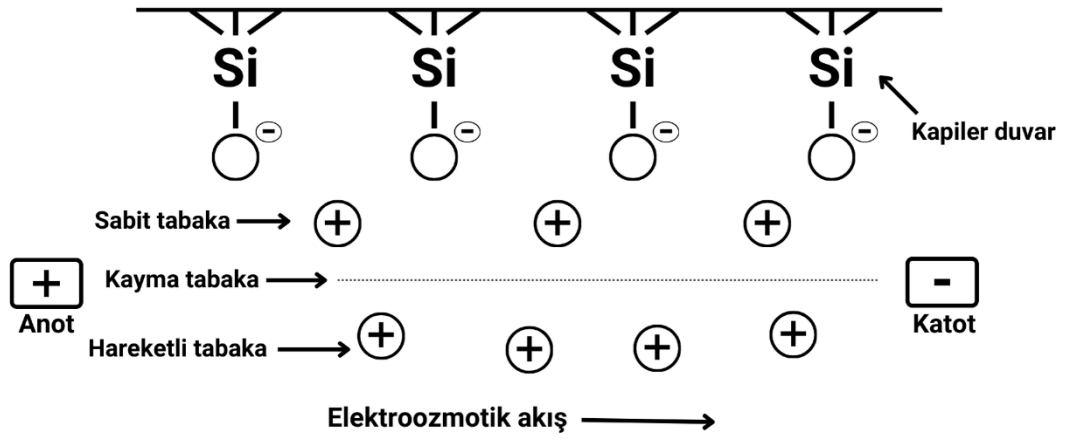
KE yöntemi, ilk olarak 1981 yılında Jorgenson ve Lukacs tarafından kullanılmıştır. Araştırmacılar, tampon çözelti ile doldurulmuş dar çaplı kapilerde elektroforez yaparak peptitlerin yüksek verimlilikle ayrıştırılabileceğini göstermiştir (Jorgenson ve Lukacs, 1981).

Çalışma tamponu içeren kapılara uygulanan elektrik alanı sonucunda moleküller yük/boyut oranına esasen farklı göç hızlarıyla ayırım sağlamaktadır. Elektroforetik sistemde, uygulanan elektrik alanının etkisiyle "+" yüklü türler (katyonlar) katoda doğru kataforetik bir hareket izlerken, "-" yüklü türler (anyonlar) ise anoda doğru anaforetik bir göç sergilemektedir. Bu zıt yönlü hareketlilik, yükün polaritesine bağımlı olarak ortaya çıkan elektroforetik ayırımın temelini teşkil eder. İyonların göç hızları, yük ve boyutlarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Örnekte bulunan moleküller, elektrik alan uygulandığında ayırım, iki temel etki aracılığıyla gerçekleşmektedir: elektroozmotik akış, elektroforetik hareketlilik (Landers, 1994).

Kapilere elektrik alan uygulanırken, örnek haricinde çalışma tamponu da kapiler boyunca hareket etmektedir. Şekil 2.5'te elektroozmotik akış görsel olarak temsil edilmektedir (Baker, 1995).

Şekil 2.5

KE metodunda elektroozmotik akışının istikameti (Baker, 1995)



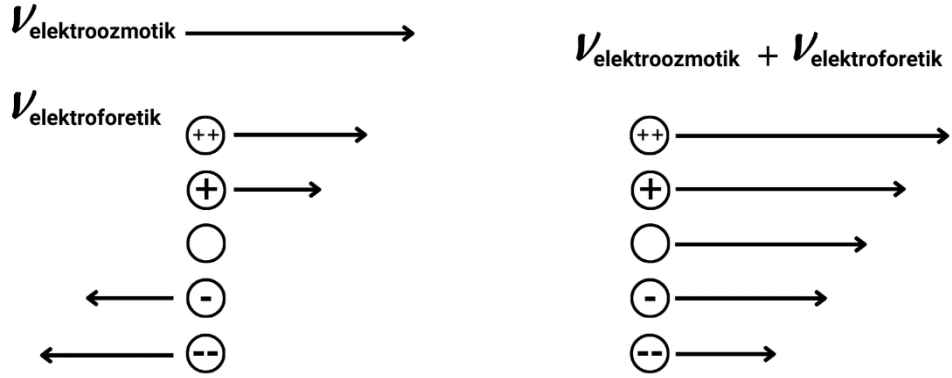
Kapiler içerisindeki elektrolitin elektrik alan etkisiyle hareket etmesi elektroozmotik akış olarak tanımlanmaktadır. Elektroozmotik akış, negatif yüklü katoda doğru, giriş vialinden kapilere, detektöre ve ardından çıkış vialine yönelmektedir. Anyonlar elektroozmotik akışın tersi yönünde hareket ederken, katyonlar ise akış ile aynı yönde ilerlemektedir. Nötr moleküller ise elektroozmotik akışla aynı şekilde ve hızda ilerleme kaydetmektedir (Kuhr ve Monnig, 1992).

Elektroforetik hareketlilik, yüklü bileşiklerin iletken ortamda uygulanan elektrik alan etkisiyle farklı hızlarda hareketini tanımlamaktadır. Bu hız farklılıkları, moleküllerin yük ve boyutlarına göre karşıt yüke sahip elektroda doğru göç etmelerini sağlamaktadır. Bu mekanizma aracılığıyla ayrışma gerçekleşmektedir. Elektroforetik hareketlilik, moleküllerin hareket hızları, boyut ve yüklerine bağlı olarak değişmektedir. Küçük boyutlu ve büyük yüklü moleküller daha hızlı hareket ederken, büyük boyutlu ve küçük yüklü moleküller daha yavaş hareket etmektedir. Nötr moleküller ise elektrik yükü taşımadıkları için elektroforetik hareketlilik göstermez ve analiz sürecinde etkisiz kalmaktadır (Baker, 1995).

KE yönteminde örnekteki moleküllerin ayrımında elektroforetik hareketlilik ve elektroozmotik akış aynı zamanda rol oynamaktadır. Bu prensip aşağıdaki Şekil 2.6'da gösterilmektedir.

Şekil 2.6

KE yönteminde elektroozmotik akış ve elektroforetik hareketlilik ile ayırım prensibi



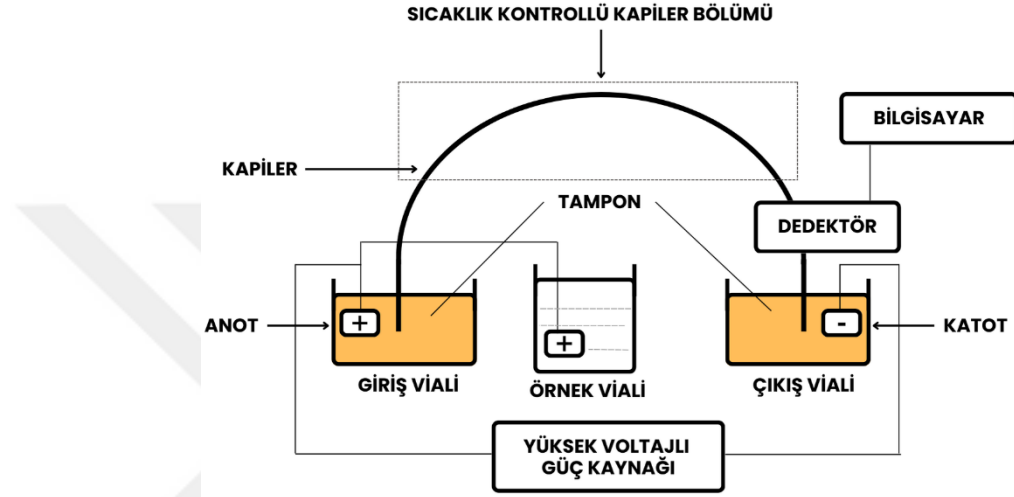
KE cihaz sistemi, yüksek voltajlı güç kaynağı, örnek, giriş ve çıkış vialleri, kapiler, detektör ve bilgi işleme çıktı cihazından oluşmaktadır. Bazı cihazlar, tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için bir sıcaklık kontrol cihazı içermektedir. Yüksek voltajlı güç kaynağının her iki tarafı bir elektrota bağlıdır. Bu elektrotlar, kapiler tüp boyunca numunenin anottan katoda göçünü başlatmak için bir elektrik alanı oluşturmaktadır. Kapiler, eritilmiş silikadan veya bazen polimid ile kaplanmaktadır. Kapilerin her iki ucu, elektrot ve elektrolitik çözelti veya sulu tampon içeren bir vialin içine daldırılmaktadır. KE’de analiz edilecek numune, örnek vialine alınır ve kapiler giriş ucu bu vialin içine daldırılır. Numune yüklemesi tamamlandıktan sonra, kapiler giriş ucu tekrar giriş vialine yerleştirilir ve bu aşamadan sonra giriş ve çıkış vialleri arasına elektrik potansiyeli uygulanarak ayırım işlemi başlatılır. Genellikle kapilerin katodik ucuna yakın bir yerde, UV-Gör ışığının analizörün içinden geçmesine ve absorbanı ölçmesine olanak tanıyan küçük bir pencere bulunmaktadır. Örnek, kapiler boyunca göç ederek detektör tarafından tespit edilmektedir. Süreç sonucunda bilgi işleme cihazı, bilgisayar tarafından elektroferogram adlanan görsel sunulmaktadır. Elektroferogram, detektörde algılanan maddelere ait bir sinyal–zaman grafiğidir. Kapilerde farklı göç hızıyla hareket eden maddeler detektör önünden farklı zamanlarda geçmektedir. Ayrılmış bileşikler, farklı göç zamanlarında pikler şeklinde görünmektedir. KE cihazının şematik çizimi Şekil 2.7’de gösterilmiştir (Baker, 1995).

Zon elektroforezi, KE teknikleri arasında önemli bir analiz yöntemi olup, farmasötik bileşiklerin incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle düşük molekül ağırlıklı farmasötik bileşiklerin analizinde merkezi bir rol üstlenen KZE, farmasötik

analizlerde YPSK ile benzer işlevler görerek, ilaçların kimlik tespiti, saflık analizi, tuz stokiyometrisi, safsızlıklar ve bozunma ürünlerinin incelenmesi, kiral saflığın değerlendirilmesi ve karşı iyonların tespiti gibi bir dizi uygulamaya imkan tanır.

Şekil 2.7

KE cihazının prensip şeması (Baker, 1995)



Ayrıca, bu teknik, başlangıç materyalleri ve yardımcı bileşenlerin analiz süreçlerinde de etkili bir şekilde kullanılabilir. KZE'deki analit hareketliliği, iyonizasyon durumuna bağlı olarak değişkenlik gösterdiğinden, bu yöntemin önemli bir uygulama alanı da ilaç keşif ve geliştirme aşamalarında kritik bir parametre olan pKa değerinin belirlenmesidir (Landers, 2008).

2.7.1. Miseller Elektrokinetik Kromatografisi Yöntemi

KZE'nin karşılaştığı sınırlamalardan biri, nötr analitlerin ayrılmasında yaşanan güçlüklerdir. Nötr bileşiklerin belirgin bir elektriksel yük taşıması nedeniyle bu analitlerin ayrılması zorlaşmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için elektrokinetik kromatografi (EKK) yöntemi geliştirilmiştir. EKK, elektroozmoz, elektroforez ve kromatografi ilkelerinin birleşimiyle, nötr bileşenlerin ayrılabilmesine olanak tanır. 1984 yılında Terabe tarafından geliştirilen miseller elektrokinetik kromatografisi (MEKK), yüzey aktif maddelerin kritik misel konsantrasyonu (KMK) üzerindeki miktarlarının sulu tampon çözeltilerine eklenmesi prensibine dayanır (Terabe vd., 1984)

Yüzey aktif maddeler dört ana gruba ayrılır: anyonik, katyonik, zwitteriyonik ve noniyonik. Zwitteriyonik ve noniyonik yüzey aktif maddeler, net elektriksel yük taşımadıkları için genellikle anyonik veya katyonik yüzey aktif maddelerle birlikte kullanılır. MEKK uygulamalarında yaygın olarak kullanılan negatif yüklü sodyum dodesil sülfat (SDS), misellerin elektroforetik hızla hareket etmesine yol açar. Kapiler sistemde detektörün bulunduğu katot ucuna yerleştirildiğinde, elektroozmotik akış anottan katoda doğru olurken, negatif yüklü miseller elektroforetik hızla anoda doğru hareket eder. Ancak, elektroozmotik akış hızı elektroforetik hızdan daha yüksek olduğundan, miseller genel akış yönünde ilerler. Bu sistemde, miseller, çözünmüş analitlerle etkileşime giren ve mobil fazdan daha düşük hızla hareket eden bir psödo-stasyonier fazı temsil eder. Bu etkileşimler, ters faz kromatografisinde gözlemlenen hidrofobik etkileşimlerle benzer şekilde gerçekleşir. Sonuç olarak, nötr ve yüklü analitlerin ayrılması, sulu mobil faz ile misel fazı arasındaki dağılım dengelerine bağlıdır. Yüklü analitlerin ayrılmasında elektroforetik etkileşimlerin yanı sıra misellere dağılım da etkili olurken, nötr analitlerin ayrılmasında yalnızca dağılım dengesi önem taşır. Hidrofobik bileşikler, yüzey aktif maddelerin hidrofobik kuyruklarıyla güçlü etkileşimler kurarak misellerde daha uzun süre tutunur ve bu nedenle daha az hidrofobik bileşiklere göre daha geç elüe olurlar (Riekkola ve Kenndler, 2013).

2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Bir karışımdaki analitlerin, hareketli ve durağan fazlar arasındaki farklı dağılım katsayılarından yararlanılarak ayrılması prensibine dayanan temel bir analitik tekniktir. Bileşenlerin ayrılması, sabit ve mobil fazlar arasında farklı göç hızlarında hareket etmelerine bağlı olarak gerçekleşmektedir (Jonsson, 1987). Bu ayrılma süreci, bileşenlerin fazlar arasındaki farklı çözünürlük ve etkileşim özelliklerine dayanmaktadır. Bileşiklerin sabit fazda ne kadar süre tutunacağı, fazlar arasındaki çözünme dinamiklerindeki farklılıklarla belirlenmektedir (Sewell ve Clarke, 1988).

Kromatografiye dair ilk çalışma Mikhail Tswett tarafından 1903 yılında gerçekleştirilmiştir. Bitki pigmentlerinin kalsiyum karbonat dolu bir cam kolon içinde ayrılması sonucu pigmentlerin renkli bantlar oluşturduğunu gözlemlenmiştir. Kromatografi, yunanca "chroma" ve "graphein" kelimelerinin birleşmesinden oluşmuş "renk" ve "yazma" anlamına gelmektedir (Skoog vd., 2003).

Bir destek materyali üzerinde tutturulmuş veya bir düzlem üzerine yayılmış olan faz, durağan faz olarak adlandırılırken, bu durağan fazın içinden veya yüzeyinden geçen ve analiz edilecek örnekteki bileşenleri taşıyan faz ise hareketli faz olarak tanımlanmaktadır (Lindsay, 1992).

Kromatografik teknikler, hareketli ve durağan faz arasındaki etkileşim mekanizmalarına göre temel olarak iki kategoriye ayrılmaktadır: düzlemsel kromatografi ve kolon kromatografisi. Düzlemsel kromatografide durağan faz, bir plaka yüzeyine veya kağıt matrisine emdirilmişken, hareketli faz bu yüzeyde kılcal kuvvetler veya yerçekimi etkisiyle ilerler. Kolon kromatografisinde ise durağan faz silindirik bir yapı (kolon) içerisinde yer almakta ve hareketli faz yerçekimi veya basınç uygulanarak bu kolon boyunca geçirilir (Braithwaite, 1996). Takip eden Tablo 2.5'te kolon kromatografisi yöntemlerinin sınıflandırması sunulmaktadır.

Tablo 2.5

Kolon kromatografisi yöntemlerinin sınıflandırılması (Skoog vd., 2003)

Sınıflandırma	Hareketli faz	Sabit faz	Yöntem	Denge türü
Gaz kromatografi	Gaz	Katı yüzeye adsorplanmış veya bağlanmış sıvı	Gaz-sıvı	Gaz veya sıvı arasında dağılıma
		Katı	Gaz-katı	Adsorpsiyon
Sıvı kromatografi	Sıvı	Katı yüzeye adsorplanmış veya bağlanmış sıvı	Sıvı-sıvı veya dağılıma	Birbiri ile karışmayan sıvılar arasında dağılıma
		Katı	Sıvı-katı veya adsorpsiyon	Adsorpsiyon
		İyon değiştirici reçine	İyon değişimi	İyon değişimi
		Polimer katının gözeneklerindeki sıvı	Boyut ayırma	Dağılıma/eleme
		Katı yüzeye bağlanmış özel bir sıvı	Afinite	Sıvı ve hareketli sıvı yüzeyi arasında dağılıma
Süperkritik akışkan kromatografi	Süperkritik akışkan	Katı yüzeye bağlanmış organik türler		Süperkritik akışkana bağlı yüzey arasında dağılıma

YPSK, hareketli fazın sıvı olduğu geniş uygulama alanına sahip yaygın kullanılan kromatografik ayırma tekniğidir. Analitik ayırım, sabit fazın gözenekli yapısından kaynaklı, çözelti içindeki bileşenlerin farklı hızlarda hareket etmesine dayanmaktadır. Klasik kromatografiye kıyasla, sabit faz olarak kullanılan kolonun daha küçük adsorban

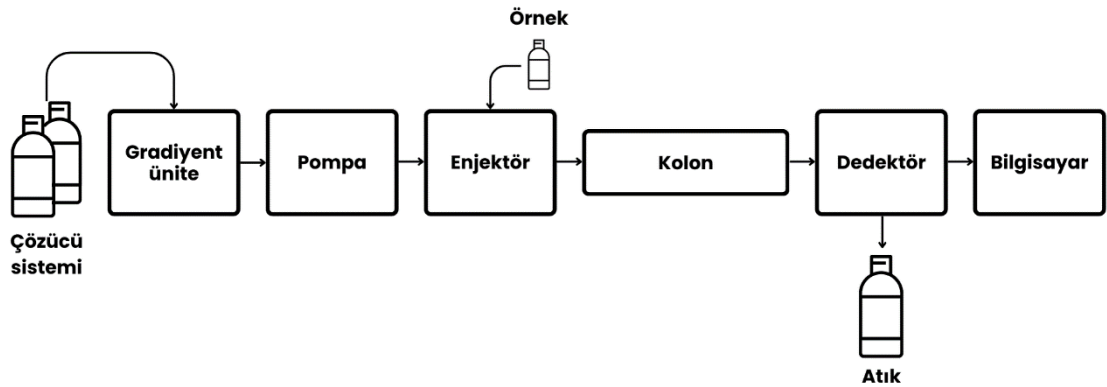
parçacıklardan (3-10 µm) oluşması sayesinde YPSK yöntemiyle çok daha kısa sürede yüksek verimli analizler yapılabilmektedir (Scott, 1995).

YPSK'nın iki temel tipi bulunmaktadır: Normal-Faz Kromatografisi ve Ters-Faz Kromatografisi). Analitlerin moleküler yapısındaki fonksiyonel gruplar ve polarite farklarına dayanarak ayırma işlemi gerçekleştirilmektedir. Normal Faz Kromatografisi prensibinde, kutupsal bir durağan faz ile apolar bir mobil faz tatbik edilmektedir. Bu yöntemde, kutupsal durağan faz, analit moleküllerini hidrojen köprüleri veya dipol-dipol etkileşimleri vasıtasıyla ayırma işlevini görmektedir. Buna mukabil, Ters Faz Kromatografisi'nde apolar bir sabit faz ve kutupsal bir sıvı mobil faz kullanılarak, analitlerin hidrofobik etkileşimler temelinde ayrılması mümkün kılınmaktadır (Snyder ve Kirkland, 1996).

YPSK cihaz düzeneği, mobil faz hazneleri ve çözücü hazırlık üniteleri, bir pompalama mekanizması, örnek verme sistemi, kolon, detektör ve veri analiz biriminden oluşmaktadır (Sneha, 2015). YPSK cihazının şematik görsel anlatımı Şekil 2.8'de sunulmaktadır. Şekil 2.8, YPSK cihazının temel bileşenlerini görsel olarak temsil etmektedir.

Şekil 2.8

YPSK cihazı sisteminin şematik gösterimi (Skoog vd., 2003)



Hareketli fazın içeriği kapasitesi 500 mL'den fazla olan bir veya daha fazla cam kapta saklanmaktadır. Ayrıca, bu kısımda hareketli fazları programlı şekilde karıştırarak sisteme veren gradient ünite bulunmaktadır (Scott, 1995). Hareketli faz yüksek basınçlı bir pompa tarafından kolona iletilir ve detektöre taşınır. Tipik pompalarının basıncı 6000-9000 psi (400-600 bar) aralığındadır ve bu basınç, kolonun partikül büyüklüğü, akış hızı

ve hareketli fazın bileşimi gibi faktörlere bağlı olarak belirlenmektedir. Hareketli fazın akışını sağlamak amacıyla genellikle üç tip pompa mekanizması tercih edilmektedir: pistonlu pompalar, şırınga esaslı pompalar ve sabit basınç prensibiyle çalışan pompalar (Snyder ve Kirkland, 1996). YPSK cihazları, manuel veya otomatik enjektörlü olup 5–500 µL hacmindeki örneklerin enjeksiyonunu gerçekleştirmektedir. Kolon, analitlerin ayrılmasını sağlamakta olan sabit faz, kromatografik ayrılmanın gerçekleştiği yerdir ve paslanmaz çelikten yapılmış bir tüptür. Kolonlar genellikle, uzunluğu 5–30 cm, iç çapı 2–5 mm ve dolgu materyalinin parçacık oranı 3–10 µm civarında olmaktadır. Detektörler sayesinde 10^{-14} – 10^{-12} düzeyinde tayin yapılabilmesi mümkündür. YPSK yönteminde absorban (UV/Gör), flüoresans, kırılma indisi, elektrokimyasal ve kütle spektrometrik detektörler sıklıkla kullanılmaktadır. Detektörden elde edilen sinyaller, elektronik entegratörlerde veya bilgisayarlarda kaydedilerek analiz edilmekte ve depolanmaktadır. Bilgisayar, bu sinyalleri derişim-sinyal ilişkisine göre işleyerek kromatogram adı verilen grafiksel bir çıktıyı oluşturmaktadır (Skoog vd., 2003).

3. GEREÇLER

3.1. Kimyasal Maddeler

Lakozamid	: Sigma-Aldrich, Almanya
Topiramet	: Sigma-Aldrich, Almanya
Levetirasetam	: Sigma-Aldrich, Almanya
Fluorenilmetiloksidekarbonil klorür	: Sigma-Aldrich, Almanya
Propanol	: Sigma-Aldrich, Almanya
Su	: Sartorius Stedim Biotech, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
Asetonitril	: Sigma-Aldrich, Almanya
Hidrojen peroksit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Hidroklorik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum hidroksit	: Merck, Almanya
Sodyum borat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	: Merck, Almanya
Fosforik asit	: Merck, Almanya

3.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler

Kapiler Elektrophorez	: Agilent Technologies, CE7100, A.B.D.
Kapiler	: Agilent Technologies, A.B.D.
YPSK	: Agilent 1290 Infinity binary LC, Almanya
YPSK kolonu	: Agilent Technologies, A.B.D.
Santrifüj cihazı	: Eppendorf, Centrifuge 5810 R, Almanya
Ultra saf su cihazı	: Millipore Ultrapure Water System, Fransa
Vorteks karıştırıcı	: Jeio Tech, VM 96 B, Kore
Ultrasonik banyo	: Bandelin Electronic, RK510 H, Almanya
UV lamba	: Vilber Lourmat, Fransa
Su banyosu	: Memmert, WNB 14, Almanya
pH metre	: Mettler Toledo, İsviçre
Şırınga filtresi	: Macherey Nagel, Almanya
Hassas terazi	: Mettler Toledo, XP205, İsviçre
Buzdolabı	: Arçelik, No Frost & Electronic, Türkiye
Etüv	: Venticell, Almanya
Otomatik pipet	: Eppendorf, Almanya

4. YÖNTEMLER

4.1. Çözeltilerin Hazırlanması

4.1.1. Stok çözeltiler ve iç standardın hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan LEV, LCM ve TPM bileşenleri için gerçekleştirilen literatür incelemesi ve ön denemeler sonucunda, metanol uygun çözücü olarak belirlenmiştir. Her bir bileşen, belirlenen miktarlarda tartılarak metanol içinde çözündürülmüştür. Çözeltilerin homojen bir şekilde karışmasını sağlamak amacıyla, önce 10 dakika boyunca vorteks karıştırıcıda karıştırılmış, ardından çözünme sürecini desteklemek için 10 dakika ultrasonik banyoya yerleştirilmiştir. Bu işlemler sonucunda, deney sürecinde kullanılmak üzere her üç bileşen için de 5×10^{-3} M derişimde ana stok çözeltiler hazırlanmıştır. İç standart olarak katekol (CAT) kullanılmış olup, stok çözeltisi $1,3 \times 10^{-3}$ M derişimde metanol içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler, ışığa karşı korunmaları amacıyla alüminyum folyo ile sarılarak -18°C 'de muhafaza edilmiştir. Daha düşük konsantrasyona sahip çözeltiler ise bu ana stok çözeltilerden, 1/10 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

4.1.2. TPM türevlendirilmesi ve türev ajanının hazırlanması

TPM, UV spektrumunda düşük absorbans sergilediğinden, doğrudan spektrofotometrik veya kromatografik yöntemlerle miktar tayini analitik zorluklar içermektedir. Bu nedenle, analiz duyarlılığını artırmak amacıyla bir ön-işlem olan türevlendirme gereksinimi ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, TPM'nin türevlendirilmesi için 9-fluorenilmetiloksikarbonil klorür (Fmoc-Cl) reaktifi kullanılmıştır (Bahrami vd., 2005). Fmoc-Cl, özellikle amino fonksiyonel gruplarına karşı yüksek seçiciliğe sahip bir türevlendirme reaktifidir. Bu molekül, sahip olduğu aromatik ve konjuge sistem sayesinde UV-vis spektroskopisinde yüksek molar absorptivite değerleri sergilemektedir. Bu özellik, Fmoc ile türevlendirilmiş analitlerin analitik cihazlarla kolaylıkla saptanabilmesini sağlamaktadır. Fmoc-Cl, kimyasal yapısı itibarıyla yüksek reaktivliğe sahip bir kloroformat esteridir ve tipik olarak bazik koşullar altında amin gruplarıyla hızlı ve kantitatif olarak reaksiyona girerek kararlı karbamat türevlerini oluşturmaktadır. Bu reaksiyon sonucunda meydana gelen Fmoc türevleri, UV bölgesinde belirgin absorbans göstermekte olup, bu durum UV detektörler ile yüksek hassasiyetli tayin imkanı sunmaktadır. Bu çalışmada kullanılan Fmoc-Cl çözeltisi, $5,0 \times 10^{-3}$ M konsantrasyonunda hazırlanmış olup çözücü olarak ACN tercih

edilmiştir. ACN, hem Fmoc-Cl'nin çözünürlüğü hem de reaksiyon ortamının stabilitesi açısından uygun bir matris sağlamaktadır. Hazırlanan reaktif çözeltisinin güncel olarak hazırlanması ve ışıktan korunarak saklanması, reaktifin degradasyonunu minimize etmek için kritik öneme sahiptir. Fmoc-Cl reaktif çözeltisi, uygun konsantrasyondaki TPM analit çözeltisi ile vorteks cihazı kullanılarak 20 dakika süreyle karıştırılmıştır. Homojen karışımın sağlanmasının ardından, reaksiyonun tamamlanması amacıyla karışım 20 dakika süreyle ultrasonik banyoda tutulmuştur. Müteakiben, türevlendirme reaksiyonunun optimum şekilde ilerlemesi için karışım 180 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Reaksiyon kapları alüminyum folyo ile sarılarak -18°C'de muhafaza edilmiştir. Daha düşük konsantrasyona sahip çözeltiler ise bu ana stok çözeltilerden, 1/10 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

4.2. Kapiler Elektrophorez Yöntemi

4.2.1. Cihazla ilgili koşullar

Bu çalışmada gerçekleştirilen KE analizlerinde dedeksiyon işlemi, 210 nm, 256 nm, 264 nm, 272 nm dalga boylarında çalışan diyot dizin detektörü (DAD) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Separasyon prosedürleri için, toplamda 48,5 efektif ise 40 cm uzunluğa ve 75 µm i.ç. sahip, yüzeyi modifiye edilmemiş silika kapilerler seçilmiştir. Kapilerlerin ilk kullanımı öncesinde yüzey aktivasyonunu sağlamak, şartlandırma amacıyla 1 M NaOH çözeltisi ile 30 dakika boyunca yıkama işlemi uygulanmıştır.

Her analiz gününün başlangıcında, sistemin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini temin etmek amacıyla, kapilerler sırasıyla 10 dakika boyunca 0,1 M derişimli sodyum hidroksit çözeltisi, ardından 10 dakika su ve son olarak 10 dakika çalışma tamponu ile yıkanarak analizlere hazır hâle getirilmiştir. Her numune enjeksiyonundan önce kapilerin yeniden şartlandırılması; 2 dakika 0,1 M NaOH, 2 dakika distile su ve 2 dakika çalışma tamponu ile ardışık olarak gerçekleştirilmiştir.

Analizlerin tamamlanmasının ardından günlük kullanım sonunda, kapiler sistemin uzun ömürlü ve kararlı performansı için önce 10 dakika süreyle sodyum hidroksit (0,1 M) ile, ardından 5 dk su ile yıkanmış; son aşamada ise 2 dakika süreyle hava geçirimi sağlanarak kurutulmuştur. Numune enjeksiyonları, 65 mbar basınç altında 10 saniye süreyle uygulanmıştır.

4.2.2. Çalışma tamponu

Bu çalışmanın metodolojisi çerçevesinde, farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltilerinden yararlanılmıştır; bu değerler 3,0 ile 9,0 skalası üzerinde çeşitlilik göstermiştir. pH 3,0, 6,0 ve 7,0 seviyelerindeki tampon çözeltilerinin hazırlanmasında fosfat tampon sistemleri esas alınırken, pH 8,0 ve 9,0 düzeylerindeki tampon çözeltisi için ise borat tampon sistemi kullanılmıştır. Fosfat tamponlarının hazırlanmasında, hedeflenen pH değerine ulaşmak amacıyla potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), ve fosforik asit (H_3PO_4) uygun oranlarda karıştırılarak kullanılmıştır. Borat tamponu ise sodyum tetraborat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$) ve sodyum hidroksit (NaOH) ile hazırlanmıştır. Her bir tampon çözeltisi için, öncelikle 50 mM derişime sahip stok çözeltiler hazırlanmış ve bu stok çözeltiler istenilen pH ve derişim düzeylerine ulaşmak amacıyla uygun oranlarda seyreltme işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu araştırmada anyonik bir sürfaktan olan $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ (sodyum dodesil sülfat) kullanılmıştır. Bu kimyasal madde, hassas bir şekilde tartılarak 50 mM konsantrasyonunda bir stok çözeltisi oluşturulmuştur. İlgili analizlerde ihtiyaç duyulan SDS konsantrasyonları, bu stok çözeltiden distile su ile uygun oranlarda seyreltilerek elde edilmiştir. Analizlerin güvenilirliğini ve sistem verimliliğini yükseltmek için, kullanılan tüm yıkama ve çalışma tamponları, uygulamadan evvel 0,45 μm gözenek boyutuna sahip membran filtrelerden geçirilerek içerdikleri partiküllerin miktarı en aza indirgenmiştir.

4.2.3. Optimizasyon çalışmaları

KE yönteminin optimize edilmesine yönelik çalışmalar kapsamında; tampon çözeltisinin bileşimi ve konsantrasyonu, pH değeri, organik çözücü oranı ile uygulanan elektriksel potansiyel gibi temel parametreler sistematik olarak değerlendirilmiştir. Bu optimizasyon süreci boyunca, model bileşikler olarak 1×10^{-6} M konsantrasyonlarında hazırlanmış LCM, LEV ve TPM çözeltileri kullanılmıştır. Her bir parametrenin elektroforetik ayırım üzerindeki etkisi, tekrarlanabilirlik, ayırma verimliliği, analiz süresi ve pik simetrisi gibi performans kriterleri dikkate alınarak detaylı bir şekilde incelenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, analizlerin hassasiyeti ve seçiciliğini maksimize edecek optimum koşullar belirlenmiştir.

4.2.3.1. Tampon bileşimi ve derişimi

KE yönteminde kullanılan çalışma tamponunun optimum bileşimi ve derişimini belirlemek amacıyla çok aşamalı bir optimizasyon çalışması yürütülmüştür. Bu kapsamda, ilk olarak sabit pH (9,00) değerine sahip 5 mM borat – 10 mM fosfat tampon sistemleri hazırlanarak içeriklerine sırasıyla 25, 30, 35 ve 37 mM konsantrasyonlarında sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenmiştir. Hazırlanan her tampon sisteminde, 1×10^{-6} M konsantrasyonda hazırlanmış LCM, LEV ve TPM çözeltileri 20 kV'lık sabit bir potansiyel altında üçer kez analiz edilmiştir. Elde edilen elektroforetik piklerin şekli, simetrisi ve analiz süreleri değerlendirilerek optimum SDS derişimi belirlenmiştir. SDS konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından, tampon sistemindeki borat derişimini optimize etmek amacıyla 37 mM SDS ve sabit 10 mM fosfat içeren tampon çözeltileri hazırlanmış; bu çözeltilerde borat derişimleri ise sırasıyla 5 mM, 7 mM ve 9 mM değerlerine getirilmiştir. Aynı şekilde, LCM, LEV ve TPM çözeltileri her bir sistemde 20 kV potansiyel altında üç kez analiz edilmiş, elde edilen veriler analiz süresi ve pik morfolojisi açısından karşılaştırılarak en uygun borat tampon konsantrasyonu saptanmıştır. Son aşamada ise, fosfat tamponunun derişiminin etkisini değerlendirmek amacıyla 37 mM SDS ve sabit 5 mM borat içeren sistemlerde fosfat derişimleri 5 mM, 10 mM ve 15 mM olacak şekilde ayarlanmıştır. Her tampon koşulunda yapılan üçlü analizler sonucunda elde edilen kromatografik pikler ve analiz süreleri değerlendirilerek, sistemin performansını maksimize eden optimum fosfat tampon konsantrasyonu belirlenmiştir.

4.2.3.2. pH

Çalışma tamponunun pH düzeyinin ayırma etkinliği üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, pH değerleri sırasıyla 8,00; 8.50 ve 9,00 olan tampon sistemleri hazırlanmıştır. Her üç tampon sistemi, 37 mM sodyum dodesil sülfat (SDS), 5 mM borat ve 10 mM fosfat içerecek şekilde formüle edilmiştir. Belirtilen her bir pH koşulunda, 20 kV potansiyel uygulanarak üçer kez analiz edilmiştir. Analiz sonuçları, pik morfolojileri ve migrasyon süreleri açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, analiz süresi ile ayırma kalitesini en iyi şekilde dengeleyen ve en yüksek pik çözünürlüğünü sağlayan tampon pH değeri, sistemin optimum çalışma koşulu olarak belirlenmiştir.

4.2.3.3. Organik çözücü oranı

Ayrıştırma etkinliği üzerinde çalışma tamponunda bulunan organik çözücü yüzdesinin nasıl bir rol oynadığını anlamak amacıyla, %0 ve %5 (v/v) izopropanol (IPA) ihtiva eden 37 mM SDS, 5 mM borat ve 10 mM fosfat (pH 8,00) tampon çözeltileri oluşturulmuştur. LCM, LEV ve TPM çözeltileri her bir sistemde 20 kV potansiyel altında üçer kez analiz edilmiştir. Pik morfolojileri ve analiz süreleri değerlendirilerek optimizasyon yapılmıştır.

4.2.3.4. Potansiyel

İdeal ayırma şartlarını belirlemek için LCM, LEV ve TPM çözeltileri 17,5; 20,0 ve 22,5 kV gerilimlerinde üç tekrar halinde analiz edilmiştir. Bulunan pik şekilleri ve analiz zamanları mukayese edilerek en uygun uygulama potansiyeli tespit edilmiştir.

4.2.3.5. Dalga boyu

En uygun uyarma ve emisyon dalga boylarını belirlemek amacıyla, farklı aralıklarda taramalar yapılmıştır: 220-310 nm, 300-360 nm, 250-310 nm, 220-360 nm ve 250-360 nm. LCM, LEV ve TPM çözeltileri, 37 mM SDS, 5 mM borat ve 10 mM fosfat (pH 8,00) tamponu ile 20 kV potansiyel uygulanarak üç tekrarlı enjeksiyonla analiz edilmiştir. Optimizasyon aşamasında, elde edilen kromatografik piklerin biçimleri ve gerçekleştirilen analizlerin süreleri değerlendirilmiştir. En uygun dalga boyunun belirlenmesi ise, elde edilen piklerin formları ve integralleri incelenerek yapılmıştır.

4.2.4. Validasyon çalışmaları

Geliştirilen KE yönteminin geçerliliği, seçicilik, doğruluk, doğrusallık, kesinlik, duyarlılık, sağlamlık ve kararlılık parametreleri açısından incelenmiştir. Validasyon sürecinde, pik normalizasyon yöntemi ($PN = AO_{\text{Madde}} / AO_{\text{İç standart}}$; $AO = \text{Alan}_{\text{madde}} / \text{Göç zamanı}_{\text{madde}}$) kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

4.2.4.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğini değerlendirmek amacıyla, incelenecek farmasötik dozaj formlarının matriks yapıları araştırılmış ve analizler yapılmıştır.

4.2.4.2. Doğrusallık

Analit derişimleri ile ortaya çıkan sinyaller arasındaki orantılı ilişkiyi incelemek için, LCM, LEV ve TPM'nin düşük molardan yüksek molara doğru artan, toplamda on üç farklı derişimde çözeltisi hazırlanmıştır. Bu derişimler, LCM, LEV ve TPM için belirli molar seviyelerinden başlayıp daha yüksek molar seviyelerine kadar olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu on üç çözelti, en uygun çalışma koşulları altında analiz edilmiştir:

$1,00 \times 10^{-8}$ M; $2,00 \times 10^{-8}$ M; $5,00 \times 10^{-8}$ M; $1,00 \times 10^{-7}$ M; $2,00 \times 10^{-7}$ M; $5,0 \times 10^{-7}$ M; $6,00 \times 10^{-7}$ M; $8,00 \times 10^{-7}$ M; $1,00 \times 10^{-6}$ M; $2,00 \times 10^{-6}$ M; $3,00 \times 10^{-6}$ M; $4,00 \times 10^{-6}$ M ve $5,00 \times 10^{-6}$ M

Yöntemin doğrusal tepki verdiği aralığın belirlenmesinin ardından, kalibrasyon işlemi için LCM, LEV ve TPM'nin altı farklı derişimde çözeltisi hazırlanmıştır:

$5,00 \times 10^{-8}$ M, $1,00 \times 10^{-7}$ M; $5,00 \times 10^{-7}$ M; $6,0 \times 10^{-7}$ M, $1,00 \times 10^{-6}$ M ve $3,00 \times 10^{-6}$ M

Hazırlanan bu altı çözelti, aynı gün içinde ve farklı günlerde olmak üzere üçer kez ölçülmüştür.

4.2.4.3. Kesinlik

Metodun kesinliğinin teyit etmek amacıyla 2×10^{-6} M derişimde LEV, LCM ve TPM çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerle, yöntemin aynı gün içerisinde ve günler arası değişen koşullarda ne kadar tutarlı sonuçlar verdiği incelenmiştir.

4.2.4.4. Doğruluk

Doğruluğun belirlenebilmesi amacıyla, LEV, LCM ve TPM'den oluşan üç farklı konsantrasyon setinde çözeltiler hazırlanmıştır; bu derişimler sırasıyla $1,0 \times 10^{-7}$ M, $1,0 \times 10^{-6}$ M ve $1,0 \times 10^{-5}$ M'dir. Her bir set, hem aynı gün içinde hem de farklı günlerde olmak üzere altı kez analize tabi tutulmuştur.

4.2.4.5. Duyarlılık

Yöntemin en düşük tespit ve ölçüm limitleri, sinyalin gürültüye oranlanması (S/N) metoduyla belirlenmiştir. Bu amaçla yapılan hesaplamalarda, LOD için S/N eşiği 3,3 olarak kabul edilirken, LOQ için bu eşik 10 olarak belirlenmiştir.

4.2.4.6. Kararlılık

Kararlılık parametresinin incelenmesi amacıyla $2,0 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde LEV, LCM ve TPM çözeltileri kullanılmıştır. Çözeltiler farklı saklama koşullarına tabi tutulduktan sonra analiz edilmiştir. Bu koşullar; $+4^{\circ}\text{C}$ 'de yirmi dört saat muhafaza etme, taze hazırlama, alüminyum folyoya sarılı olarak -18°C 'de iki hafta bekletme, -4°C 'de dondurma ve ardından oda sıcaklığında çözdürmedir. Her bir koşuldaki çözelti üçer kez analiz edilmiş ve elde edilen veriler karşılaştırılmıştır.

4.2.4.7. Sağlamlık

Sağlamlık verilerinin değerlendirilmesi amacıyla, son derişimleri $2,0 \times 10^{-6}$ M olan LEV, LCM ve TPM çözeltileri üzerinde, optimize edilen analiz koşullarında küçük değişiklikler yapılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Değıştirilen koşullar anyonik yüzey aktif madde derişimi, organik çözücü oranı ve pH olarak belirlenmiş ve her koşulda üçer analiz yapılmıştır. Analizin optimum koşullarda istatistiksel sonuçlarına bakılmıştır.

4.3. YPSK Yöntemi

4.3.1. Cihaz koşulları

YPSK tekniğinde hedef maddelerin birbirinden ayrılması için 4,6 mm iç çapına ve 150 mm uzunluğa sahip, 5 mikron partikül boyutundaki kolon Zorbax Eclipse Plus C18 sabit faz olarak tercih edilmiştir. Hareketli fazın hazırlanmasında A kanalında yüksek saflıkta su ve B kanalında ACN kullanılarak bir gradient program uygulanmıştır. Gradient elüsyon metoduyla, kolon sıcaklık değeri 25°C , 210 nm dalga boyunda ölçüm yapan bir DAD detektörü ve enjeksiyon hacim oranı 5 μL kullanılarak, tüm validasyon ve analizler 1 mL/dk akış hızıyla gerçekleştirilmiştir. Cihazın başlangıç yıkama aşamasında, kolon önce %70, ardından %50 ACN geçirilmiştir. Her analiz öncesinde, kolonun 20 dakika boyunca hareketli faz ile dengelenmesi sağlanmıştır. Analizlerin tamamlanmasının ardından, kolonun temizliği için 20 dakika boyunca %70 asetonitril ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

4.3.2. Optimizasyon çalışmaları

Yöntemde kullanılan LEV, LCM ve TPM çözeltileri, yöntem için hazırlanan stok çözeltilerden belirlenen oranlarda seyreltilerek elde edilmiştir. YPSK yönteminin

optimizasyonu sürecinde, dalga boyu, akış hızı, hareketli fazdaki organik çözücü oranı ve gradient program gibi temel parametreler detaylı bir şekilde değerlendirilmiştir.

4.3.2.1. Hareketli faz

Optimum hareketli faz belirlenmesi amacıyla, farklı derişimli fosfat tamponu, metanol-su, asetonitril-su karışımları içeren hareketli fazlar hazırlanmıştır. Bu hareketli fazlar kullanılarak, LEV, LCM ve TPM maddeleri, dakikada 1,0 mililitrelik bir akış hızı ve 210 nm bir dalga boyu kullanılarak üç kez analize tabi tutulmuştur. Analiz süresi ve elde edilen pik morfolojileri dikkate alınarak, su ve asetonitril içeren en uygun hareketli faz ve gradient programı belirlenmiştir.

4.3.2.2. Dalga boyu

LEV, LCM ve TPM'nin en iyi şekilde uyarılıp ışıma yapacağı dalga boylarını belirlemek amacıyla, farklı spektral bölgelerde (220-310 nm, 220-360 nm, 300-360 nm, 250-310 nm ve 250-360 nm) taramalar yapılmıştır. Bu analizler, ultra saf su ve asetonitril karışımından oluşan hareketli faz kullanılarak ve 1,0 ml/dk bir akış hızıyla, her bir madde için üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen piklerin şekilleri ve alanları incelenerek en uygun dalga boyu seçimi yapılmıştır.

4.3.2.3. Akış hızı

En uygun akış hızını saptamak amacıyla, su ve ACN içeren hareketli faz ile birlikte bir gradient programı uygulanarak, LEV, LCM ve TPM maddeleri için 0,80, 1,0 ve 1,2 ml/dk olmak üzere farklı akış hızlarında üçer analiz yapılmıştır. Analiz süreleri ve elde edilen piklerin morfolojik özellikleri incelenerek, en uygun akış hızı belirlenmiştir.

4.3.3. Validasyon

Validasyon çalışmaları, ICH Q2(R2), (2024) kılavuzuna uygun olarak yürütülmüştür. Optimum analiz koşullarının belirlenmesi amacıyla farklı sıcaklıklar, enjeksiyon hacimleri ve hareketli faz bileşimleri sistematik olarak değerlendirilmiştir. Bu yeni geliştirilen metodun analitik niteliklerinin güvenilirliğini ve pratik kullanımını göstermek amacıyla, seçicilik, doğrusallık, tekrarlanabilirlik, duyarlı olduğunu göstermek için saptama ve tayin sınırı, doğruluk, kararlılık, sağlamlık gibi analitik performans göstergeleri kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Validasyon hesaplamalarında,

maddeye ait pik alanının göç zamanı ile oranlanmasıyla elde edilen alan oranları kullanılmış ve analizlerde pik normalizasyon yöntemi uygulanmıştır.

4.3.3.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğini değerlendirmek amacıyla, analiz edilecek farmasötik dozaj formlarının matris ortamları incelenmiş ve analizler gerçekleştirilmiştir.

4.3.3.2. Doğrusallık

Analit konsantrasyonu ile elde edilen sinyallerin doğrusal ilişki gösterip göstermediğinin incelenmesi amacıyla $5,0 \times 10^{-8}$ M — $5,0 \times 10^{-5}$ M derişim intervalinde 11 derişimde LEV, LCM ve TPM çözeltisi hazırlanmıştır. Her üç madde $5,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-7}$, $2,0 \times 10^{-7}$, $5,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $2,0 \times 10^{-6}$, $3,0 \times 10^{-6}$, $4,0 \times 10^{-6}$, $5,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-5}$ ve $5,0 \times 10^{-5}$ M derişiminde hazırlanan çözeltiler optimum koşullar altında analiz edilmiştir. Çalışılabilecek doğrusal aralığın belirlenmesinin ardından LEV, LCM ve TPM'nin $1,0 \times 10^{-7}$ M — $1,0 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında 6 farklı çözeltisi üçer set olmak üzere hazırlanmış ve farklı gün verileri gözlemlenmiştir.

4.3.3.3. Kesinlik

Kesinliğinin gösterilmesi için 2×10^{-6} M derişimde LEV, LCM ve TPM çözeltileri hazırlanmış, bu çözeltilerin aynı analiz gününde ve farklı analiz günlerinde olacak şekilde analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.3.3.4. Doğruluk

Yöntemin doğruluğunun belirlenebilmesi amacıyla son derişimleri $1,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde LEV, LCM ve TPM'den oluşan üç ayrı çözelti grubu oluşturulmuş ve her bir grup, hem aynı gün içerisinde hem de farklı günlerde altışar defa analize tabi tutulmuştur.

4.3.3.5. Duyarlılık

Yöntemin ne kadar düşük miktarları saptayabildiği, sinyalin gürültüye oranlanması (S/N) metoduyla incelenmiştir. Bu incelemede, LOD için S/N oranı 3,3 ve LOQ için bu oran 10 olarak belirlenmiştir.

4.3.3.6. Kararlılık

Kararlılık parametresinin incelenmesi amacıyla $2,0 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde LEV, LCM ve TPM çözeltileri kullanılmıştır. Farklı saklama koşulları uygulanan çözeltiler analiz edilerek sonuçlar kıyaslanmıştır. Bu koşullar arasında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bir gün süreyle bekletme, yeni hazırlanmış olma durumu, alüminyum folyosuna sarılarak -18°C 'de iki hafta muhafaza etme, -4°C 'de dondurma ve ardından oda sıcaklığında çözünmelerini sağlama yer almaktadır. Her bir işlemde geçen çözelti üçer defa analiz edilmiştir.

4.3.3.7. Sağlamlık

Sağlamlık parametresinin değerlendirilmesi amacıyla, son derişimleri $2,0 \times 10^{-6}$ M olan LEV, LCM ve TPM çözeltileri üzerinde, optimize edilen analiz koşullarında küçük değişiklikler yapılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, değişken parametreler olarak akış hızı, kolon sıcaklığı ve dalga boyu belirlenmiş olup, her bir koşul altında üçer analiz uygulanmıştır. Elde edilen veriler, optimize edilmiş koşullarla istatistiksel olarak karşılaştırılarak yöntemin sağlamlığı değerlendirilmiştir.

4.4. Yöntemlerin Uygulanması

Farmasötik dozaj formlarının hazırlanması için LEV etkin maddesini içeren Epixx (500 mg) ve Keppra (250 mg) tabletleri ile Keppra (100 mg/mL) oral çözeltisi, LCM etkin maddesini içeren Benvida (50 mg) ve TPM etkin maddesini içeren Topamax (50 mg) ticari preparatları temin edilerek tartılmıştır. Her bir tablet grubundan 10 adet alınarak ayrı ayrı tartılmış, ardından ortalama ağırlıkları hesaplanmıştır. Tabletler havanda ezilerek toz haline getirilmiştir. Her bir tabletin içerdiği etkin madde miktarı dikkate alınarak, toz formdaki numunelerden ortalama bir tablet ağırlığında tartım yapılmış ve 10 mL metanol içerisinde çözdürülmüştür. Oral çözeltiden ise 1 mL alınarak, 10 mL metanol ile çözündürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözeltiler, homojen bir karışım elde etmek amacıyla 10 dakika boyunca vorteks karıştırıcıda karıştırılmış ve çözünme sürecini desteklemek amacıyla 10 dakika ultrasonik banyoya yerleştirilmiştir. Devamında, karışımlar 4000 rpm'de 10 dakika süreyle uygulanarak çöktürülmüş ve daha sonra $0,45 \mu\text{m}$ gözeneğe sahip bir zar filtreden geçirilerek katı parçacıklardan ayrılmıştır. Analizden evvel gerekli konsantrasyon ayarlamaları, elde edilen bu sıvılar üzerine ultra saf su eklenerek yapılmıştır.

5. BULGULAR

5.1. KE Yöntemi

5.1.1. Yöntemin Optimizasyonu

KE yöntemi ile deteksiyon, diyot dizinli detektör (DAD) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Literatürde yapılan taramalarda, LEV, LCM ve TPM'nin kantitatif analizlerinde 210–325 nm arasında farklı dalga boylarının kullanıldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada, DAD detektörü ile 200–325 nm spektral aralığında elde edilen kromatogramlar değerlendirilmiş ve üç bileşiğin tayini için 210 nm dalga boyunun en uygun dalga boyu olduğu sonucuna varılmıştır. Ayırma prosedürleri, 75 µm iç çapa, 40 cm etkin uzunluğa ve 48,5 cm toplam uzunluğa sahip üzeri kaplanmamış silika kapiler kullanılarak yapılmıştır. Tüm analiz süresince kapiler sıcaklığı sabit 20 °C'de tutulmuştur. Numune enjeksiyonları, 10 saniye süreyle 65 mbar basınç altında gerçekleştirilmiştir. Yöntemin optimize edilip valide edilmesinin ardından, geliştirilen KE yöntemi LEV, LCM ve TPM içeren farmasötik preparatlara uygulanmıştır. Bu kapsamda her bir analit için optimum analiz koşullarının belirlenmesi hedeflenmiş; bu doğrultuda çalışma tamponunun bileşimi ve konsantrasyonu, pH değeri, organik çözücü oranı ve uygulanan potansiyel gibi kritik parametreler sistematik olarak incelenmiştir. Optimizasyon çalışmaları sırasında, LEV, LCM ve TPM için ayrı ayrı $1,0 \times 10^{-6}$ M son derişime sahip çözeltiler hazırlanarak analizler gerçekleştirilmiştir.

LEV, LCM ve TPM'nin birlikte analiz edilebilmesi amacıyla, başlangıçta 3,0 ile 9,0 arasında değişen pH değerlerine sahip çeşitli tampon çözeltileri değerlendirmeye alınmıştır. Bu bağlamda, pH 3,0, 6,0 ve 7,0 seviyeleri için fosfat tamponları hazırlanırken, pH 8,0 ve 9,0 seviyeleri için ise borat tamponları tercih edilmiştir. Üç analitin uygun şekilde ayrılabilmesi amacıyla, literatürdeki mevcut öneriler dikkate alınarak, çalışma tamponuna anyonik sürfaktan olan SDS eklenmiştir. SDS içeren borat-fosfat karışımı tampon sisteminin kullanılması sonucunda, LEV, LCM ve TPM'ye ait sinyallerin uygun bir biçimde tespit edilebildiği görülmüştür.

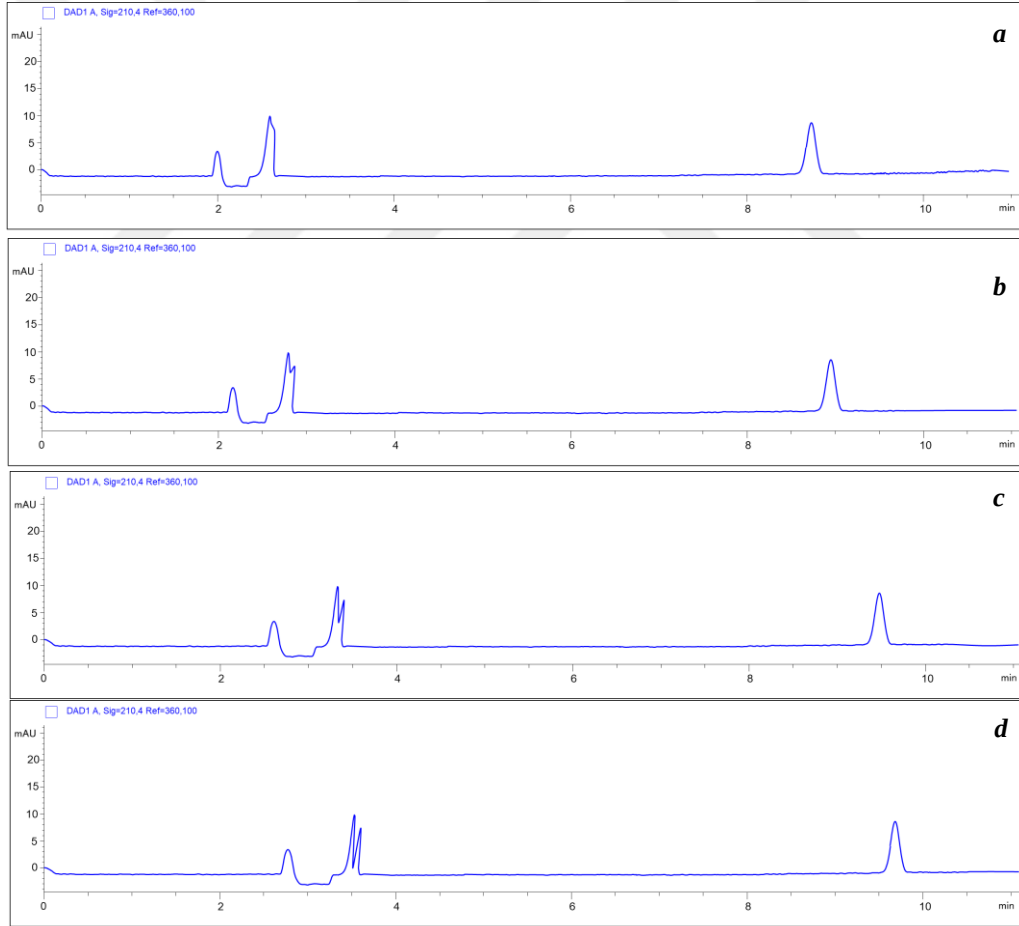
Yapılan ön denemelerde etkili bir ayırım sağlanmış olup, ileri analiz çalışmaları bu tampon sistemine dayalı olarak gerçekleştirilmiştir.

5.1.1.1. Tampon bileşimi ve derişimi

Çalışmada çözelti bileşenleri, konsantrasyonları optimize etmek için 5 mM borat ve 10 mM fosfat içeren bir tampon çözeltisi (pH 9,00), sırasıyla 25, 30, 35 ve 37 mM olmak üzere farklı SDS konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Daha sonra, 1×10^{-6} M konsantrasyonundaki LEV, LCM ve TPM çözeltilerinin analizi, 20 kV potansiyel uygulanarak üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen elektroferogramlar (şekil 5.1) incelendiğinde, SDS konsantrasyonundaki artışla ayırım çözünürlüğünde belirgin bir iyileşme gözlemlenmiştir. Bu bulgular ışığında, söz konusu analitlerin ayırımı için optimum SDS konsantrasyonunun 37 mM olduğu sonucuna varılmıştır.

şekil 5.1

Çalışma tamponunda anyonik süşfaktan derişimi incelemesi



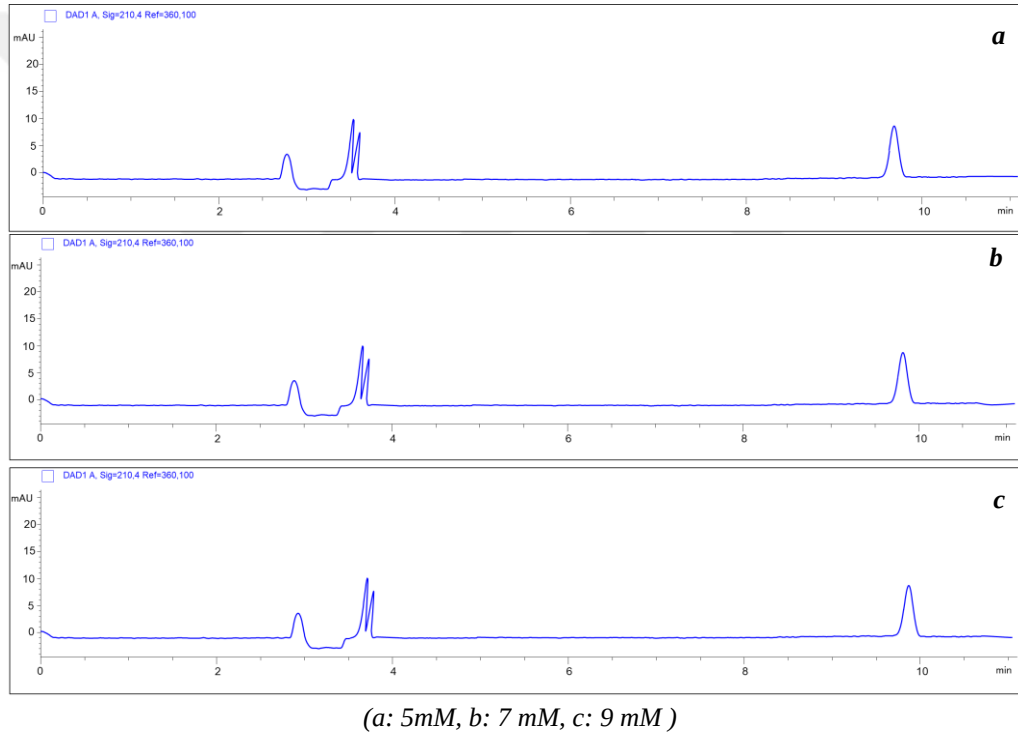
(a:25 mM; b:30 mM; c:35 mM; d:37 mM)

Tampon çözeltisindeki borat konsantrasyonunun analitik performans üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, sabit 37 mM SDS ve 10 mM fosfat konsantrasyonu içeren ve pH değerı 9,00 olan üç farklı tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerdeki borat konsantrasyonları sırasıyla 5 mM, 7 mM ve 9 mM'dir. Ardından, 1×10^{-6} M

konsantrasyonundaki LEV, LCM ve TPM çözeltilerinin analizleri, 20 kV potansiyel uygulanarak üçer tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen elektroferogramlar (Şekil 5.2) değerlendirildiğinde, borat konsantrasyonunun artmasıyla birlikte baseline kararlılığında ve pik şekillerinde iyileşmeler gözlemlenmiştir. Ancak, borat konsantrasyonundaki artışın analiz süresini uzattığı da tespit edilmiştir. Bu nedenle, pik morfolojisindeki iyileşme ile analiz süresindeki uzama arasındaki denge gözetilerek, deneylerde kullanılacak optimum borat konsantrasyonunun 5 mM olmasına karar verilmiştir.

Şekil 5.2

Çalışma tamponunda borat derişimi incelemesi

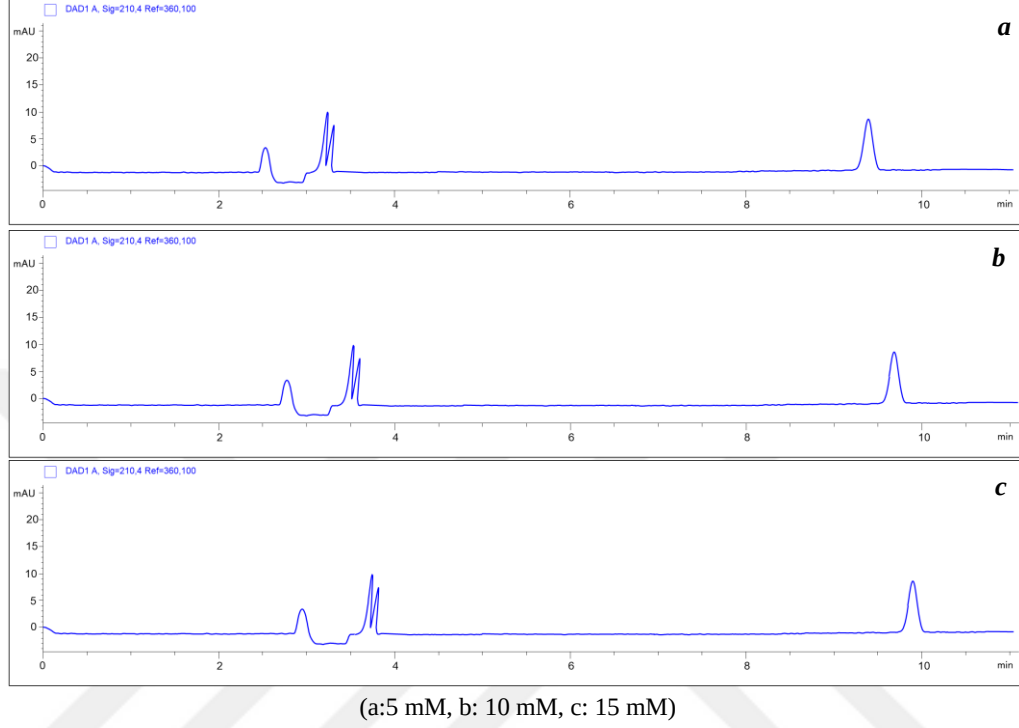


Sonraki aşamada, tampon çözeltisindeki fosfat konsantrasyonunun analitik sonuçlar üzerindeki etkisi sistematik olarak incelenmiştir. Bu amaçla, sabit 37 mM SDS ve 5 mM borat konsantrasyonlarına sahip ve pH değeri 9,00 olan üç farklı fosfat tamponu hazırlanmıştır. Söz konusu tampon çözeltilerindeki fosfat derişimleri ise kademeli olarak 5 mM, 10 mM ve 15 mM değerlerine getirilmiştir. Süreci takiben, 1×10^{-6} M konsantrasyonundaki LEV, LCM ve TPM çözeltilerinin analizleri, 20 kV potansiyel uygulanarak üçer tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen elektroferogramların (Şekil 5.3) detaylı incelenmesi sonucunda, pik morfolojisi açısından en elverişli fosfat konsantrasyonunun 10 mM olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, sonraki optimizasyon

çalışmalarının bu belirlenen 10 mM fosfat konsantrasyonu üzerinden yürütülmesine karar verilmiştir.

Şekil 5.3

Çalışma tamponunda fosfat derişimi incelemesi

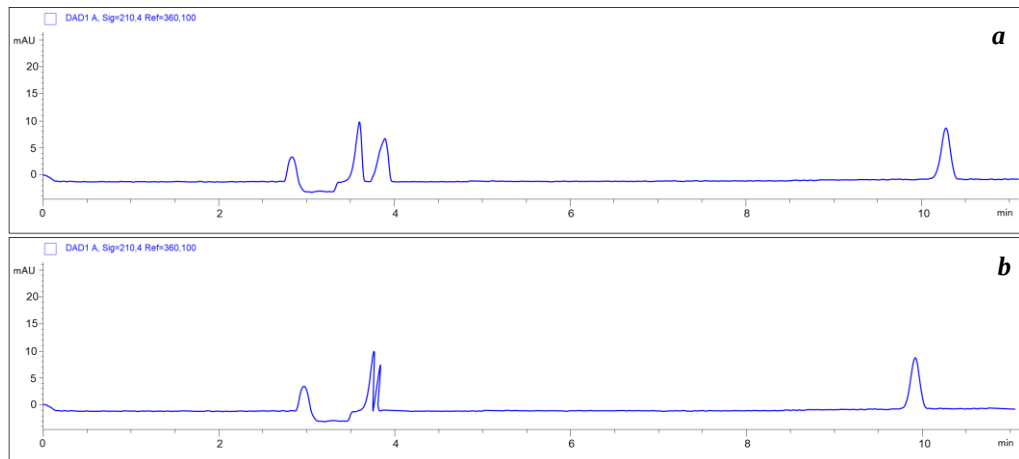


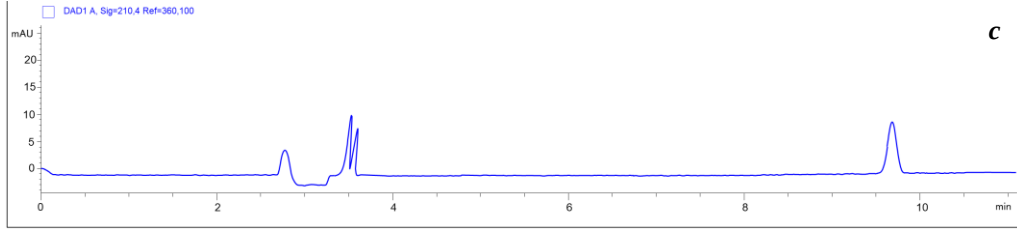
5.1.1.2. pH

Bu kısımda, çalışma tamponunun pH değerinin 1×10^{-6} M derişimindeki LEV, LCM ve TPM'nin elektroforetik davranışları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, 37 mM SDS, 5 mM borat ve 10 mM fosfat içeren ve pH değerleri sırasıyla 8,00; 8,50 ve 9,00 olan üç farklı tampon çözeltisi hazırlanmıştır.

Şekil 5.4

Çalışma tamponu pH incelemesi





(a: 8,0; b: 8,5; c: 9,0)

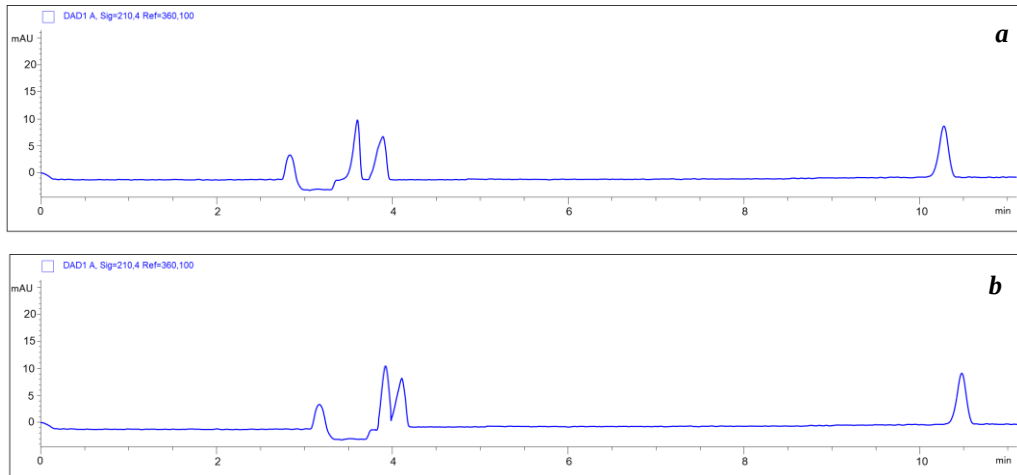
Hazırlanan bu farklı pH değerlerine sahip tamponlar kullanılarak, 1×10^{-6} M konsantrasyonundaki LEV, LCM ve TPM çözeltilerinin analizleri üçer tekrar halinde gerçekleştirilmiş ve elde edilen elektroferogramlar Şekil 5.4'te sunulmuştur. Elde edilen analiz sonuçları, incelenen analitlerin tam olarak ayrılmasının pH 8,00 değerinde sağlandığını göstermiştir.

5.1.1.3. Organik çözücü yüzdesi

Bu noktada, IPA'nın tampona ilave edilmesinin ayırım üzerindeki potansiyel etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, %0 ve %5 (h/h) oranlarında IPA içeren, 37 mM SDS ve 5 mM borat ile 10 mM fosfat tamponu (pH 8,00) hazırlanmıştır. Ardından, 1×10^{-6} M konsantrasyonundaki LEV, LCM ve TPM çözeltileri, 20 kV potansiyel uygulanarak her bir numune üç defa analiz edilmiş olup, bu analizler neticesinde oluşan elektroferogramlar Şekil 5.5'te gösterilmektedir. Bu analizler sonucunda, çalışma tamponundaki organik çözücü (IPA) miktarının artırılmasıyla pik morfolojisinde iyileşmeler gözlemlenmekle birlikte, analitlerin ayırımında olumsuz bir etki ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla, IPA ilavesinin piklerin ayırımını güçleştirdiği tespit edilmiş ve bu nedenle sonraki analizlerde organik çözücü kullanılmamasına karar verilmiştir.

Şekil 5.5

Tampon çözeltisinde organik çözücü oranlarının kıyaslanması (a: %0, b: %5)

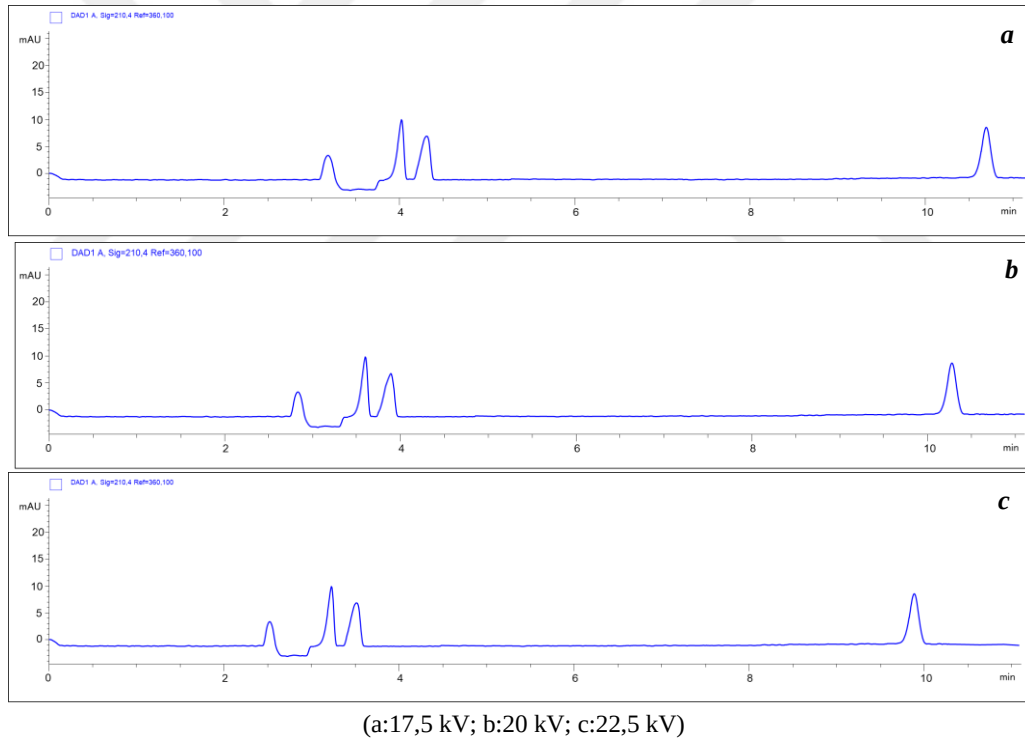


5.1.1.4. Uygulanan potansiyel

Analiz sırasında uygulanacak potansiyelin optimizasyonu amacıyla, 1×10^{-6} M konsantrasyonundaki LEV, LCM ve TPM çözeltileri, optimum tampon koşulları (37 mM SDS içeren 5 mM borat - 10 mM fosfat, pH 8,00) altında farklı potansiyellerde 17,5 kV; 20 kV ve 22,5 kV olmakla üçer kez deney yapılmıştır. Bu analizlere ait elektroferogramlar Şekil 5.6'da sunulmaktadır. KE yönteminde, daha yüksek potansiyellerin uygulanması genellikle ayrımların daha kısa sürede tamamlanmasını sağlar. Bu çalışmada da potansiyel artışıyla birlikte analiz sürelerinde kısaltmalar gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, yüksek potansiyelin neden olabileceği Joule ısınması gibi potansiyel sorunları minimize etmek amacıyla, sonraki çalışmaların 20,0 kV potansiyelinde yürütülmesine karar verilmiştir.

Şekil 5.6

Uygulanan potansiyelin incelemesi



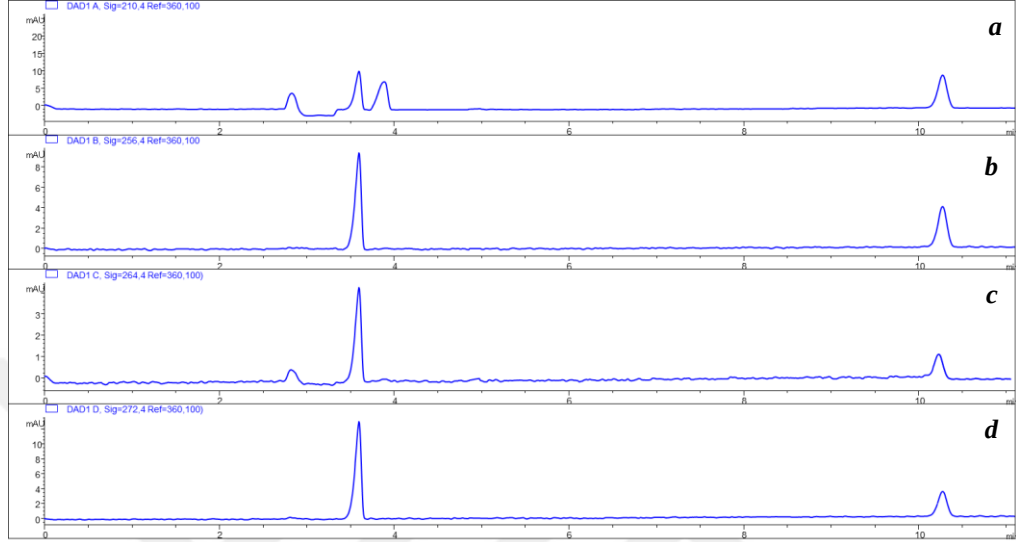
5.1.1.5. Dalga boyu

LEV, LCM ve TPM'nin optimum uyarma ve yayma dalga boylarının belirlenmesi amacıyla farklı dalga boylarında analizler gerçekleştirilmiştir. Değişik dalga boylarında kaydedilen elektroferogram sonuçları Şekil 5.7'de gösterilmiştir. İncelenen kromatogramlar sonucunda, her üç maddenin de piklerinin belirgin bir şekilde gözlemlendiği ve pik alanı ile morfolojisi açısından en uygun dalga boyunun 210 nm

olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, sonraki tüm analizler bu belirlenen 210 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Şekil 5.7

Uygulanan dalga boylarının incelemesi (a:210 nm, b:256 nm, c:264 nm, d: 272 nm)

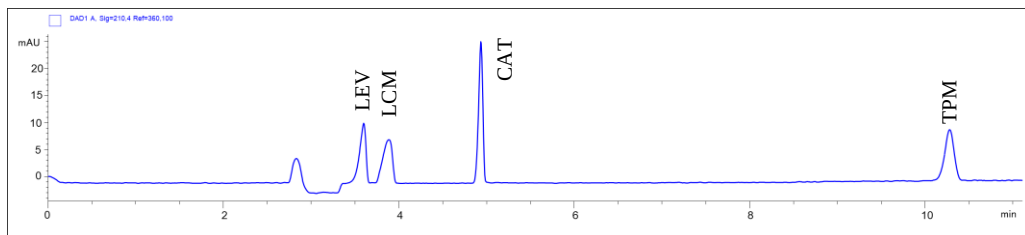


5.1.1.6. İç standart

Detaylı optimizasyon süreçlerinin ardından, LEV, LCM ve TPM'nin analizi için ideal koşullar belirlenmiştir: pH 8,00 değerinde 37 mM SDS, 5 mM borat ve 10 mM fosfat içeren tampon, 210 nm dalga boyunda deteksiyon ve 20,0 kV potansiyel uygulanması. Bu koşullar altında tatmin edici bir ayırım elde edilmiştir. Yöntemin güvenilirliğini artırmak amacıyla bir iç standart (IS) arayışı gerçekleştirilmiş ve incelenen çeşitli bileşikler (ketoprofen, ibuprofen, parasetamol, etil paraben, katekol, granisetron ve zofenopril) arasından göç zamanı ve pik morfolojisi açısından en uygun iç standart olarak katekol (CAT) tespit edilmiştir. Belirlenen optimum koşullar altında analiz edilen LEV, LCM, TPM ve iç standart olarak kullanılan CAT'e ait elektroferogram Şekil 5.8'de sunulmaktadır.

Şekil 5.8

Optimum şartlarda LEV, LCM, TPM ile CAT (IS)'ye ait elektroferogram



Optimum koşullar uygulandığında LEV, LCM, TPM ve CAT (IS)'nin göç zamanı sırasıyla 3,61 dk; 3,97 dk; 10,62 dk ve 4,82 dk olarak belirlenmiştir.

5.1.2. Validasyon

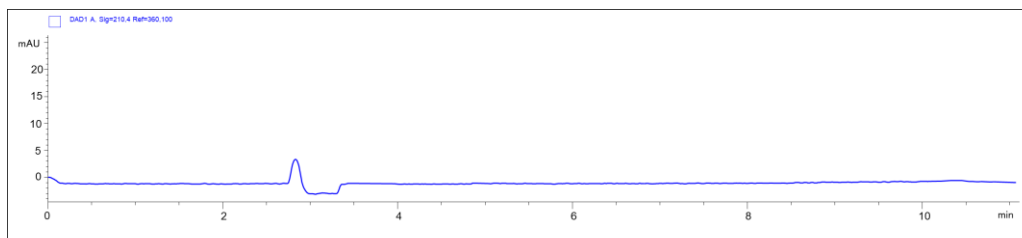
Optimum koşullar belirlendikten sonra, geliştirilen analitik yöntemin geçerliliğini teyit etmek amacıyla kapsamlı validasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmalar kapsamında seçicilik, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık (saptama ve tayin sınırları), kararlılık ve sağlamlık gibi temel validasyon parametreleri değerlendirilmiştir. Validasyon parametrelerinin hesaplanmasında pik normalizasyon yöntemi kullanılmış ve elde edilen sonuçlar bu yöntem doğrultusunda analiz edilmiştir. Buna ek olarak, yöntemin sistem uygunluğunu kontrol etmek amacıyla, teorik tabaka sayısı, ayrılma gücü (çözünürlük değeri), kapasite faktörü, seçicilik ve pik asimetri faktörü gibi değerler hesaplanmıştır. Tüm istatistiksel hesaplamalar Microsoft Excel yazılımı kullanılarak yapılmış ve yöntemin performansı, Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) Q2(R2) kılavuzunun (2024) güncel versiyonunda belirtilen kabul kriterleri çerçevesinde değerlendirilmiştir.

5.1.2.1. Seçicilik

Oluşturulan metodun seçiciliğini incelemek için, yöntemin kullanılacağı öngörülen farmasötik dozaj formlarının matris yapıları üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, yöntemin hedef analitleri (LEV, LCM ve TPM) matris bileşenlerinden ayırt edebilme ve seçici olarak tespit edebilme kapasitesini göstermek için gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, ilgili matris ortamına ait blank elektroferogram Şekil 5.9'da sunulmaktadır. Elektroferogramda görüldüğü üzere, yalnızca hedef bileşenlere ait belirgin pikler tespit edilmekte olup, diğer bileşenlerden kaynaklanan interferanslar gözlemlenmemektedir, bu da yöntemin yüksek seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Şekil 5.9

Matris ortamlarına ait blank elektroferogramı



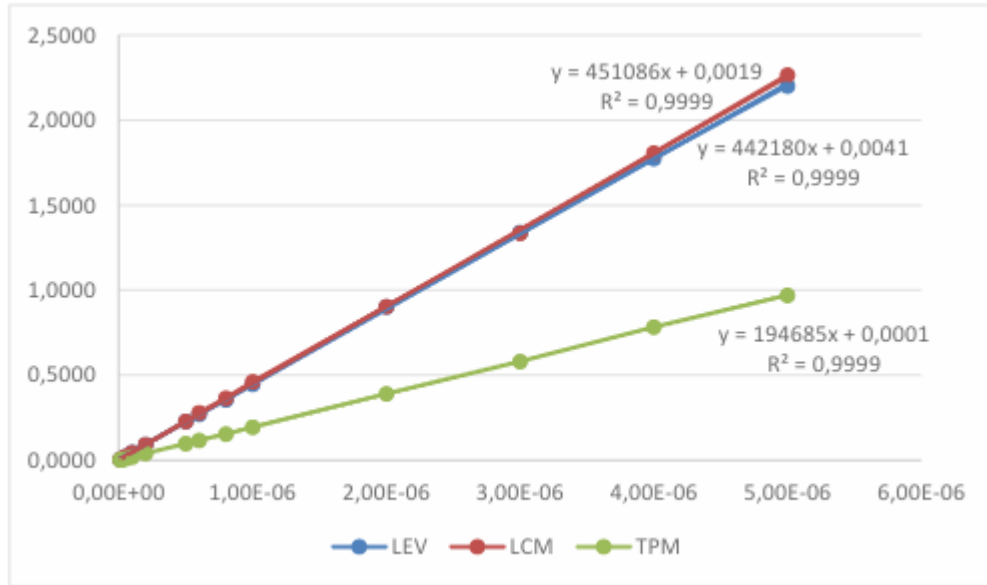
5.1.2.2. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallık çalışmaları kapsamında; 1×10^{-8} M — 5×10^{-6} M aralığında 13 farklı LEV, LCM, ve TPM çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; LEV, LCM, ve TPM için yöntemün doğrusal olduğu aralık $5,0 \times 10^{-8}$ M — $3,0 \times 10^{-6}$ M belirlenmiş, her üç maddenin de korelasyon katsayı değeri ($r=0,9999$) çok yüksek olarak bulunmuştur.

LEV için doğru $y=442180x+0,0041$; LCM için doğru $y=451086x+0,0019$; TPM için ise doğru $y=194685x+0,0001$ şeklinde olmuştur. Elde edilen bu doğrusallık grafikleri Şekil 5.10'da gösterilmektedir.

Şekil 5.10

KE yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi



Doğrusal aralığın tespiti sonrasında, LEV, LCM ve TPM için $5,0 \times 10^{-8}$ M ile $3,0 \times 10^{-6}$ M konsantrasyonları arasında değişen altı farklı standart çözelti hazırlanmış ve bu çözeltilerin her biri üç tekrar olacak şekilde analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin gün içi (aynı gün içinde yapılan tekrarlı analizler) ve günler arası (farklı günlerde yapılan analizler) kesinliğini değerlendirmek amacıyla istatistiksel analizler yapılmış, söz konusu analizlerin bulguları LEV (Tablo 5.1), LCM (Tablo 5.2); ve TPM (Tablo 5.3) için detaylı bir şekilde tablolarda verilmiştir.

Tablo 5.1*LEV'in KE yöntemi ile kalibrasyon verileri*

Günler arası				Tüm Günler (n=18)	
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)		
a	439660	442293	445953	441103	442619
b	0,00213	0,00089	-0,00045	-0,00081	-0,00114
r	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

a: eğim, b: kesim, r: korelasyon katsayısı, n: deney sayısı

Tablo 5.2*LCM'in KE yöntemi ile kalibrasyon verileri*

Günler arası				Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	446161	446250	454898	449103
b	0,00691	0,00672	0,00357	0,00574
r	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

a: eğim, b: kesim, r: korelasyon katsayısı, n: deney sayısı

Tablo 5.3*TPM'in KE yöntemi ile kalibrasyon verileri*

Günler arası				Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	193888	194726	194870	194495
b	0,00032	0,00001	0,00008	0,00014
r	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

a: eğim, b: kesim, r: korelasyon katsayısı, n: deney sayısı

Yapılan istatistiksel incelemeler neticesinde, aynı gün içinde ve farklı günlerde yürütülen çalışmalardan elde edilen doğrusallık grafiklerinin yüksek korelasyon katsayılarına sahip doğrusal ilişkiler sergilediği tespit edilmiştir. Bu bulgu, yöntemin doğrusallığını ve kalibrasyon başarısını teyit etmektedir.

5.2.2.3. Kesinlik

Yöntemin kesinliğinin gösterilmesi için 2×10^{-6} derişimde LEV, LCM ve TPM içeren çözeltiler hazırlanmış ve bu çözeltilerin hem aynı gün içindeki hem de farklı günler arasındaki analizleri yapılmış ve sonuçları LEV (Tablo 5.4), LCM (Tablo 5.5); ve TPM (Tablo 5.6) için aşağıdaki tablolarda sunulmuştur.

Tablo 5.4

LEV'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
ort	0,8876	0,8857	0,8844	0,8859
ss	0,0084	0,0085	0,0079	0,0079
%BSS	0,9506	0,9604	0,8958	0,8926
GA %95	$\pm 0,0088$	$\pm 0,0089$	$\pm 0,0083$	$\pm 0,0586$

ort (PN): ortalama (pik normalizasyonu), ss: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı, n: deney sayısı

Tablo 5.5

LCM'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
ort	0,9145	0,9178	0,9180	0,9168
ss	0,0036	0,0046	0,0037	0,0041
%BSS	0,3900	0,4984	0,4022	0,4442
GA %95	$\pm 0,0037$	$\pm 0,0048$	$\pm 0,0038$	$\pm 0,0020$

ort: ortalama (pik normalizasyonu), ss: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı, n: deney sayısı

Tablo 5.6*TPM'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri*

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
ort	0,3888	0,3897	0,3899	0,3895
ss	0,0020	0,0021	0,0016	0,0019
%BSS	0,5061	0,5434	0,4127	0,4786
GA %95	±0,0021	±0,0022	±0,0017	±0,0010

ort: ortalama (pik normalizasyonu), ss: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı, n: deney sayısı

Elde edilen istatistiksel veriler incelendiğinde, tüm %BSS değerlerinin %2 eşiğinin altında olduğu görülmüş ve bu sonuç, geliştirilen metodun söz konusu üç analitin tayini açısından da kesin sonuçlar verdiğini ortaya koymuştur.

5.2.2.4. Doğruluk

Geliştirilen metodun doğruluğunu değerlendirmek amacıyla, 1×10^{-7} M; 1×10^{-6} M ve 1×10^{-5} M derişim düzeylerinde LEV, LCM ve TPM çözeltileri ile hem gün içi hem de günler arası olmak üzere her bir düzeyde altı analiz gerçekleştirilmiştir. Değerlendirmelerin sonuçları LEV (Tablo 5.7), LCM (Tablo 5.8); ve TPM (Tablo 5.9) için aşağıdaki tablolarda sunulmuştur.

Tablo 5.7*LEV'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri*

Eklenen (M)		$1,00 \times 10^{-7}$	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-5}$
I gün	ort+ss	$1,01 \times 10^{-7} \pm 1,67 \times 10^{-9}$	$9,91 \times 10^{-7} \pm 5,70 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-5} \pm 0,46 \times 10^{-8}$
	%GK	100,20	99,05	100,48
	%BH	0,2031	0,9460	0,4824
	%BSS	1,6633	0,5754	0,0459
II gün	ort+ss	$1,02 \times 10^{-7} \pm 1,39 \times 10^{-9}$	$9,91 \times 10^{-7} \pm 6,08 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-5} \pm 1,24 \times 10^{-7}$
	%GK	101,49	99,10	101,31
	%BH	1,4946	0,8968	1,3066
	%BSS	1,3681	0,6134	1,2236

Tablo 5.7 (Devam)

LEV'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri

III gün	ort+ss	$1,01 \times 10^{-7} \pm 1,44 \times 10^{-9}$	$9,90 \times 10^{-7} \pm 7,35 \times 10^{-9}$	$9,94 \times 10^{-6} \pm 1,20 \times 10^{-7}$
	%GK	101,69	99,02	99,46
	%BH	1,6876	0,9811	0,5433
	%BSS	1,4172	0,7425	1,2095
Tüm günler (n=18)	ort+ss	$1,01 \times 10^{-7} \pm 1,57 \times 10^{-9}$	$9,90 \times 10^{-7} \pm 5,73 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-5} \pm 1,36 \times 10^{-7}$
	%GK	101,13	99,01	100,17
	%BH	1,1284	0,9939	0,1679
	%BSS	1,5493	0,5789	1,3609

ort: ortalama, ss: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, BH: bağıl hata, GK: geri kazanım, n: deney sayısı

Tablo 5.8

LCM'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri

Eklenen (M)		$1,00 \times 10^{-7}$	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-5}$
I gün	ort+ss	$9,40 \times 10^{-8} \pm 1,06 \times 10^{-9}$	$9,90 \times 10^{-7} \pm 3,07 \times 10^{-9}$	$9,95 \times 10^{-6} \pm 5,93 \times 10^{-8}$
	%GK	99,39	99,03	99,54
	%BH	0,6094	0,9652	0,4571
	%BSS	1,0686	0,3099	0,5957
II gün	ort+ss	$1,01 \times 10^{-7} \pm 1,70 \times 10^{-9}$	$9,93 \times 10^{-7} \pm 4,63 \times 10^{-9}$	$9,98 \times 10^{-6} \pm 4,80 \times 10^{-8}$
	%GK	101,26	99,32	99,64
	%BH	1,2599	0,6781	0,1598
	%BSS	1,6806	0,4660	0,4809
III gün	ort+ss	$9,096 \times 10^{-8} \pm 5,60 \times 10^{-10}$	$9,93 \times 10^{-7} \pm 5,55 \times 10^{-9}$	$9,96 \times 10^{-6} \pm 6,36 \times 10^{-8}$
	%GK	99,59	99,31	99,64
	%BH	0,4148	0,6871	0,3638
	%BSS	0,5619	0,5592	0,6386
Tüm günler (n=18)	ort+ss	$1,001 \times 10^{-7} \pm 1,42 \times 10^{-9}$	$9,92 \times 10^{-7} \pm 4,47 \times 10^{-9}$	$9,97 \times 10^{-6} \pm 5,54 \times 10^{-8}$
	%GK	100,08	99,22	99,67
	%BH	0,7856	0,7768	0,3269
	%BSS	1,4206	0,4510	0,5556

Tablo 5.9*TPM'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri*

	Eklenen (M)	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-5}$
I gün	ort+ss	$9,90 \times 10^{-8} \pm 2,70 \times 10^{-10}$	$9,95 \times 10^{-7} \pm 5,19 \times 10^{-9}$	$9,99 \times 10^{-6} \pm 5,42 \times 10^{-8}$
	%GK	99,03	99,51	99,97
	%BH	0,9691	0,4927	0,0339
	%BSS	0,2724	0,5213	0,5419
II gün	ort+ss	$9,92 \times 10^{-8} \pm 2,86 \times 10^{-10}$	$1,00 \times 10^{-6} \pm 9,00 \times 10^{-9}$	$1,00 \times 10^{-5} \pm 6,41 \times 10^{-8}$
	%GK	99,17	100,32	100,20
	%BH	0,8336	0,3246	0,2037
	%BSS	0,2888	0,8972	0,6397
III gün	ort+ss	$9,93 \times 10^{-8} \pm 5,70 \times 10^{-10}$	$9,97 \times 10^{-7} \pm 5,80 \times 10^{-9}$	$1,00 \times 10^{-5} \pm 6,95 \times 10^{-8}$
	%GK	99,28	99,64	100,10
	%BH	0,7239	0,3601	0,097
	%BSS	0,5745	0,5822	0,6943
Tüm günler (n=18)	ort+ss	$9,92 \times 10^{-8} \pm 3,90 \times 10^{-10}$	$9,98 \times 10^{-7} \pm 7,43 \times 10^{-9}$	$1,00 \times 10^{-5} \pm 5,99 \times 10^{-8}$
	%GK	99,16	99,82	100,09
	%BH	0,8422	0,1761	0,089
	%BSS	0,3930	0,7444	0,5988

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, üç maddeye ait tüm derişim düzeylerinde gerçekleştirilen ölçümlerde yüzde geri kazanım değerlerinin %99,01 ile %101,69 arasında değiştiğı belirlenmiştir. Ayrıca, her üç madde için tüm derişim seviyelerinde tüm %BSS değerlerinin %2 eşiğinin altında olduğu görülmüş ve bu sonuç, geliştirilen metodun söz konusu üç analitin tayini açısından da hem yüksek doğruluğa hem de iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

5.2.2.5. Duyarlılık

Çalışmanın duyarlılık değerlendirmesi kapsamında yapılan hesaplamalarda, sinyal/gürültü (S/N) oranları esas alınmıştır. LEV, LCM ve TPM için geliştirilen yönteme ait saptama (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) verileri aşağıda gösterilmiştir (Tablo 5.10)..

Tablo 5.10*KE yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin duyarlılık verileri*

	LEV	LCM	TPM
LOD	$1,06 \times 10^{-8}$ M	$1,03 \times 10^{-8}$ M	$9,17 \times 10^{-9}$ M
LOQ	$3,23 \times 10^{-8}$ M	$3,13 \times 10^{-8}$ M	$2,78 \times 10^{-8}$ M

Elde edilen bu değerler, yöntemin düşük derişim düzeylerinde dahi analitleri güvenilir şekilde tespit edebildiğini ve yüksek duyarlılığa sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

5.2.2.6. Kararlılık

Yöntemin kararlılığını değerlendirmek amacıyla LEV, LCM ve TPM çözeltileri çeşitli koşullarda test edilmiştir. Bu kapsamda çözeltiler taze olarak hazırlanmış, -18°C 'de karanlık ortamda 14 gün süreyle saklanmış, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta 24 saat bekletilmiş ve ayrıca dondurulup çözündürme işlemine tabi tutulmuştur. Uygulanan bu farklı saklama koşullarına ait analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiş olup, veriler (Tablo 5.11) detaylı olarak hesaplanarak sunulmuştur.

Tablo 5.11*KE yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin kararlılık verileri*

		taze çözelti	24 saat	14 gün	donmuş-çözölmüş
LEV	ort	0,8817	0,8787	0,9041	0,8821
	ss	0,0003	0,0017	0,0094	0,0009
	%BSS	0,0304	0,1897	1,0382	0,1019
	%GK	99,98%	99,63%	102,51%	100,02%
LCM	ort	0,9135	0,9141	0,9153	0,9163
	ss	0,0008	0,0015	0,0014	0,0015
	%BSS	0,0881	0,1656	0,1503	0,1588
	%GK	99,98%	100,04%	100,17%	100,28%
TPM	ort	0,3888	0,3887	0,3894	0,3888
	ss	0,0007	0,0004	0,0007	0,0004
	%BSS	0,1679	0,0993	0,1799	0,0973
	%GK	100,10%	100,07%	100,25%	100,11%

ort: ortalama, ss: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, %GK: geri kazanım

İncelenen zaman aralığında elde edilen %BSS ve %GK değerlendirildiğinde, LEV, LCM ve TPM çözeltilerinin yüksek kararlı verilerine ulaşılmıştır.

5.2.2.7. Sağlamlık

Sağlamlık çalışmaları kapsamında optimum analiz koşullarında yapılan küçük değişikliklerin analiz sonuçlarını nasıl etkilendiği incelenmiştir.

Tablo 5.12

KE yönteminin sağlamlık verileri

	Anyonik süpfaktan derişimi	pH	Dalga boyu	LEV		LCM		TPM	
				ort	%BSS	ort	%BSS	ort	%BSS
Optimum Koşullar	37	8,00	210 nm	0,8817	0,0304	0,9135	0,0881	0,3888	0,1679
1. Koşul	36	8,00	210 nm	0,8787	0,1897	0,9141	0,1656	0,3887	0,0993
2. Koşul	38	8,00	210 nm	0,8886	1,1517	0,9158	0,0734	0,3887	0,0800
3. Koşul	37	7,90	210 nm	0,8847	0,8461	0,9172	0,6340	0,3908	0,6173
4. Koşul	37	8,10	210 nm	0,8858	0,7293	0,9205	0,6239	0,3907	0,5720
5. Koşul	37	8,00	209 nm	0,8840	0,6483	0,9172	0,2342	0,3890	0,3897
6. Koşul	37	8,00	211 nm	0,8827	0,1736	0,9173	0,3286	0,2576	0,2056

ort: ortalama, BSS: bağıl standart sapma

Optimum koşullarda küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilen analizlerin sonuçları optimum koşullar altında gerçekleştirilen analizlerin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Deneyler 3'er tekrar yapılmış sonuçlara ait istatistiksel değerlendirmeler sunulmuştur (Tablo 5.12). Hesaplanan %BSS değerlerinin %2'nin altında kalması, yöntemde uygulanan küçük değişikliklerin analiz sonuçları üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Bu durum, önerilen yöntemin sağlamlık açısından güvenilir ve tutarlı olduğunu ortaya koymaktadır.

5.2.3. Sistem uygunluk testleri

Geliştirilen metodun sistem performansını değerlendirmek için çeşitli kromatografik parametreler hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar, önceden belirlenmiş kabul edilebilirlik sınırlarıyla karşılaştırılmıştır (Tablo 5.13).

Tablo 5.13*KE yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin sistem uygunluk verileri*

Parametre	LEV	LCM	TPM	Beklenen Değer
M_t	3,61	3,97	10,62	
k'	2,01	2,31	7,85	2 - 10
N	32945	26607	83298	> 2000
A_s	1,15	0,98	1,13	0,95 - 1,2
α		1,15	2,59	>1
R_s		2,42	28,59	>1,5

M_t : alıkonma zamanı, k' : kapasite faktörü, N: teorik tabaka sayısı, A_s : asimetri faktörü, α : seçicilik faktörü, R_s : ayırım gücü faktörü

5.3. YPSK Yöntemi

Yeni bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem, optimize edilerek uluslararası validasyon kriterlerine uygun olarak doğrulanmış ve analitik geçerliliği kanıtlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, yöntemin güvenilir, hassas ve tekrarlanabilir olduğunu ortaya koymuştur.

5.3.1. Optimizasyon

YPSK yönteminin optimizasyonu sürecinde, analitik performansı artırmak amacıyla hareketli fazın bileşimi, akış hızı ve dedeksiyon dalga boyu gibi temel kromatografik parametreler sistematik olarak değerlendirilmiştir. Farklı oranlarda hazırlanan hareketli fazlar ile çeşitli akış hızları test edilerek, maksimum duyarlılık ve tekrarlanabilirlik sağlayan koşullar belirlenmiştir. Ayrıca, dalga boyu seçiminde hedef analitin maksimum absorpsiyon gösterdiği bölge dikkate alınarak, yöntemin seçiciliği ve doğruluğu önemli ölçüde iyileştirilmiştir.

5.3.1.1. Hareketli faz

Yapılan literatür taraması doğrultusunda, LEV, LCM ve TPM analizlerinde tampon çözelti içeren hareketli fazların kullanımı değerlendirilmiştir. İzokratik koşullarda fosfat tamponu, borat tamponu ve metanol-su içeren hareketli fazlar test edilmiş, ancak analitik parametreler açısından istenilen performans elde edilememiştir. Bu nedenle, su ve asetonitril içeren gradient programlı bir hareketli fazın daha uygun olduğuna karar verilmiş ve çalışmalar bu koşullarda sürdürülmüştür. Uygulanan analizler sonucunda, elde edilen pik morfolojisi ve maddelerin alıkonma süreleri detaylı olarak incelenmiştir. Seçilmiş hareketli faz gradient programı verilmiştir (Tablo 5.14).

Tablo 5.14

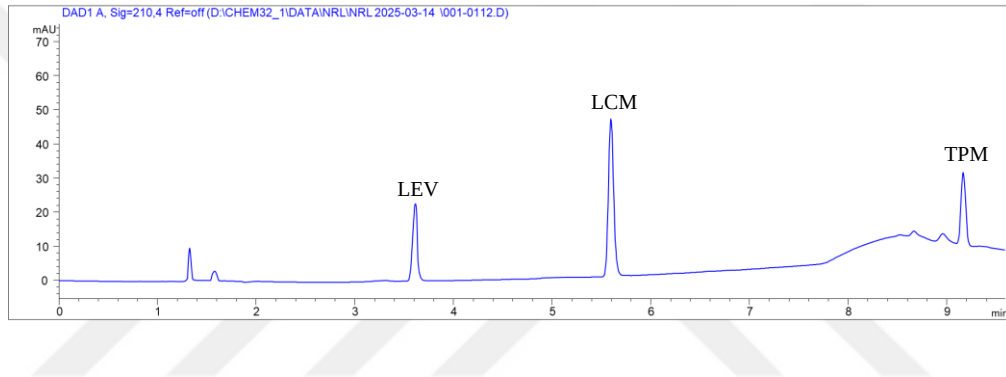
Hareketli faz gradient programı

Dakika	Hareketli faz oranı	
	A (Su)	B (ACN)
0	90%	10%
5,7	50%	50%
6	10%	90%

Hareketli faz gradient programı ile yapılan analize ait kromatogram Şekil 5.11’de gösterilmektedir.

Şekil 5.11

Hareketli faz gradient programı ile yapılan analize ait kromatogram

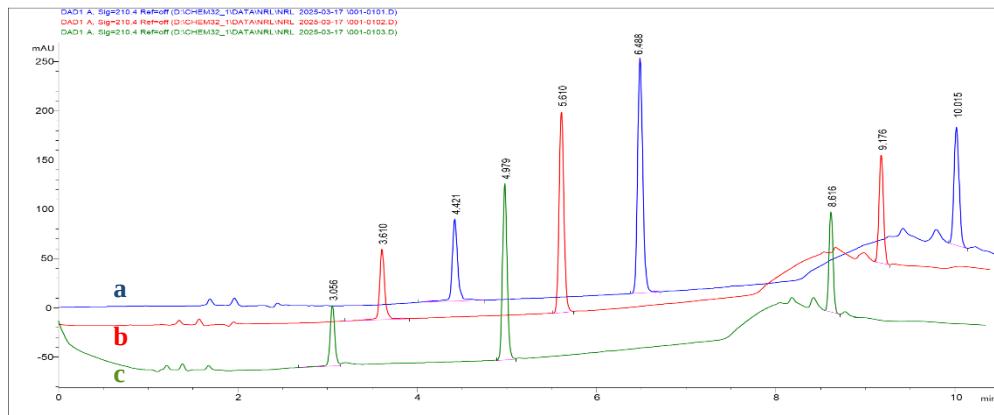


5.3.1.2. Akış hızı

Mobil fazın akış hızını belirlemek için analizler 0,8 mL/dk, 1,0 mL/dk ve 1,2 mL/dk koşullarda yapılmıştır. Bu analizlere ait kromatogramlar Şekil 5.12`de sunulmaktadır.

Şekil 5.12

Akış hızı incelenmesi (a: 0,8 mL/dk, b: 1,0 mL/dk, c: 1,2 mL/dk)



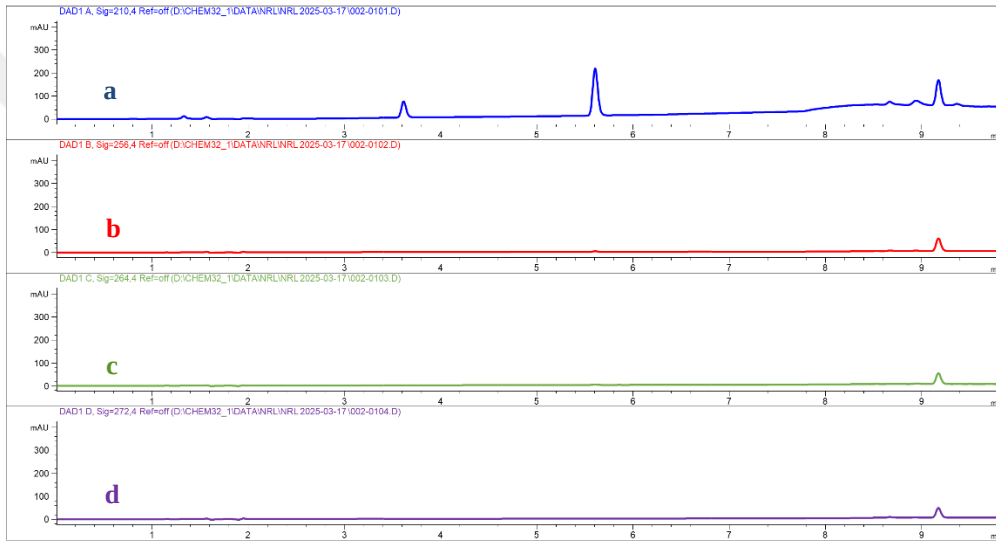
İncelenen akış hızları aralığında, LEV, LCM ve TPM için tatmin edici alıkonma zamanları ve ideal pik şekilleri gözlemlenmiştir. Analiz süresinin de dikkate alınmasıyla, en ideal akış hızı değeri 1,0 mL/dk olarak saptanmıştır.

5.3.1.3. Dalga boyu

LEV, LCM ve TPM'nin optimum uyarma ve yayma dalga boylarının belirlenmesi için farklı dalga boylarında analizler yapılmıştır. Çeşitli dalga boylarında gözlemlenen kromatogramlar Şekil 5.13'te verilmiştir.

Şekil 5.13

Farklı dalga boylarında gözlemlenen kromatogramlar



(a: 210 nm, b: 256 nm, c: 264 nm, d: 272 nm)

Üç maddenin de piklerinin belirgin şekilde gözlemlendiği, pik alanı ve morfolojisi açısından gerçekleştirilen tüm analizlerin ardından parametreler değerlendirildiğinde, YPSK yönteminin en uygun çalışma koşulları belirlenmiştir. En uygun çalışma şartları Tablo 5.15'de sunulmaktadır.

Tablo 5.15

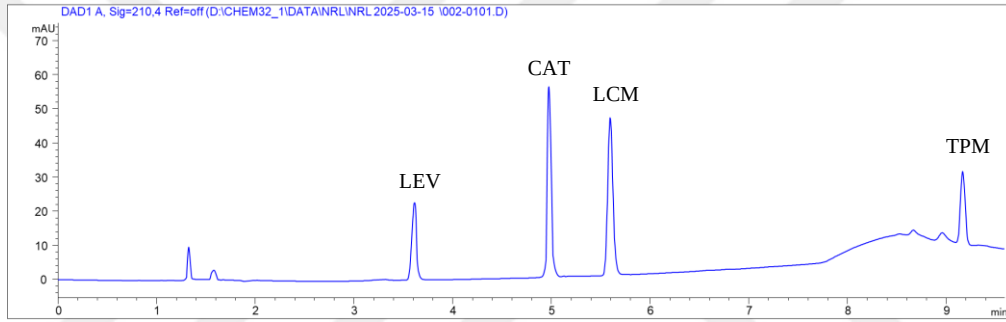
Optimum çalışma koşulları

Kolon	Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 mm × 150 mm; 5 µm)
Akış Hızı	1 mL/dk
Dalga boyu	210 nm
Enjeksiyon Hacmi	5 µL
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Mobil Faz	A: Su - B: ACN

Yönteme uygun bir iç standart belirlemek amacıyla ketoprofen, ibuprofen, parasetamol, etil paraben ve katekol standart maddeleri sırasıyla değerlendirilmiştir. Optimize edilen deneysel koşullar altında, en uygun rezolüsyon, kapasite faktörü ve pik simetrisi katekol maddesi ile elde edilmiştir. Ayrıca, katekolün alıkonma zamanının uygunluğu da dikkate alınarak, iç standart olarak katekol (CAT) tercih edilmiştir. Optimum koşullar uygulandığında LEV, CAT (IS), LCM, ve TPM'nin göç zamanı sırasıyla 3,61 dk, 4.98 dk, 5.61 ve 9,17 dk olarak belirlenmiştir. Optimum çalışma koşulları altında kromatogram Şekil 5.14`de verilmiştir.

Şekil 5.14

Optimum çalışma koşulları altında kromatogram



5.3.2. Validasyon

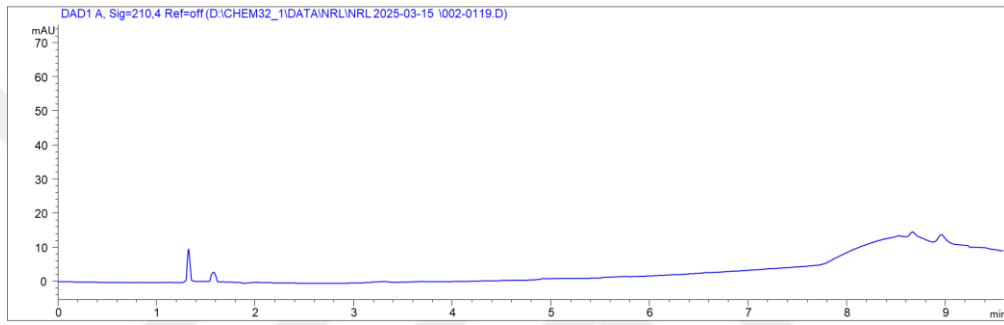
Optimum çalışma şartları belirlendikten sonra, geliştirilen analitik metodun geçerliliğini kanıtlamak amacıyla detaylı validasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar esnasında seçicilik, doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık (belirleme ve ölçüm sınırları), kararlılık ve sağlamlık gibi temel validasyon parametreleri incelenmiştir. Validasyon parametrelerinin hesaplanmasında pik normalizasyon metodu uygulanmış ve elde edilen sonuçlar bu metot ışığında değerlendirilmiştir. Ayrıca, metodun sistem uygunluğunu kontrol etmek için teorik tabaka sayısı, ayrılma gücü (çözünürlük), kapasite faktörü, seçicilik ve pik asimetri faktörü gibi değerler hesaplanmıştır. Tüm istatistiksel hesaplamalar Microsoft Excel programı kullanılarak yapılmış ve metodun performansı, Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) Q2(R2) kılavuzunun (2024) son versiyonunda belirtilen kabul kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

5.3.2.1. Seçicilik

Oluşturulan metodun seçiciliğini incelemek için, yöntemin kullanılacağı öngörülen farmasötik dozaj formlarının matris yapıları üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, yöntemin hedef analitleri (LEV, LCM ve TPM) matris bileşenlerinden ayırt edebilme ve seçici olarak tespit edebilme kapasitesini göstermek için gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, matris ortamlarına ait blank kromatogramı Şekil 5.15`de sunulmaktadır.

Şekil 5.15

Matris ortamlarına ait blank kromatogramı



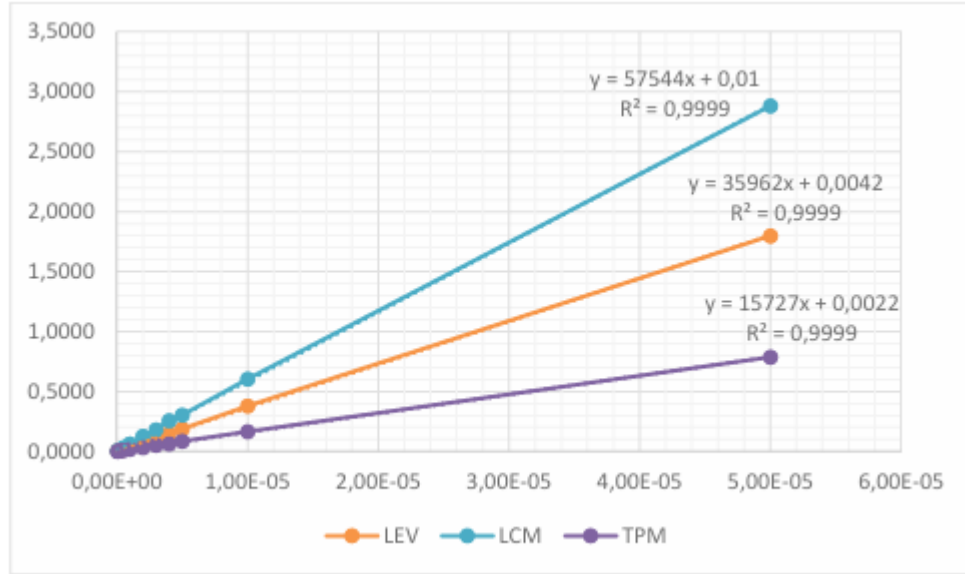
Kromatogramda görüldüğü üzere, yalnızca hedef bileşenlere ait belirgin pikler tespit edilmekte olup, diğer bileşenlerden kaynaklanan interferanslar gözlemlenmemektedir, bu da yöntemin yüksek seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir.

5.3.2.2. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallık çalışmaları kapsamında; $1,0 \times 10^{-8}$ M — $5,0 \times 10^{-5}$ M aralığında 11 farklı LEV, LCM, ve TPM çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; LEV, LCM, ve TPM için yöntemin doğrusal olduğu aralık $5,0 \times 10^{-8}$ M — $5,0 \times 10^{-5}$ M olarak belirlenmiş ve her üç madde için yüksek korelasyon katsayısına sahip ($r=0,9999$) spesifik bir doğru elde edilmiştir. LEV için doğru $y=35962x+0,0042$; LCM için doğru $y=57544x+0,01$; TPM için ise doğru $y=15727x+0,0022$ olmuştur. Şekil 5.16`da elde edilen bu doğrular sunulmuştur.

Şekil 5.16

YPSK yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi



Doğrusal aralığın belirlenmesinin ardından LEV, LCM ve TPM'nin 5×10^{-8} — 5×10^{-5} M derişimleri arasında 6 farklı çözeltisi 3'er set olmak üzere hazırlanmış ve bu çözeltilerin hem aynı gün içindeki hem de farklı günler arasındaki analizleri yapılmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarına ait istatistiksel değerlendirmeler Tablo 5.16, 5.17 ve 5.18'de sunulmaktadır.

Tablo 5.16

LEV'in YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	38914	39441	39655	39336
b	0,0015	-0,0014	0,0014	0,0005
r	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

a: eğim, b: kesim, r: korelasyon katsayısı, n: deney sayısı

Tablo 5.17*LCM'in YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri*

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	60346	60217	60270	60278
b	0,0017	0,0013	-0,0002	0,0009
r	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

a: eğim, b: kesim, r: korelasyon katsayısı, n: deney sayısı

Tablo 5.18*TPM'in YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri*

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	16954	16965	17190	17036
b	0,0006	0,0007	0,0007	0,0007
r	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

a: eğim, b: kesim, r: korelasyon katsayısı, n: deney sayısı

İstatistiksel incelemeler neticesinde, aynı gün içinde ve farklı günlerde yürütülen çalışmalardan elde edilen doğrusallık grafiklerinin y eksenini kesim noktalarının sıfıra yakın olduğu ve yüksek korelasyon katsayılarına sahip doğrusal ilişkiler sergilediği tespit edilmiştir. Bu bulgu, yöntemin doğrusallığını ve kalibrasyon başarısını teyit etmektedir.

5.3.2.3. Kesinlik

Metodun kesinliğini kanıtlamak amacıyla, her biri 2×10^{-6} M konsantrasyonunda LEV, LCM ve TPM çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerin hem aynı gün içindeki hem de farklı günler arasındaki analizleri yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerin sonuçları Tablo 5.19, 5.20 ve 5.21'de sunulmaktadır.

Tablo 5.19*LEV'nin YPSK yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri*

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
ort	0,0677	0,0672	0,0666	0,0672
ss	0,0001	0,0002	0,0002	0,0005
%BSS	0,1773	0,2836	0,3653	0,6995
GA %95	±0,0001	±0,0002	±0,0002	±0,0002

ort: ortalama, ss: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı, n: deney sayısı

Tablo 5.20*LCM'nin YPSK yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri*

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
ort	0,1266	0,1253	0,1250	0,1256
ss	0,0004	0,0003	0,0003	0,0008
%BSS	0,3260	0,2432	0,2541	0,6268
GA %95	±0,0004	±0,0003	±0,0003	±0,0004

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı, n: deney sayısı

Tablo 5.21*TPM'nin YPSK yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri*

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
ort	0,0319	0,0317	0,0318	0,0318
ss	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
%BSS	0,2696	0,1646	0,4444	0,4038
GA %95	±0,0001	±0,0001	±0,0001	±0,0001

ort: ortalama, ss: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı, n: deney sayısı

İstatistiksel değerlendirmelerin sonuçları incelendiğinde tüm %BSS değerlerinin %2'nin altında kaldığı görülmüş ve geliştirilen yöntemin üç maddenin analizi için de kesin olduğu gösterilmiştir.

5.3.2.4. Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu değerlendirmek amacıyla, 1×10^{-7} M, 1×10^{-6} M ve 1×10^{-5} M derişim düzeylerinde LEV, LCM ve TPM çözeltileri ile hem gün içi hem de günler arası olmak üzere her bir düzeyde altı analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları LEV (Tablo 5.22), LCM (Tablo 5.23) ve TPM (Tablo 5.24) için sunulmaktadır.

Tablo 5.22

LEV'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri

Eklenen (M)		$1,00 \times 10^{-7}$	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-5}$
I gün	ort+ss	$1,01 \times 10^{-7} \pm 1,06 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-6} \pm 1,49 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-5} \pm 0,46 \times 10^{-8}$
	%GK	100,96	100,08	100,48
	%BH	0,9562	0,0848	0,4824
	%BSS	1,0535	1,1491	0,0459
II gün	ort+ss	$1,02 \times 10^{-7} \pm 1,29 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-6} \pm 3,03 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-5} \pm 1,24 \times 10^{-7}$
	%GK	101,80	100,20	101,31
	%BH	1,8050	0,2038	1,3066
	%BSS	1,2682	0,3022	1,2236
III gün	ort+ss	$1,03 \times 10^{-7} \pm 1,02 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-6} \pm 1,95 \times 10^{-9}$	$9,94 \times 10^{-6} \pm 1,20 \times 10^{-7}$
	%GK	103,13	101,24	99,46
	%BH	3,127	1,2438	0,5433
	%BSS	0,9861	0,1929	1,2095
Tüm günler (n=18)	ort+ss	$1,02 \times 10^{-7} \pm 1,40 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-6} \pm 5,76 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-5} \pm 1,36 \times 10^{-7}$
	%GK	101,96	100,51	100,17
	%BH	1,9628	0,5108	0,1679
	%BSS	1,3772	0,5730	1,3609

ort: ortalama, ss: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, BH: bağıl hata, GK: geri kazanım, n: deney sayısı

Tablo 5.23

LCM'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri

	Eklenen (M)	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-5}$
I gün	ort+ss	$9,96 \times 10^{-8} \pm 0,93 \times 10^{-9}$	$9,99 \times 10^{-7} \pm 2,40 \times 10^{-9}$	$9,95 \times 10^{-6} \pm 1,07 \times 10^{-9}$
	%GK	99,61	99,91	99,57
	%BH	0,3887	0,0870	0,4287
	%BSS	0,9369	0,2398	0,0108
II gün	ort+ss	$9,95 \times 10^{-8} \pm 0,30 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-6} \pm 3,02 \times 10^{-9}$	$9,97 \times 10^{-6} \pm 3,41 \times 10^{-8}$
	%GK	99,50	100,10	99,66
	%BH	0,5024	0,0964	0,3442
	%BSS	0,3011	0,3017	0,3422
III gün	ort+ss	$1,02 \times 10^{-7} \pm 0,26 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-6} \pm 2,71 \times 10^{-9}$	$1,00 \times 10^{-5} \pm 4,20 \times 10^{-9}$
	%GK	101,54	101,16	100,04
	%BH	1,544	1,1634	0,0378
	%BSS	0,2577	0,2681	0,0420
Tüm günler (n=18)	ort+ss	$1,01 \times 10^{-7} \pm 1,11 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-6} \pm 6,22 \times 10^{-9}$	$9,98 \times 10^{-6} \pm 2,80 \times 10^{-8}$
	%GK	100,22	100,39	99,75
	%BH	0,2177	0,3909	0,2451
	%BSS	1,1095	0,6198	0,2807

ort: ortalama, ss: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, BH: bağıl hata, GK: geri kazanım, n: deney sayısı

Tablo 5.24

TPM'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri

	Eklenen (M)	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-5}$
I gün	ort+ss	$1,01 \times 10^{-7} \pm 6,40 \times 10^{-10}$	$1,00 \times 10^{-6} \pm 1,69 \times 10^{-9}$	$9,95 \times 10^{-6} \pm 5,78 \times 10^{-8}$
	%GK	100,46	100,11	99,51
	%BH	0,4623	0,1089	0,4905
	%BSS	0,6373	0,1685	0,5805

Tablo 5.25 (Devam)*TPM'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri*

II gün	ort+ss	$1,01 \times 10^{-7} \pm 6,01 \times 10^{-10}$	$1,00 \times 10^{-6} \pm 2,83 \times 10^{-9}$	$9,97 \times 10^{-6} \pm 4,48 \times 10^{-9}$
	%GK	100,50	100,17	99,71
	%BH	0,5046	0,1668	0,2939
	%BSS	0,5968	0,2829	0,0449
III gün	ort+ss	$1,01 \times 10^{-7} \pm 4,46 \times 10^{-10}$	$1,01 \times 10^{-6} \pm 4,01 \times 10^{-9}$	$1,00 \times 10^{-5} \pm 3,13 \times 10^{-9}$
	%GK	101,59	101,21	100,01
	%BH	1,588	1,2070	0,0005
	%BSS	0,4387	0,3964	0,0313
Tüm günler (n=18)	ort+ss	$1,01 \times 10^{-7} \pm 7,57 \times 10^{-10}$	$1,01 \times 10^{-6} \pm 5,91 \times 10^{-9}$	$9,97 \times 10^{-6} \pm 3,77 \times 10^{-8}$
	%GK	100,85	100,49	99,74
	%BH	0,8517	0,4942	0,2613
	%BSS	0,7501	0,5878	0,3780

ort: ortalama, ss: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, BH: bağıl hata, GK: geri kazanım, n: deney sayısı

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, üç maddeye ait tüm derişim düzeylerinde gerçekleştirilen ölçümlerde yüzde geri kazanım değerlerinin %99,46 ile %103,13 arasında değıştığı belirlenmiştir. Ayrıca, her üç madde için tüm derişim seviyelerinde %BSS oranı %2'den düşük gözlemlenmiştir. Bu bulgular, geliştirilen metodun hem yüksek doğruluğa hem de iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

5.3.2.5. Duyarlılık

Çalışmanın duyarlılık değerlendirmesi kapsamında yapılan hesaplamalarda, sinyal/gürültü (S/N) oranları esas alınmıştır. LEV, LCM ve TPM için geliştirilen yönteme ait saptama (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri sunulmuştur (Tablo 5.25).

Tablo 5.26*YPSK yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin duyarlılık verileri*

	LEV	LCM	TPM
LOD	$5,32 \times 10^{-8}$ M	$4,46 \times 10^{-8}$ M	$5,16 \times 10^{-8}$ M
LOQ	$1,61 \times 10^{-7}$ M	$1,35 \times 10^{-7}$ M	$1,56 \times 10^{-7}$ M

Elde edilen bu değerler, yöntemin düşük derişim düzeylerinde dahi analitleri güvenilir şekilde tespit edebildiğini ve yüksek duyarlılığa sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

5.3.2.6. Kararlılık

Yöntemin kararlılığını değerlendirmek amacıyla LEV, LCM ve TPM çözeltileri çeşitli koşullarda test edilmiştir. Bu kapsamda çözeltiler taze olarak hazırlanmış, -18°C’de karanlık ortamda 14 gün süreyle saklanmış, +4°C’de karanlıkta 24 saat bekletilmiş ve ayrıca dondurulup çözündürme işlemine tabi tutulmuştur. Uygulanan bu farklı saklama koşullarına ait analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiş olup, sonuçlar Tablo 5.26’da gösterilmiştir.

Tablo 5.27

YPSK yönteminde LEV, LCM ve TPM’nin kararlılık verileri

		taze çözelti	24 saat	14 gün	donmuş-çözölmüş
LEV	ort	0,0678	0,0674	0,0673	0,0674
	ss	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
	%BSS	0,2158	0,1056	0,0873	0,2170
	%GK	99,75%	99,06%	99,02%	99,05%
LCM	ort	0,1264	0,1264	0,1254	0,1257
	ss	0,0002	0,0002	0,0001	0,0002
	%BSS	0,1648	0,1852	0,1142	0,1575
	%GK	99,81%	99,83%	99,06%	99,31%
TPM	ort	0,0320	0,0320	0,0322	0,0318
	ss	0,0001	0,0001	0,0001	0,0002
	%BSS	0,4280	0,2187	0,2644	0,6601
	%GK	99,59%	99,46%	100,32%	99,11%

ort: ortalama, ss: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, %GK: geri kazanım

Gözlem süresince elde edilen %BSS %GK) değerleri incelendiğinde, LEV, LCM ve TPM çözeltilerinin kararlılığını koruduğı sonucuna varılmıştır.

5.3.2.7. Sağlamlık

Sağlamlık çalışmaları kapsamında optimum analiz koşullarında yapılan küçük değişikliklerin analiz sonuçlarını nasıl etkilediğı incelenmiştir. Optimum koşullarda küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilen analizlerin sonuçları optimum koşullar altında gerçekleştirilen analizlerin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Deneyler 3’er tekrar yapılmış sonuçlara ait istatistiksel değerlendirmeler sunulmuştur (Tablo 5.27).

Tablo 5.28*YPSK yönteminin sağlamlık verileri*

	Akış	Kolon	Dalga	LEV		LCM		TPM	
	hızı	sıcaklığı	boyu	ort	%BSS	ort	%BSS	ort	%BSS
Optimum									
Koşullar	1,0 ml/dak	25°C	210 nm	0,0680	0,3614	0,1271	0,2889	0,0320	0,0427
1. Koşul	0,9 ml/dak	25°C	210 nm	0,0665	0,2532	0,1280	0,1844	0,0333	0,2807
2. Koşul	1,1 ml/dak	25°C	210 nm	0,0680	0,2034	0,1245	0,2385	0,0306	0,1840
3. Koşul	1,0 ml/dak	23°C	210 nm	0,0677	0,2062	0,1276	0,2177	0,0321	0,2863
4. Koşul	1,0 ml/dak	27°C	210 nm	0,0678	0,2168	0,1267	0,2921	0,0320	0,1830
5. Koşul	1,0 ml/dak	25°C	208 nm	0,0678	0,3583	0,1273	0,4129	0,0321	0,3483
6. Koşul	1,0 ml/dak	25°C	212 nm	0,0679	0,1856	0,1267	0,2917	0,0319	0,2540

ort: ortalama, BSS: bağıl standart sapma

Hesaplanan %BSS değerlerinin %2'nin altında kalması, yöntemde uygulanan küçük değişikliklerin analiz sonuçları üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Bu durum, önerilen yöntemin sağlamlık açısından güvenilir ve tutarlı olduğunu ortaya koymaktadır.

5.3.3. Sistem uygunluk testleri

Geliştirilen yöntemin sistem uygunluğunu değerlendirmek amacıyla çeşitli kromatografik parametreler hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar, belirlenen kabul kriterleri ile karşılaştırılmış sunulmuştur (Tablo 5.28).

Tablo 5.29*YPSK yönteminde LEV, LCM ve TPM'nin sistem uygunluk verileri*

Parametre	LEV	LCM	TPM	Beklenen Değer
R_t	3,61	5,61	9,17	
k'	2,01	3,67	6,64	2 - 10
N	14950	21999	15408	> 2000
A_s	0,97	0,98	0,96	0,95 - 1,2
α		1,17	1,81	>1
R_s		2,23	9,35	>1,5

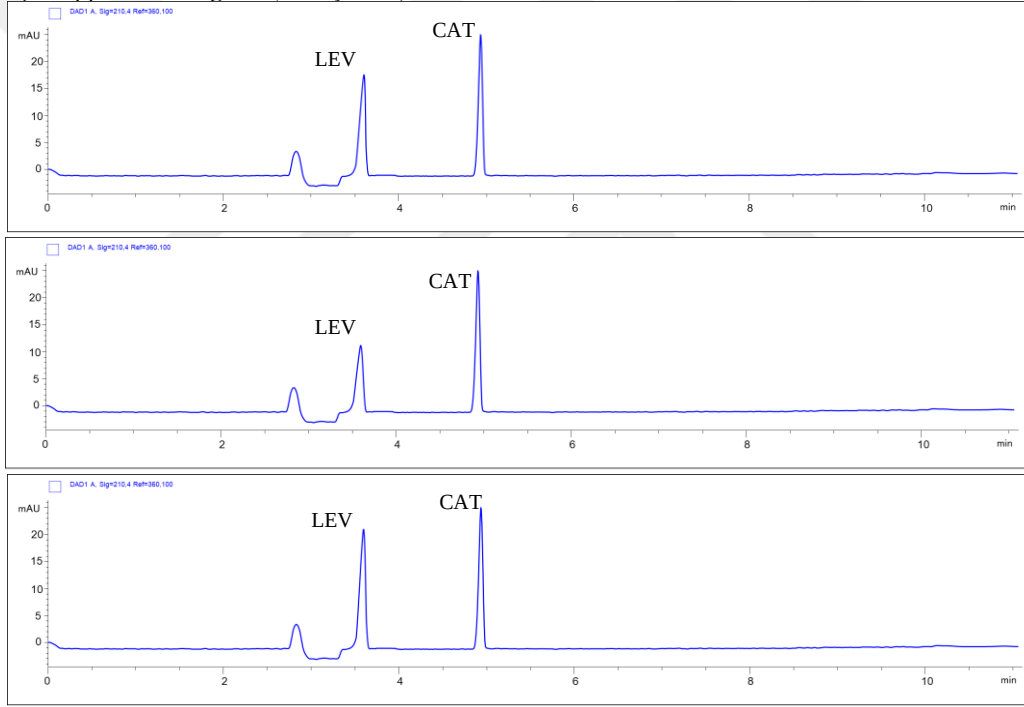
R_t: alıkonma zamanı, k': kapasite faktörü, N: teorik tabaka sayısı, A_s: asimetri faktörü, α: seçicilik faktörü, R_s: ayırım gücü faktörü

5.4. Yöntemlerin Uygulanması

LEV, LCM ve TPM'nin farmasötik preparatlar içindeki tayini, sırasıyla LEV etkin maddesini içeren Epixx® (500 mg) ve Keppra® (250 mg) tabletleri ile Keppra® (100 mg/mL) oral çözeltisi, LCM etkin maddesini içeren Benvida® (50 mg) ve TPM® etkin maddesini içeren Topamax (50 mg) ticari preparatları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tabletlerden hazırlanan çözeltiler, kalibrasyon aralığına uygun şekilde hazırlanmış ve optimum koşullar altında altı kez analiz edilmiştir. Elde edilen elektroferogramlar sırasıyla Şekil 5.17; Şekil 5.18 ve Şekil 5.19, kromatogramlar ise, Şekil 5.20; Şekil 5.21 ve Şekil 5.22'de sunulmaktadır.

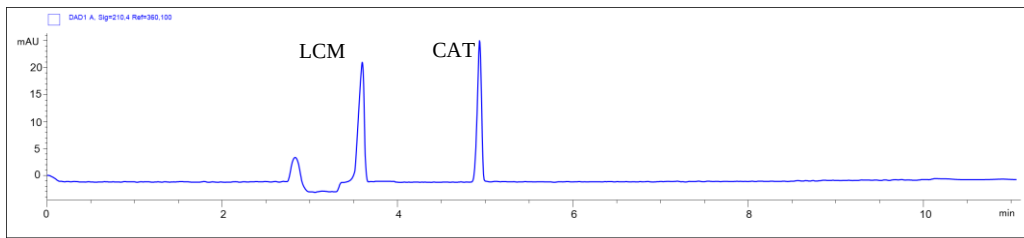
Şekil 5.17

LEV içeren farmasötik preparatlara ait elektroferogramlar: a: Epixx® 500 mg (tablet), b: Keppra® 250 mg (tablet), Keppra® 100 mg/mL (oral çözelti)



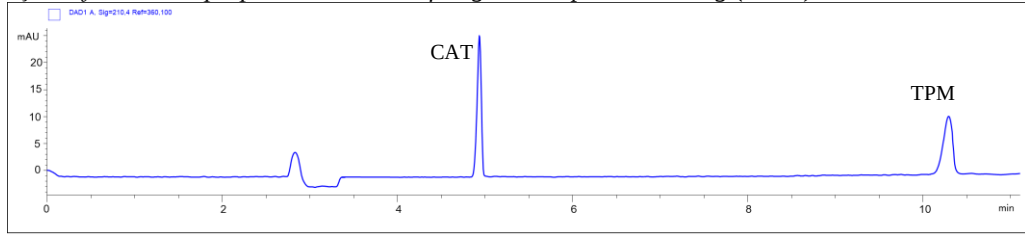
Şekil 5.18

LCM içeren farmasötik preparata ait elektroferogram: Benvida® 50 mg (tablet)



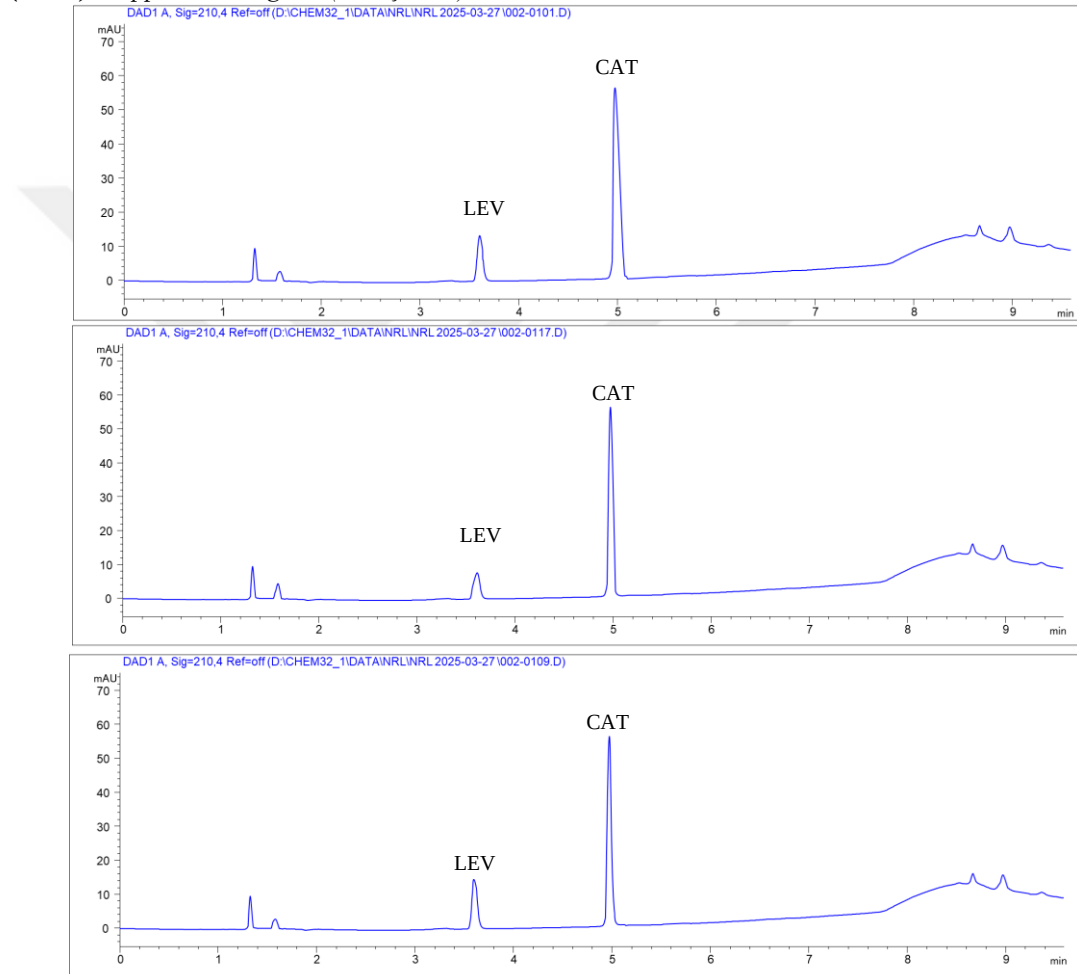
Şekil 5.19

TPM içeren farmasötik preparata ait elektroferogram: Topamax® 50 mg (tablet)



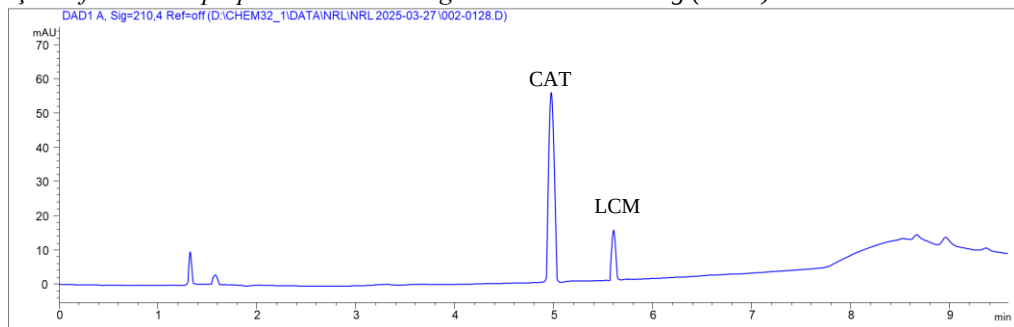
Şekil 5.20

LEV içeren farmasötik preparatlara ait kromatogramlar: a: Epixx® 500 mg (tablet), b: Keppra® 250 mg (tablet), Keppra® 100 mg/mL (oral çözelti)



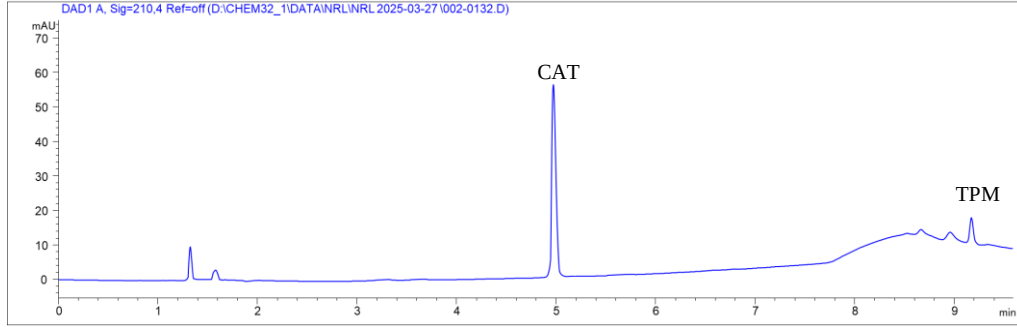
Şekil 5.21

LCM içeren farmasötik preparata ait kromatogram: Benvida® 50 mg (tablet)



Şekil 5.22

TPM içeren farmasötik preparata ait kromatogram: Topamax® 50 mg (tablet)



Farmasötik preparatların analizleri sırasında, geliştirilen yöntemle standart maddelere ait pik özelliklerini yansıtan elektroferogram ve kromatogramlar elde edilmiştir. LEV, LCM ve TPM'nin preparatlardan yapılan kantitatif tayinine ilişkin yöntemin istatistiksel değerlendirmeleri, Tablo 5.29'da sunulmuştur. Preparatların konsantrasyon seviyelerine karşılık gelen geri kazanım değerleri yaklaşık olarak %100 bulunmuştur. Bu sonuçlar, geliştirilen yöntemin LEV, LCM ve TPM'nin tabletlerdeki kantitatif tayini için etkili bir şekilde uygulanabileceğini ortaya koymaktadır.

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, temel alınan KE yöntemi ile karşılaştırma amacıyla geliştirilen YPSK yöntemlerinin elde ettiği sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Ayrıca, varyans analizi neticesinde elde edilen F değerlerinin, ilgili serbestlik derecelerindeki kritik F değerlerinden düşük olması, grup ortalamaları arasında anlamlı bir varyansın bulunmadığını teyit etmektedir.

Tablo 5.30

LEV, LCM ve TPM içeren farmasötik preparatların KE ve YPSK yöntemleri ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi

			KE	YPSK	F	p
LEV	Epixx® (500 mg)	Ort (n=6)	496,215	496,157	1,504 ($<4,74^a$)	0,913 ($>0,05$)
		ss	0,877	1,076		
		%BSS	0,176	0,216		
		% GK	99,243	99,231		
	Keppra® (250 mg)	Ort (n=6)	251,975	251,940	1,766 ($<4,74^a$)	0,959 ($>0,05$)
		ss	1,423	1,071		
		%BSS	0,564	0,425		
		% GK	100,790	100,776		

Tablo 5.31 (Devam)

LEV, LCM ve TPM'nin içeren farmasötik preparatların KE ve YPSK yöntemleri ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi

	Keppra® (100 mg/ml)	Ort (n=6)	99,131	99,117	1,421 (<4,74 ^a)	0,958 (>0,05)
		ss	0,533	0,447		
		%BSS	0,538	0,451		
		% GK	99,131	99,116		
LCM	Benvida® (50 mg)	Ort (n=6)	50,47	50,486	1,601 (<4,74 ^a)	0,963 (>0,05)
		ss	0,404	0,319		
		%BSS	0,801	0,633		
		% GK	100,954	100,972		
TPM	Topamax® (50 mg)	Ort (n=6)	50,024	50,015	1,296 (<4,74 ^a)	0,971 (>0,05)
		ss	0,4715	0,4141		
		%BSS	0,9424	0,8280		
		% GK	100,0485	100,0311		

ort: ortalama, ss: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, GK: geri kazanım

Bu bulgular, incelenen veri seti ve uygulanan analiz bağlamında, her iki yöntemin de benzer performans sergilediğini ve tutarlı sonuçlar ürettiğini göstermektedir. Dolayısıyla, bu çalışma kapsamında, her iki metodolojinin de söz konusu analiz için uygun alternatifler olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu alanda yapılacak kararlı ve odaklanmış araştırmalar, metodolojik tartışmalara netlik kazandırarak, araştırmacıların daha bilinçli ve etkili analizler yapmasına olanak tanıyacaktır.

Geliştirilen yöntem, literatürde yer alan benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında; geliştirilen hem KE hem de YPSK yöntemleri geniş çalışma aralığı, düşük LOD ve LOQ değerleri, yüksek tekrarlanabilirlik, düşük bağıl standart sapma (BSS) değerleri ve %100'e yakın geri kazanım (%GK) oranları ile öne çıkmaktadır. Bu özellikleri sayesinde yöntem, analitik açıdan güçlü bir performans sergilemekte ve geniş bir uygulama alanı sunmaktadır. Literatürdeki diğer çalışmalarla yapılan kıyaslama Tablo 5.30'da sunulmuştur.

Tablo 5.32*Geliştirilen KE ve YPSK yöntemlerinin literatürdeki benzer yöntemlerle karşılaştırmalı değerlendirmesi*

		LEV	LCM	TPM
Geliştirilen KE Yöntemi	Doğrusallık aralığı	$1 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-6}$ M	$1 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-6}$ M	$1 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-6}$ M
	LOD	$1,06 \times 10^{-8}$ M	$1,03 \times 10^{-8}$ M	$9,17 \times 10^{-9}$ M
	LOQ	$3,23 \times 10^{-8}$ M	$3,13 \times 10^{-8}$ M	$2,78 \times 10^{-8}$ M
Geliştirilen YPSK Yöntemi	Doğrusallık aralığı	$5 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-5}$ M	$5 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-5}$ M	$5,0 \times 10^{-8} - 5,0 \times 10^{-5}$ M
	LOD	$5,32 \times 10^{-8}$ M	$4,46 \times 10^{-8}$ M	$5,16 \times 10^{-8}$ M
	LOQ	$1,61 \times 10^{-7}$ M	$1,35 \times 10^{-7}$ M	$1,56 \times 10^{-7}$ M
Shihabi, vd., 2003 (KE)	Doğrusallık aralığı	$4,11 \times 10^{-5} - 4,11 \times 10^{-4}$ M		
	LOD	$1,76 \times 10^{-5}$ M		
	LOQ	$5,21 \times 10^{-5}$ M		
Mandriolia vd., 2010 (KE)	Doğrusallık aralığı			$5,89 \times 10^{-6} - 1,76 \times 10^{-4}$ M
	LOD			$2,36 \times 10^{-6}$ M
	LOQ			$5,89 \times 10^{-6}$ M
Ishikawa vd., 2018 (KE)	Doğrusallık aralığı			$2,95 \times 10^{-6} - 8,85 \times 10^{-5}$ M
	LOD			$1,03 \times 10^{-6}$
	LOQ			$2,95 \times 10^{-6}$
Salido-Fortuna vd., 2021 (KE)	Doğrusallık aralığı		$5,99 \times 10^{-5} - 3,59 \times 10^{-4}$ M	
	LOD		$5,99 \times 10^{-6}$ M	
	LOQ		$2,04 \times 10^{-5}$ M	
Pucci vd, 2003 (YPSK)	Doğrusallık aralığı	$2,94 \times 10^{-5} - 5,88 \times 10^{-4}$ M		
	LOD	$8,81 \times 10^{-7}$ M		
	LOQ	$2,94 \times 10^{-6}$ M		
Bahrami vd., 2005 (YPSK)	Doğrusallık aralığı		$1,18 \times 10^{-7} - 1,18 \times 10^{-4}$ M	
	LOD		$1,47 \times 10^{-7}$ M	
	LOQ		$1,18 \times 10^{-6}$ M	
Chakravarthy vd, 2011 (YPSK)	Doğrusallık aralığı		$4,79 \times 10^{-7} - 1,24 \times 10^{-5}$ M	
	LOD		$1,71 \times 10^{-7}$ M	
	LOQ		$5,13 \times 10^{-7}$ M	
Kuhn ve Knabbe, 2013 (SK/KS/KS)	Doğrusallık aralığı	$2,94 \times 10^{-7} - 2,94 \times 10^{-4}$ M	$1,99 \times 10^{-7} - 1,99 \times 10^{-4}$ M	$1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-4}$ M
	LOD	$2,94 \times 10^{-7}$ M	$1,99 \times 10^{-7}$ M	$1,47 \times 10^{-7}$ M
	LOQ	$5,18 \times 10^{-7}$ M	$5,97 \times 10^{-7}$ M	$4,42 \times 10^{-6}$ M
Majnooni vd, 2014 (YPSK)	Doğrusallık aralığı			$2,94 \times 10^{-6} - 8,84 \times 10^{-4}$ M
	LOD			$1,47 \times 10^{-6}$ M
	LOQ			$4,42 \times 10^{-6}$ M
Engelbrecht vd, 2017 (YPSK)	Doğrusallık aralığı	$5,87 \times 10^{-6} - 3,52 \times 10^{-4}$ M		
	LOD	$1,47 \times 10^{-6}$ M		
	LOQ	$5,87 \times 10^{-6}$ M		
Gonçalves vd, 2018 (YPSK)	Doğrusallık aralığı	$1,47 \times 10^{-5} - 2,35 \times 10^{-4}$ M	$1,99 \times 10^{-6} - 1,19 \times 10^{-4}$ M	
	LOD	$3,67 \times 10^{-6}$ M	$2,49 \times 10^{-6}$ M	
	LOQ	$1,10 \times 10^{-5}$ M	$7,47 \times 10^{-6}$ M	
Mohamed vd, 2019 (YPSK)	Doğrusallık aralığı	$5,87 \times 10^{-7} - 4,11 \times 10^{-4}$ M	$4,00 \times 10^{-7} - 2,80 \times 10^{-4}$ M	
	LOD	$1,53 \times 10^{-7}$ M	$1,00 \times 10^{-7}$ M	
	LOQ	$5,64 \times 10^{-7}$ M	$3,71 \times 10^{-7}$ M	

6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, LEV, LCM ve TPM maddelerinin farmasötik bileşenlerinin aynı anda nicel olarak belirlenmesi için basit, hızlı ve hassas bir KE metodu geliştirilmiştir.

Yöntem kapsamında, deteksiyon 210 nm dalga boyunda bir diyot dizi detektörü (DAD) ile sağlanmış olup, analizler, 75 µm iç çapına ve 40 cm etkin (48,5 cm toplam) uzunluğuna sahip bir kılcal kolon vasıtasıyla yapılmıştır. Optimizasyon süreçleri neticesinde, 37 mM sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren 5 mM borat ve 10 mM fosfat tampon çözeltisi (pH 8,00) kullanılarak ve 20 kV potansiyel uygulanarak analizler yürütülmüştür. Geliştirilen metotta katekol (CAT) iç standart (IS) olarak kullanılmış ve LEV, LCM, TPM ile iç standardın göç zamanları sırasıyla 3,61 dakika, 3,97 dakika, 10,62 dakika ve 4,82 (CAT, IS) dakika olarak saptanmıştır. Yöntem validasyonu, Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) Q2(R2) (2024) güncel kılavuzunda belirtilen kabul kriterleri doğrultusunda seçicilik, doğrusal çalışma aralığı, tekrarlanabilirlik, doğruluk, saptama sınırı, tayin sınırı, sağlamlık ve kararlılık parametreleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, sistem uygunluk parametreleri de hesaplanarak yöntem performansı değerlendirilmiştir.

Aynı zamanda, KE metoduyla karşılaştırma yapmak amacıyla bir YPSK yöntemi de geliştirilmiştir. Bu yöntem çerçevesinde, saptama işlemi 210 nm dalga boyunda bir DAD detektörü aracılığıyla yapılmıştır. YPSK'da ayırma işlemi, 4.6 mm iç çapa, 150.0 mm uzunluğa ve 5 µm partikül büyüklüğüne sahip bir C18 kolonu aracılığıyla gerçekleştirilmiş ve hareketli faz olarak su ve ACN karışımından oluşan bir gradient sistemi 1,0 mL/dakika akış hızıyla uygulanmıştır. Bu şartlarda, LEV, LCM ve TPM maddelerinin alıkonma süreleri sırasıyla 3,61 dakika, 5,61 dakika ve 9,17 dakika olarak belirlenmiştir. Geliştirilen YPSK metodunun validasyonu aynı CE yönteminde olduğu gibi ICH Q2R2 (2024) güncel kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Her iki yöntemin (KE ve YPSK) validasyon çalışmaları, LEV, LCM, TPM'nin uzun süreli kararlılığını göstermiştir. Belirlenen doğrusal aralıklar dahilinde metotların kesinlik ve doğrulukları değerlendirilmiştir. Seçicilik açısından hem optimizasyon hem de validasyon süreçlerinde DAD detektörünün farklı dalga boylarında çalışabilme özelliği kullanılarak herhangi bir interferans sinyaline rastlanmamıştır. Sistem uygunluğunu teyit etmek amacıyla teorik tabaka sayısı, çözünürlük ve asimetri faktörü gibi çeşitli parametreler belirlenmiş ve kabul edilebilir sınırlar içinde oldukları kanıtlanmıştır. LEV,

LCM, TPM içeren farmasötik dozaj formları geliştirilen bu metotlarla analiz edilmiş ve geri kazanım oranları yaklaşık %100 olarak bulunmuştur.

Yöntemlerin doğruluğu, farmasötik preparatlar üzerinde başarılı bir şekilde uygulanarak gösterilmiştir ve bu yöntemlerin karmaşık matrisler için uygun olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, yöntemin biyolojik örneklerle uygulanma potansiyelinin oldukça yüksek olduğu değerlendirilmiştir. Karmaşık biyolojik matrislerle ilgili zorlukların, bu yöntemlerin yüksek seçicilik ve duyarlılık özelliklerinden yararlanılarak etkili bir şekilde çözülebileceği öngörülmektedir.

Önceki çalışmaların incelenmesi, LEV, LCM ve TPM maddelerinin eş zamanlı olarak hem KE hem de YPSK yöntemleriyle birlikte analiz edildiği herhangi bir yayının bulunmadığını göstermiştir. Bu durum, geliştirilen bu çalışmanın, söz konusu üç analitin her iki yöntemle eş zamanlı tayini açısından literatüre özgün bir katkı sağladığını işaret etmektedir.

Sonuç olarak, tablodan da anlaşıldığı üzere bu çalışmada geliştirilen hem KE hem de YPSK yöntemlerinin, literatürdeki mevcut analiz metotlarıyla karşılaştırıldığında önemli ölçüde üstün performans sergilediği tespit edilmiştir. Optimizasyon ve validasyon süreçlerinde elde edilen veriler, bu yeni geliştirilen yöntemlerin analitik uygulamalarda daha etkin ve güvenilir sonuçlar sunma potansiyeline sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Geliştirilen yöntem gelecekteki çalışmalarda, geliştirilen yöntemlerin biyolojik sistemlerde kullanımını kolaylaştırmak amacıyla ek adaptasyonlar, optimizasyonlar ve biyoanalitik validasyonlar yapılmasına, böylece farmakokinetik çalışmalar ve tedavi izleme gibi uygulamalara olanak sağlayacaktır. Bu araştırmanın bulguları, farmasötik bilimlerde analitik tekniklerin geliştirilmesine katkı sağlamakla birlikte, biyolojik ve klinik alanlarda kullanım olanaklarını genişletmek için bir temel oluşturmaktadır.

KAYNAKÇA

- Bahrami, G., Mirzaeei, S., Mohammadi, B. ve Kiani, A. (2005). High performance liquid chromatographic determination of topiramate in human serum using UV detection. *Journal of Chromatography B*, 822(1–2), 322–325.
- Baker, D.R. (1995). Capillary electrophoresis. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Bauer, S., Willems, L. M., Paule, E., Petschow, C., Zöllner, J. P., Rosenow, F. ve Strzelczyk, A. (2017). The efficacy of lacosamide as monotherapy and adjunctive therapy in focal epilepsy and its use in status epilepticus: Clinical trial evidence and experience. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 10(2), 103-126.
- Baulac, M., Rosenow, F., Toledo, M., Terada, K., Li, T., Backer, M. D., Konrad, J. W. ve Brock, M. (2017). Efficacy, safety, and tolerability of lacosamide monotherapy versus controlled-release carbamazepine in patients with newly diagnosed epilepsy: a phase 3, randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet Neurology*, 16(1), 43-54.
- Bayerlein, K., Frieling, H., Beyer, B., Kornhuber, J. ve Bleich, S. (2004). Drug-induced psychosis after long-term treatment with levetiracetam. *Canadian Journal of Psychiatry*, 49(1), 868-72.
- Beghi, E. (2004). Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs: Comparison of two recent guidelines. *The Lancet Neurology*, 3(10), 618-621.
- Benedetti, S. M., Whomsley, R., Nicolas, J. M., Young, C. ve Baltes, E. (2003). Pharmacokinetics and metabolism of 14C-levetiracetam, a new antiepileptic agent, in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 59(8), 621-630.
- Ben-Menachem, E., Biton, V., Jatuzis, D., Abou-Khalil, B., Doty, P. ve Rudd, G. D. (2007). Efficacy and safety of oral lacosamide as adjunctive therapy in adults with partial-onset seizures. *Epilepsia*, 48(7), 1308–1317.
- Beydoun, A., D’Souza, J., Hebert, D. ve Doty, P. (2009). Lacosamide: Pharmacology, mechanisms of action and pooled efficacy and safety data in partial-onset seizures. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 9(1), 33-42.
- Beyreuther, B. K., Freitag, J., Heers, C., Krebsfänger, N., Scharfenecker, U. Ve Stöhr, T. (2007). Lacosamide: A review of preclinical properties. *CNS Drug Reviews*, 13(1), 21–42.

- Bialer, M., Dose, D. R., Murthy, B., Curtin, C., Wang, S. S., Twyman, R. E. ve Schwabe, S. (2004). Pharmacokinetic interactions of topiramate. *Clinical Pharmacokinetics*, 43(12), 763-780.
- Bialer, M., Johannessen, S. I., Levy, R. H., Perucca, E., Tomson, T. ve White, H. S. (2009). Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Ninth Eilat Conference (EILAT IX). *Epilepsy Research*, 83(1), 1-43.
- Blair, N. T. ve Bean, B. P. (2003). Role of tetrodotoxin-resistant Na⁺ current slow inactivation in adaptation of action potential firing in small-diameter dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(32), 10338-10350.
- Braithwaite, A. ve Smith, F. J. (1996). *Chromatographic methods* (5. baskı). London: Blackie Academic & Professional.
- Britzi, M., Perucca, E., Soback, S., Levy, R. H., Fattore, C., Crema, F., Gatti, G., Dose, D. R., Maryanoff, B. E. ve Bialer, M. (2005). Pharmacokinetic and metabolic investigation of topiramate disposition in healthy subjects in the absence and in the presence of enzyme induction by carbamazepine. *Epilepsia*, 46(3), 378-384.
- Brodie, M. J., Barry, S. J. E., Bamagous, G. A., Norrie, J. D. ve Kwan, P. (2012). Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. *Neurology*, 78(20), 1548-1554.
- Camille, P. (1993). *Capillary electrophoresis: Theory and practice*. Boca Raton: CRC Press.
- Carona, A., Bicker, J., Silva, R., Fonseca, C., Falcão, A. ve Fortuna, A. (2021). Pharmacology of lacosamide: From its molecular mechanisms and pharmacokinetics to future therapeutic applications. *Life Sciences*, 275(1), 119342.
- Catterall, W. A. (2014). Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54(1), 317-338.
- Cawello, W., Bökens, H., Nickel, B., Andreas, J. O. ve Halabi, A. (2013). Tolerability, pharmacokinetics, and bioequivalence of the tablet and syrup formulations of lacosamide in plasma, saliva, and urine: Saliva as a surrogate of pharmacokinetics in the central compartment. *Epilepsia*, 54(1), 81-88.
- Cawello, W., Kroppeit, D., Schiltmeyer, B., Hammes, W. ve Horstmann, R. (2004). Food does not affect the pharmacokinetics of SPM 927. *Epilepsia*, 45(7), 307-10.
- Cawello, W., Mueller-Voessing, C. ve Fichtner, A. (2014). Pharmacokinetics of lacosamide and omeprazole coadministration in healthy volunteers: Results from a phase I, randomized, crossover trial. *Clinical Drug Investigation*, 34(5), 317-325.

- Cawello, W., Stockis, A., Andreas, J. O. ve Dimova, S. (2014). Advances in epilepsy treatment: Lacosamide pharmacokinetic profile. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1329(1), 18–32.
- Chakravarthy, K. V. ve Shankar, G. D. (2011). HPLC method for determination of lacosamide S(-) enantiomer in bulk and pharmaceutical formulation. *Rasāyan Journal of Chemistry*, 4(4), 744-752.
- Chakravarthy, V. K. ve Sankar, D. G. (2011). HPLC method for determination of lacosamide S(-) enantiomer in bulk and pharmaceutical formulation. *Rasayan Journal of Chemistry*, 4(4), 744–752.
- Chang, W. P. ve Südhof, T. C. (2009). SV2 renders primed synaptic vesicles competent for Ca^{2+} -induced exocytosis. *Journal of Neuroscience*, 29(1), 883-897.
- Christensen, J., Hojskov, C. S., Dam, M. ve Poulsen, J. H. (2001). Plasma concentration of topiramate correlates with cerebrospinal fluid concentration. *Therapeutic Drug Monitoring*, 23(5), 529-535.
- Chung, S., Ben-Menachem, E., Sperling, M. R., Rosenfeld, W., Fountain, N. B., Benbadis, S., Hebert, D., Isojärvi, J. ve Doty, P. (2010). Examining the clinical utility of lacosamide: Pooled analyses of three phase II/III clinical trials. *CNS Drugs*, 24(12), 1041-1054.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (ILAE). (2017). *ILAE 2017 classification of the epilepsies*.
- Contreras-García, I. J., Cárdenas-Rodríguez, N., Romo-Mancillas, A., Bandala, C., Zamudio, S. R., Gómez-Manzo, S., Hernández-Ochoa, B., Mendoza-Torreblanca, J. G. ve Pichardo-Macías, L. A. (2022). Levetiracetam mechanisms of action: from molecules to systems. *Pharmaceuticals*, 15(1), 475-80.
- Coupez, R., Straetmans, R., Sehgal, G., Stockis, A. ve Lu, Z. S. (2003). Levetiracetam: Relative bioavailability and bioequivalence. *Journal of Clinical Pharmacology*, 43(12), 1370-1376.
- Cramer, J. A., De Rue, K., Devinsky, O., Edrich, P. ve Trimble, M. R. (2003). A systematic review of the behavioral effects of levetiracetam in adults with epilepsy, cognitive disorders, or an anxiety disorder during clinical trials. *Epilepsy & Behavior*, 4(1), 124-132.
- Crunelli, V. ve Leresche, N. (2002). Childhood absence epilepsy: Genes, channels, neurons and networks. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(5), 371-373.

- Curia, G., Biagini, G., Perucca, E. ve Avoli, M. (2009). Lacosamide: A new approach to target voltage-gated sodium currents in epileptic disorders. *CNS Drugs*, 23(7), 555-568
- Çarçak, N. ve Özkara, Ç. (2017). Seizures and antiepileptic drugs: From pathophysiology to clinical practice. *Current Pharmaceutical Design*, 23(43), 6376–6388.
- de Biase, S., Valente, M., Gigli, G. L. ve Merlino, G. (2017). Pharmacokinetic drug evaluation of lacosamide for the treatment of partial-onset seizures. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(9), 997-1005.
- de Tisi, J., Bell, G. S., Peacock, J. L., McEvoy, A. W., Harkness, W. F. J., Sander, J. W. ve Duncan, J. S. (2011). The long-term outcome of adult epilepsy surgery, patterns of seizure remission, and relapse: A cohort study. *The Lancet*, 378(9800), 1388-1395.
- Dewolfe, J. L. ve Szaflarski, J. P. (2013). Levetiracetam use in the critical care setting. *Frontiers in Neurology*, 4(1), 121.
- Ding, D., Wang, W., Wu, J., Yang, H., Li, S., Dai, X., Yang, B., Wang, T., Yuan, C., Ma, G., Bell, G. S., Kwan, P., de Boer, H. M., Hong, Z., ve Sander, J. W. (2013). Premature mortality risk in people with convulsive epilepsy: long follow-up of a cohort in rural China. *Epilepsia*, 54(3), 512–517.
- Dose, D. R. ve Streeter, A. J. (2002). Topiramate: Chemistry, biotransformation, and pharmacokinetics. In R. H. Levy, R. H. Mattson, B. S. Meldrum ve E. Perucca (Editörler.), *Antiepileptic drugs* (5. baskı, ss.727-734). Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Dose, D. R., Walker, S. A., Gisclon, L. G. ve Nayak, R. K. (1996). Single-dose pharmacokinetics and effect of food on the bioavailability of topiramate, a novel antiepileptic drug. *Journal of Clinical Pharmacology*, 36(9), 884-891.
- Doty, P., Rudd, G. D., Stoehr, T. ve Thomas, D. (2007). Lacosamide. *Neurotherapeutics*, 4(1), 145-148.
- Drugbank. (May, 2025) *Lacosamide*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB06218>
- Drugbank. (May, 2025) *Levetiracetam*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01202>
- Drugbank. (May, 2025) *Topiramate*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00273>
- Duncan, J. S., Sander, J. W., Sisodiya, S. M. ve Walker, M. C. (2006). Adult epilepsy. *The Lancet*, 367(9516), 1087-1100.

- Engelbrecht, L., Grobler, C. J. ve Rheeders, M. (2017). A simple and cost-effective HPLC-UV method for the detection of levetiracetam in plasma/serum of patients with epilepsy. *Biomedical Chromatography*, 31(1), 3969-73
- Englot, D. J., Chang, E. F. ve Auguste, K. I. (2011). Vagus nerve stimulation for epilepsy: A meta-analysis of efficacy and predictors of response. *Journal of Neurosurgery*, 115(6), 1248-1255.
- Eşkazan, E. (2008). Tarihte Epilepsi ve Epileptolojinin Kısa Tarihçesi. *Epilepsi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi.
- Falco-Walter, J. (2020). Epilepsy–Definition, classification, pathophysiology, and epidemiology. *Seminars in Neurology*, 40(6), 617–623
- Fang, T., Valdes, E. ve Frontera, J. A. (2022). Levetiracetam for seizure prophylaxis in neurocritical care: A systematic review and meta-analysis. *Neurocritical Care*, 36(1), 248-258.
- Fazel, S., Wolf, A., Langström, N., Newton, C. R. ve Lichtenstein, P. (2013). Premature mortality in epilepsy and the role of psychiatric comorbidity: A total population study. *The Lancet*, 382(9905), 1646-1654.
- Ferrari, A., Tiraferri, I., Neri, L. ve Sternieri, E. (2011). Clinical pharmacology of topiramate in migraine prevention. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 7(11), 1377-1386.
- Fisher, R. S., Boas, W. V. E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P. ve Engel, J. (2005). Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470-472.
- Fleiderovich, I. A., Friedman, A. ve Gutnick, M. J. (1996). Slow inactivation of Na⁺ current and slow cumulative spike adaptation in mouse and guinea-pig neocortical neurons in slices. *Journal of Physiology*, 493(1), 83-97.
- Gaitatzis, A., Johnson, A. L., Chadwick, D. W., Shorvon, S. D. ve Sander, J. W. (2004). Life expectancy in people with newly diagnosed epilepsy. *Brain*, 127(11), 2427-2432.
- Garnett, W. R. (2000). Clinical pharmacology of topiramate: A review. *Epilepsia*, 41(1), 61-65.

- Gidal, B. E., Sheth, R. D., Hutson, P. R. ve Stanko, H. A. (2003). Oral absorption kinetics of levetiracetam: Effect of mixing with foods or enteral nutrition formulas. *Epilepsia*, 44(9), 99-102.
- Gisclon, L. G., Curtin, C. R. ve Kramer, L. D. (1994). The steady-state (SS) pharmacokinetics (PK) of phenytoin (Dilantin®) and topiramate (TOPAMAX™) in epileptic patients on monotherapy and during combination therapy. *Epilepsia*, 35(8), 54-58.
- Givon, L., Porter, S., Padmanabhan, B., Goren, J. ve Cohen, P. A. (2011). Levetiracetam, seizures, and suicidality. *Harvard Review of Psychiatry*, 19(1), 47-55.
- Glauser, T., Shinnar, S., Gloss, D., Alldredge, B., Arya, R., Bainbridge, J., Bare, M., Bleck, T., Dodson, W. E., Garrity, L., Jagoda, A., Lowenstein, D., Pellock, J., Riviello, J., Sloan, E. ve Treiman, D. M. (2016). Evidence-based guideline: Treatment of convulsive status epilepticus in children and adults: Report of the Guideline Committee of the American Epilepsy Society. *Epilepsy & Behavior*, 16(1), 48-61.
- Gonçalves, J., Alves, G., Bicker, J., Falcão, A. ve Fortuna, A. (2018). Development and full validation of an innovative HPLC-diode array detection technique to simultaneously quantify lacosamide, levetiracetam and zonisamide in human plasma. *Bioanalysis*, 10(6), 1-13.
- Hakami, T. (2021). Neuropharmacology of antiseizure drugs. *Neuropsychopharmacology Reports*, 41(3), 336-351.
- Harada, S., Tanaka, S., Takahashi, Y., Matsumura, H., Shimamoto, C., Nakano, T. ve Nakahari, T. (2013). Inhibition of Ca²⁺-regulated exocytosis by levetiracetam, a ligand for SV2A, in antral mucous cells of guinea pigs. *European Journal of Pharmacology*, 721(1), 185-192.
- Herrero, A. I., Del Olmo, N., González-Escalada, J. R. ve Solís, J. M. (2002). Two new actions of topiramate: Inhibition of depolarizing GABA_A mediated responses and activation of a potassium conductance. *Neuropharmacology*, 42(2), 210-220.
- Hirtz, D., Thurman, D. J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A.R. ve Zalutsky, R. (2007). How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology*, 68(5), 326–37.

- Horstmann, R., Bonn, R., Cawello, W., Doty, P. ve Rudd, D. (2002). Basic clinical pharmacological investigations of the new antiepileptic drug SPM 927. *Epilepsia*, 43(7), 188-92.
- Hovinga, C. A. (2003). SPM-927 (Schwarz Pharma). *IDrugs*, 6(5), 479–485.
- Howard, P., Remi, J., Remi, C., Charlesworth, S., Whalley, H., Bhatia, R., Hitchens, M., Mihalyo, M. ve Wilcock, A. (2018). Levetiracetam. *Journal of Pain and Symptom Management*, 56(4), 645-649.
- Hoy, S. M. (2013). Lacosamide: A review of its use as adjunctive therapy in the management of partial-onset seizures. *CNS Drugs*, 27(12), 1125-1142.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (2024). *Validation of analytical procedures: Text and methodology* (ICH Q2 (R2)). International Conference on Harmonisation.
- Ishikawa, A. A., Silva, R. M. da, Santos, M. S. F., da Costa, E. T., Sakamoto, A. C., Carrilho, E., de Gaitani, C. M. ve Garcia, C. D. (2018). Determination of topiramate by capillary electrophoresis with capacitively-coupled contactless conductivity detection: A powerful tool for therapeutic monitoring in epileptic patients. *Electrophoresis*, 39(1), 1-7.
- Janz, R., Goda, Y., Geppert, M., Missler, M. ve Südhof, T. C. (1999). SV2A and SV2B function as redundant Ca^{2+} regulators in neurotransmitter release. *Neuron*, 24(1), 1003-1016.
- Johannessen, S. I. (1997). Pharmacokinetics and interaction profile of topiramate: Review and comparison with other newer antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 38(1), 18-23.
- Jonsson, J. A. (1987). *Chromatographic theory and basic principles*. New York: Marcel Dekker.
- Jorgenson, J. W. ve Lukacs, K. D. (1981). Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries. *Analytical Chemistry*, 53(8), 1298-1302.
- Kaminski, R. M., Banerjee, M. ve Rogawski, M. A. (2004). Topiramate selectively protects against seizures induced by ATPA, a GluR5 kainate receptor agonist. *Neuropharmacology*, 46(7), 1097-1104.
- Kanner, A. M. (2013). Do psychiatric comorbidities have a negative impact on the course and treatment of seizure disorders? *Current Opinion in Neurology*, 26(2), 208-213.
- Kaur, H., Kumar, B. ve Medhi, B. (2016). Antiepileptic drugs in development pipeline: A recent update. *eNeurologicalSci*, 4(1), 42-51.

- Khalil, N. Y., AlRabiah, H. K., Al Rashoud, S. S., Bari, A. ve Wani, T. A. (2019). Topiramate: Comprehensive profile. *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, 44(1), 333–378.
- Klitgaard, H. ve Matagne, A. (2002). Levetiracetam enhances markedly the seizure suppression of other antiepileptic drugs in amygdala-kindled rats. *Epilepsia*, 43(7), 219-23.
- Klitgaard, H. ve Verdu, P. (2007). Levetiracetam: The first SV2A ligand for the treatment of epilepsy. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(11), 1537-1545.
- Kossoff, E. H., Bergey, G. K., Freeman, J. M. ve Vining, E. P. (2001). Levetiracetam psychosis in children with epilepsy. *Epilepsia*, 42(1), 1611-1613.
- Kropeit, D., Koch, B., Schiltmeyer, B., Cawello, W. ve Horstmann, R. (2005). Low drug-drug-interaction potential of lacosamide. *Journal of Pain*, 6(3), 34-38.
- Kuhn, J. ve Knabbe, C. (2013). Fully validated method for rapid and simultaneous measurement of six antiepileptic drugs in serum and plasma using ultra-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta*, 110(1), 71-80.
- Kuhn, R. ve Hoffstetter-Kuhn, S. (1993). *Capillary electrophoresis: Principles and practice*. Berlin: Springer-Verlag.
- Kuhr, W. G. ve Monnig, C. A. (1992). Fundamental reviews: Capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 64(5), 389-407.
- Kwan, P. ve Brodie, M. J. (2000). Early identification of refractory epilepsy. *The New England Journal of Medicine*, 342(5), 314-319.
- Labat, R. (1951). Akkadian treatise on medical diagnostics and prognoses. *Académie Internationale d'Histoire des Sciences*, 80(1), 188–199.
- LaFrance, W. C. Jr., Baker, G. A., Duncan, R., Goldstein, L. H. ve Reuber, M. (2013). Minimum requirements for the diagnosis of psychogenic nonepileptic seizures: A staged approach: A report from the International League Against Epilepsy Nonepileptic Seizures Task Force. *Epilepsia*, 54(11), 2005-2018.
- Landers, J. P. (1994). *Handbook of capillary electrophoresis*. Boca Raton: CRC Press.
- Landmark, J. C. ve Patsalos, P. N. (2010). Drug interactions involving the new second- and third-generation antiepileptic drugs. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 10(1), 119–140.

- Langtry, H. D., Gillis, J. C. ve Davis, R. (1997). Topiramate: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in the management of epilepsy. *Drugs*, 54(5), 752-773.
- LaRoche, S. M. ve Helmers, S. L. (2004). The new antiepileptic drugs: Clinical applications. *JAMA*, 291(5), 615-620.
- Lattanzi, S., Cagnetti, C., Foschi, N., Provinciali, L. ve Silvestrini, M. (2017). Lacosamide during pregnancy and breastfeeding. *Neurol Neurochir Pol*, 51(3), 266-269.
- Laveille, C., Schoemaker, R. ve Stockis, A. (2012). Exposure–response modeling of lacosamide in adjunctive treatment of patients with partial-onset seizures. *Epilepsia*, 53(5), 51-55.
- Lerche, H., Shah, M., Beck, H., Noebels, J., Johnston, D. ve Vincent, A. (2013). Ion channels in genetic and acquired forms of epilepsy. *The Journal of Physiology*, 591(3), 753-764.
- Li, Z. R., Wang, C. Y., Zhu, X. ve Jiao, Z. (2021). Population pharmacokinetics of levetiracetam: A systematic review. *Clinical Pharmacokinetics*, 60(3), 305-318.
- Lindsay, S. (1992). *High performance liquid chromatography*. New York: Wiley.
- Longrigg, J. (2000). Epilepsy in ancient Greek medicine: the vital step. *Seizure*, 9(1), 12-21.
- Lynch, B. A., Lambeng, N., Nocka, K., Kensel-Hammes, P., Bajjalieh, S. M., Matagne, A. ve Fuks, B. (2004). The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9861-9866.
- Lyseng-Williamson, K. A. ve Yang, L. P. H. (2007). Topiramate: A review of its use in the treatment of epilepsy. *Drugs*, 67(15), 2231-2256.
- Mandrioli, R., Musenga, A., Kenndler, E., De Donno, M., Amore, M. ve Raggi, M. A. (2010). Determination of topiramate in human plasma by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(6), 1319-1323.
- Manhapra, A., Chakraborty, A. ve Arias, A. J. (2019). Topiramate pharmacotherapy for alcohol use disorder and other addictions: A narrative review. *Journal of Addiction Medicine*, 13(1), 7–22.

- Maryanoff, B. E. (2016). Phenotypic assessment and the discovery of topiramate. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 7(7), 662–665.
- Mazarati, A. M., Baldwin, R., Klitgaard, H., Matagne, A. ve Wasterlain, C. G. (2004). Anticonvulsant effects of levetiracetam and levetiracetam-diazepam combinations in experimental status epilepticus. *Epilepsy Research*, 58(2), 167-174.
- Mazurkiewicz-Będziska, M., Szmuda, M., Zawadzka, M. ve Matheisel, A. (2014). Current treatment of convulsive status epilepticus: A therapeutic protocol and review. *Anaesthesiology Intensive Therapy*, 46(4), 293-300.
- McCorry, D. Chadwick, D. ve Marson, A. (2004). Current drug treatment of epilepsy in adults. *The Lancet Neurology*, 3(5), 729-735.
- McLean, M. J., Bukhari, A. A. ve Wamil, A. W. (2000). Effects of topiramate on sodium-dependent action-potential firing by mouse spinal cord neurons in cell culture. *Epilepsia*, 41(1), 21-24.
- McNamara, J. O. (2001). Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In J. G. Hardman, L. E. Limbird ve A. G. Gilman (Editörler), *Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics* (10. baskı, s. 521-545). New York: The McGraw-Hill.
- Meurs, A., Clinckers, R., Ebinger, G., Michotte, Y. ve Smolders, I. (2006). Substantia nigra is an anticonvulsant site of action of topiramate in the focal pilocarpine model of limbic seizures. *Epilepsia*, 47(9), 1519-1535.
- Mickus, T., Jung, H. ve Spruston, N. (1999). Properties of slow, cumulative sodium channel inactivation in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biophysical Journal*, 76(2), 846-860.
- Moldrich, R. X., Chapman, A. G., De Sarro, G. ve Meldrum, B. S. (2003). Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy. *European Journal of Pharmacology*, 476(1-2), 3-16.
- Moshe, S. L., Perucca, E., Ryvlin, P. ve Tomson, T. (2015). Epilepsy: New advances. *The Lancet*, 385(9971), 884-898.
- Mula, M. ve Sander, J. W. (2007). Suicidal ideation in epilepsy and levetiracetam therapy. *Epilepsy & Behavior*, 11(1), 130-132.
- Nayak, R. K., Gisclon, L. G., Curtin, C. A. ve Benet, L. Z. (1994). Estimation of the absolute bioavailability of topiramate in humans without intravenous data. *Journal of Clinical Pharmacology*, 34(10), 1029-1035.

- Neligan, A., Bell, G. S., Shorvon, S. D. ve Sander, J. W. (2010). Temporal trends in the mortality of people with epilepsy: a review. *Epilepsia*, 51(11), 2241-2246.
- Nevitt, S. J., Sudell, M., Weston, J., Tudur Smith, C. ve Marson, A. G. (2017). Antiepileptic drug monotherapy for epilepsy: A network meta-analysis of individual participant data. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12(12), 11412
- Newton, C. R. ve Garcia, H. H. (2012). Epilepsy in poor regions of the world. *Lancet*, 380(9848), 1193–201.
- Ngugi, A. K., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Sander, J. W. ve Newton, C. R. (2010). Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia*, 51(5), 883–90.
- Ngugi, A. K., Kariuki, S. M., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Sander, J. W. ve Newton, C. R. (2011). Incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*, 77(10), 1005–12.
- Ohman, I., Vitols, S., Luef, G., Söderfeldt, B. ve Tomson, T. (2002). Topiramate kinetics during delivery, lactation, and in the neonate: Preliminary observations. *Epilepsia*, 43(10), 1157-1160.
- Palmieri, C. ve Canger, R. (2002). Teratogenic potential of the newer antiepileptic drugs: What is known and how should this influence prescribing? *CNS Drugs*, 16(11), 755-756.
- Pasternack, M., Voipio, J. ve Kaila, K. (1993). Intracellular carbonic anhydrase activity and its role in GABA-induced acidosis in isolated rat hippocampal pyramidal neurons. *Acta Physiologica Scandinavica*, 148(3), 229-231.
- Patsalos, P. N. (2000). Pharmacokinetic profile of levetiracetam: Toward ideal characteristics. *Pharmacology & Therapeutics*, 85(1), 77-85.
- Patsalos, P. N. (2004). Clinical pharmacokinetics of levetiracetam. *Clinical Pharmacokinetics*, 43(1), 707-724.
- Patsalos, P. N., Spencer, E. P. ve Berry, D. J. (2018). Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs in epilepsy: A 2018 update. *Therapeutic Drug Monitoring*, 40(5), 526-548.
- Patsalos, P. N., Spencer, E. P. ve Berry, D. J. (2018). Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs in epilepsy: a 2018 update. *Therapeutic Drug Monitoring*, 40(5), 526-548.

- Perucca, E. (1999). The clinical pharmacokinetics of the new antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 40(9), 7-13.
- Perucca, E. (2006). Clinically relevant drug interactions with antiepileptic drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 61(3), 246-255.
- Perucca, E. ve Bialer, M. (1996). The clinical pharmacokinetics of the newer antiepileptic drugs: Focus on topiramate, zonisamide, and tiagabine. *Clinical Pharmacokinetics*, 31(1), 29-46.
- Perucca, E. ve Tomson, T. (2011). The pharmacological treatment of epilepsy in adults. *The Lancet Neurology*, 10(5), 446-456.
- Perucca, E., French, J. ve Bialer, M. (2007). Development of new antiepileptic drugs: Challenges, incentives, and recent advances. *The Lancet Neurology*, 6(10), 793-804.
- Perucca, E., Gidal, B. E. ve Bates, E. (2003). Effects of antiepileptic comedication on levetiracetam pharmacokinetics: A pooled analysis of data from randomized adjunctive trials. *Epilepsy Research*, 53(1), 47-56.
- Petkar, S., Hamid, T., Iddon, P., Clifford, A., Rice, N., Claire, R., McKee, D., Curtis, N., Cooper, P. N. ve Fitzpatrick, A. P. (2012). Prolonged implantable electrocardiographic monitoring indicates a high rate of misdiagnosis of epilepsy—revise study. *Europace*, 14(11), 1653-1660.
- Petroff, O. A. C. (2002). GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist*, 8(6), 562-73.
- Pichardo, L. A., Contreras, I. J., Zamudio, S. R., Mixcoha, E. ve Mendoza, J. G. (2016). Synaptic vesicle protein 2A as a novel pharmacological target with broad potential for new antiepileptic drugs. In A. Talevi & L. Rocha (Editörler), *Antiepileptic Drug Discovery: Novel Approaches, Methods in Pharmacology and Toxicology* (1. Baskı ss. 123-146). Heidelberg: Springer.
- Potschka, H., Baltes, S. ve Löscher, W. (2004). Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilepsy Research*, 58(2), 85-91.
- Pucci, V., Bugamelli, F., Mandrioli, R., Ferranti, A., Kenndler, E. ve Raggi, M. A. (2004). High-performance liquid chromatographic determination of levetiracetam in human plasma: Comparison of different sample clean-up procedures. *Biomedical Chromatography*, 18(1), 37-44.

- Rai, D., Kerr, M. P., McManus, S., Jordanova, V., Lewis, G. ve Brugha, T. S. (2012). Epilepsy and psychiatric comorbidity: A nationally representative population-based study. *Epilepsia*, 53(6), 1095-1103.
- Rang, H. P. ve Dale, M. M. (2012). *Rang and Dale's pharmacology* (7. baskı). London: Elsevier Churchill Livingstone.
- Rheims, S. ve Ryvlin, P. (2014). Pharmacotherapy for tonic-clonic seizures. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 15(10), 1417-1426.
- Rho, J. M. ve Sankar, R. (1999). The pharmacologic basis of antiepileptic drug action. *Epilepsia*, 40(11), 1471-1483.
- Riekkola, M. L. ve Kenndler, E. (2013). *Micellar Electrokinetic Chromatography: Applications and Principles*. Springer Science & Business Media.
- Rosenfeld, W. E., Liao, S. ve Kramer, L. D. (1997). Comparison of the steady-state pharmacokinetics of topiramate and valproate in patients with epilepsy during monotherapy and concomitant therapy. *Epilepsia*, 38(3), 324-333.
- Ruusuvori, E. ve Kaila, K. (2014). Carbonic anhydrases and brain pH in the control of neuronal excitability. *Subcellular Biochemistry*, 75(1), 271-290.
- Sachdeo, R. C., Sachdeo, S. K., Walker, S. A., Kramer, L. D., Nayak, R. K. ve Doose, D. R. (1996). Steady-state pharmacokinetics of topiramate and carbamazepine in patients with epilepsy during monotherapy and concomitant therapy. *Epilepsia*, 37(8), 774-780.
- Sachdeo, R. C., Sachdeo, S. K., Walker, S. A., Kramer, L. D., Nayak, R. K. ve Doose, D. R. (1996). Steady-state pharmacokinetics of topiramate and carbamazepine in patients with epilepsy during monotherapy and concomitant therapy. *Epilepsia*, 37(8), 774-780.
- Salido-Fortuna, S., Casado, N., Castro-Puyana, M. ve Marina, M. L. (2021). Use of choline chloride-D-sorbitol deep eutectic solvent as additive in cyclodextrin-electrokinetic chromatography for the enantiomeric separation of lacosamide. *Microchemical Journal*, 160(1), 10566-73.
- Sanchez, J. D., Gómez-Carpintero, J., González, J. F. ve Menéndez, J. C. (2024). Twenty-first century antiepileptic drugs: An overview of their targets and synthetic approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 272(1), 116476.

- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L. ve Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512-521.
- Scott, R. P. W. (1995). *Liquid chromatography for the analyst*. New York: Marcel Dekker.
- Scurlock, J. ve Andersen, B. R. (2005). Diagnoses in Assyrian and Babylonian medicine. *Chicago: Univ. of Illinois Press*, 315–23
- Senanayake, N. ve Roman, G. C. (1993). Epidemiology of epilepsy in developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*, 71(2), 247-258.
- Sewell, P. ve Clarke, B. (1988). *Chromatographic separations*. New York: Wiley.
- Shank, R. P. ve Maryanoff, B. E. (2008). Molecular pharmacodynamics, clinical therapeutics, and pharmacokinetics of topiramate. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 14(2), 120-142.
- Shank, R. P., Doose, D. R., Streeter, A. J. ve Bialer, M. (2005). Plasma and whole blood pharmacokinetics of topiramate: The role of carbonic anhydrase. *Epilepsy Research*, 63(2), 103-112.
- Shank, R. P., Gardocki, J. F., Vaught, J. L., Davis, C. B., Schupsky, J. J., Raffa, R. B., Dodgson, S. J., Nortey, S. O. ve Maryanoff, B. E. (1994). Topiramate: Preclinical evaluation of a structurally novel anticonvulsant. *Epilepsia*, 35(2), 450–460.
- Sheets, P. L., Heers, C., Stoehr, T. ve Cummins, T. R. (2008). The role of lacosamide in slow sodium channel inactivation in the treatment of epilepsy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(1), 89-99.
- Shihabi, Z. K., Oles, K. ve Hinsdale, M. (2003). Analysis of the antiepileptic drug keppra by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1004(1-2), 9-12.
- Shorvon, S. D. (2001). Pyrrolidone derivatives. *Lancet*, 358(1), 1885-1892.
- Shorvon, S. D. (2011). The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*, 52(6), 1052-1057.
- Sills, G. J. ve Rogawski, M. A. (2020). Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology*, 168(1), 107966.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. ve Crouch, S. R. (2003). *Fundamentals of analytical chemistry* (8. baskı). Belmont: Thomson-Brooks Cole.

- Smith, D., Defalla, B. A. ve Chadwick, D. W. (1999). The misdiagnosis of epilepsy and the management of refractory epilepsy in a specialist clinic. *QJM: An International Journal of Medicine*, 92(1), 15-23.
- Sneha, L. R. P. (2015). A review on chromatography with high performance liquid chromatography (HPLC) and its functions. *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(1), 2340-47.
- Snoeck, E., Schoemaker, R., Stockis, A., Otoul, C. ve Sargentini-Maier, M. L. (2008). Levetiracetam exposure-response analysis in children with partial-onset seizures. *Abstracts of the Annual Meeting of the Population Approach Group in Europe*, 17, 1403. (ISSN 1871-6032).
- Snyder, L. R. ve Kirkland, J. J. (1996). *Introduction to modern liquid chromatography* (3. baskı). New York: Wiley.
- Sperling, M. R., Rosenow, F., Faught, E., Hebert, D., Doty, P. ve Isojarvi, J. (2014). Efficacy of lacosamide by focal seizure subtype. *Epilepsy Research*, 108(8), 1392-1398.
- Stafstrom, C. E. ve Carmant, L. (2015). Seizures and epilepsy: An overview for neuroscientists. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(6), a022426.
- Stockis, A., Lu, S., Tonner, F. ve Otou, C. (2009). Clinical pharmacology of levetiracetam for the treatment of epilepsy. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 2(4), 339-350.
- Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A. ve Ando, T. (1984). Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Analytical Chemistry*, 56(1), 111-113.
- Thomas, D., Scharfenecker, U., Schiltmeyer, B., Doty, P., Cawello, W. ve Horstmann, R. (2006). Low potential for drug-drug-interaction of lacosamide. *European Journal of Pain*, 10(1), 167-168.
- Thurman, D. J., Beghi, E., Begley, C. E., Berg, A. T., Buchhalter, J. R., Ding, D., Hesdorffer, D. C., Hauser, W. A., Kazis, L., Kobau, R., Kroner, B., Labiner, D., Liow, K., Logroscino, G., Medina, M. T., Newton, C. R., Parko, K., Paschal, A., Preux, P. ve Wiebe, S. (2011). Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. *Epilepsia*, 52(7), 2-26.
- Tiselius, A. (1937). A study of electrophoresis and adsorption analysis: The moving boundary method. *Transactions of the Faraday Society*, 33(1), 524-531.

- Trinka, E., Unterrainer, J., Unterberger, I., Luef, G., Deisenhammer, F. ve Bauer, G. (2002). One-year postmarketing experience with levetiracetam for treatment of drug-resistant epilepsy: A cross-sectional study. *Epilepsia*, 43(7), 202-06.
- Vazquez, B. (2004). Monotherapy in epilepsy: Role of the newer antiepileptic drugs. *Archives of Neurology*, 61(9), 1361-1365.
- Wei, F., Yan, L. M., Su, T., He, N., Lin, Z. J., Wang, J., Shi, Y. W., Yi, Y. H. ve Liao, W. P. (2017). Ion channel genes and epilepsy: Functional alteration, pathogenic potential, and mechanism of epilepsy. *Neuroscience Bulletin*, 33(4), 455-477.
- White, H. S. (2005). Molecular pharmacology of topiramate: Managing seizures and preventing migraine. *Headache*, 45(1), 48-56.
- White, H. S., Smith, M. D. ve Wilcox, K. S. (2007). Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *International Review of Neurobiology*, 81(1), 85-110.
- Wiebe, S., Blume, W. T., Girvin, J. P., Eliasziw, M. ve The Effectiveness and Efficiency of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study Group. (2001). A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *The New England Journal of Medicine*, 345(5), 311-318.
- Wright, C., Downing, J., Mungall, D., Khan, O., Williams, A., Fonkem, E., Garrett, D., Aceves, J. ve Kirmani, B. (2013). Clinical pharmacology and pharmacokinetics of levetiracetam. *Frontiers in Neurology*, 4(1), 192.
- Ylikotila, P., Ketola, R. A., Timonen, S., Malm, H. ve Ruuskanen, J. O. (2015). Early pregnancy cerebral venous thrombosis and status epilepticus treated with levetiracetam and lacosamide throughout pregnancy. *Reproductive Toxicology*, 57(1), 204-206.
- Youroukos, S., Lazopoulou, D., Michelakou, D. ve Karagianni, J. (2003). Acute psychosis associated with levetiracetam. *Epileptic Disorders*, 5(1), 117-119.
- Zhang, X., Velumian, A. A., Jones, O. T. ve Carlen, P. L. (2000). Modulation of high-voltage-activated calcium channels in dentate granule cells by topiramate. *Epilepsia*, 41(1), 52-60.
- Zwierzyńska, E. ve Pietrzak, B. (2021). The antiepileptic drug lacosamide and memory—a preclinical study. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 125(1), 108401.

ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nurlan RASHIDOV

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim ve Mesleki Geçmişi

- 2013-2017, Bakü Devlet Üniversitesi, Kimya Fakültesi (Lisans)
- 2017-2019, Anadolu Üniversitesi, /Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Bilim Dalı (Yüksek Lisans)
- 2019-2025, Anadolu Üniversitesi, /Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı (Doktora)