



**LAKOZAMİTİN ELEKTROKİMYASAL VE
DİYOT DİZİ DEDEKTÖRLÜ SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE FARMASÖTİK
PREPARATLARINDAN TAYİNİ**

Yüksek Lisans

Saadat ALLAHYAROVA

Eskişehir 2023

**LAKOZAMİTİN ELEKTROKİMYASAL VE DİYOT DİZİ DEDEKTÖRLÜ SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE FARMASÖTİK PREPARATLARINDAN TAYİNİ**

Saadat ALLAHYAROVA

YÜKSEK LİSANS

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Erol ŞENER**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Temmuz 2023**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Saadat ALLAHYAROVA'nın "Lakozamitin Elektrokimyasal ve Diyot Dizi Dedektörlü Sıvı Kromatografisi ile Farmasötik Preparatlarından Tayini" başlıklı tezi 03/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Erol ŞENER	
Üye	: Prof. Dr. Duygu Yeniceli UĞUR	
Üye	: Doç. Dr. Elif Mine Öncü KAYA	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

LAKOZAMİTİN ELEKTROKİMYASAL ve DİYOT DİZİ DEDEKTÖRLÜ SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE FARMASÖTİK PREPARATLARINDAN TAYİNİ

Saadat ALLAHYAROVA

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz, 2023

Danışman: Doç. Dr. Erol ŞENER

Lakozamid epilepsi hastalarında nöbet kontrolü sağlamak amacıyla kullanılan yeni nesil antiepileptik ilaçtır. Beyindeki sinir hücrelerinin elektriksel aktivitesini düzenleyerek epileptik nöbetlerin şiddetinin ve sıklığının azaltılmasına yardımcı olur.

Bu çalışmada Lakozamidin tayini için yeni Yüksek Basıncılı Sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmalar sırasında 3.5 µm iç çapı olan Agilent Zorbax C18 (3.00×10 mm) kolonu kullanılmıştır. Yöntem sırasında hareketli faz olarak 50mM KH₂PO₄ ve MeOH kullanılmış, 1ml/dk hızında çalışılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C, enjeksiyon hacmi ise 3 µL olacak şekilde ayarlanmıştır. Diyot dizi dedektörü kullanılarak analitlerin saptanması, 210 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Yöntem ICH kılavuzuna göre valide edilmiştir. Ağırlıklı regresyon hesaplamaları yapılmıştır. Lakozamid için 0,1 µg/mL – 50 µg/mL aralığında doğrusallık grafiği çizilmiştir. Saptama sınırı ve tayin sınırı değerleri sırasıyla 0,0622 µg/mL ve 0,1866 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Lakozamid, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, Diyot Dizi Detektör, Elektrokimyasal Detektör

ABSTRACT

DETERMINATION OF LACOSAMIDE FROM PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY ELECTROCHEMICAL AND LIQUID CHROMATOGRAPHY

Saadat ALLAHYAROVA

Department of Analytical Chemistry
Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July, 2023

Supervisor: Associate Professor Erol ŞENER

Lacosamide is a new generation antiepileptic drug used to control seizures in patients with epilepsy. It helps to reduce the intensity and frequency of epileptic seizures by regulating the electrical activity of nerve cells in the brain.

In this study, a new High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) method was developed for the determination of Lacosamide. During the study, an Agilent Zorbax C18 (3.00×10 mm) column with a particle size of 3.5 µm was used. The mobile phase consisted of 50mM KH₂PO₄ and MeOH, and the method was operated at a flow rate of 1 ml/min. The column temperature was set at 30°C, and the injection volume was 3 µL. Detection of the analytes was performed using a diode array detector at a wavelength of 210 nm.

The method was validated according to the ICH guidelines. Weighted regression calculations were performed, and a linearity graph was plotted for Lacosamide in the concentration range of 0.1 µg/mL to 50 µg/mL. The values for the limit of detection and limit of quantitation were calculated as 0,0622 µg/mL and 0,1866 µg/ml, respectively.

Keywords: : Lacosamide, High Performance Liquid Chromatography, Diode Array Detector, Electrochemical Detector.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. Erol ŞENER'e,

Her zaman bilgi ve önerileriyle desteğini ve yardımını eksik etmeyen, laboratuvar çalışmalarına katkılarından dolayı değerli Kadri GÜLEÇ'e,

Değerli bilgi ve tecrübeleri ile bana her zaman yol gösteren hocam Dr Öğr. Üyesi Sakine Atila KARACA'ya

Destek ve yardımları ile her zaman yanımda olan hocam Dr Öğr. Üyesi Saniye Özcan'a

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Sayın Hocalarım ve arkadaşlarıma,

Bu hayattaki en büyük şansım, sonsuz minnettar olduğum aileme 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 edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla 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.

Saadat ALLAHYAROVA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Epilepsi	2
2.2. Antiepileptik ilaçlar	2
2.3. Lakozamidin Kimyasal Özellikleri.....	2
2.4. Farmakolojik Özellikler	3
2.5. Lakozamid ile Yapılmış Çalışmalar	4
2.6. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	5
2.7. Dedektör	6
2.7.1. Diyot Dizisi Dedektörü (DAD)	6
2.7.2. Elektrokimyasal dedektör (ED)	7
3. KULLANILAN CİHAZ ve KİMYASALLAR	8
3.1. Kullanılan Kimyasal	8
3.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	7
4. YÖNTEM	9
4.1. Standart Stok Çözeltilerin ve İç Standardın Hazırlanması	9

4.2. Tablet Numune Çözeltilerinin Hazırlanması	9
4.3. Kromatografik Koşullar ve Çalışma Tamponu	9
4.4. Yöntemin Validasyonu	9
4.4.1. Doğrusallık (Linearity).....	9
4.1.2. Doğruluk (Accuracy).....	10
4.4.3. Kesinlik (Precision).....	10
4.1.2. Saptama sınırı ve tayin sınırı (Limit of dedektion-Limit of quantification).....	10
4.5. Bozunma Ürünü Tayini	11
4.5.1. Asidik bozunma.....	11
4.5.2. Bazik bozunma.....	11
4.5.3. H ₂ O ₂ bozunma.....	11
4.5.4. Sıcaklıkla bozunma.....	11
4.5.5. Işık ile bozunma.....	11
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	12
5.1. Yöntem Optimizasyonu	12
5.2. Yöntem Validasyonu.....	14
5.2.1. Doğrusallık.....	14
5.2.2. Doğruluk	15
5.2.1. Kesinlik.....	15
5.2.2. Sağlamlık.....	10
5.3. Bozunma ürünü tayini.....	17
5.2.1. Asidik bozunma... ..	17
5.2.2. Bazik bozunma.....	19
5.2.3. H ₂ O ₂ bozunma....	20
5.2.4. Sıcaklık.....	10
5.3. Bozunma ürünü tayini.....	10

5. SONUÇ ve ÖNERİLER	24
-----------------------------------	-----------

KAYNAKÇA	25
-----------------------	-----------

EKLER

ÖZGEÇMİŞ



ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 5.1. Etki tablosu	13
Çizelge 5.2. Optimum çalışma koşulları	13
Çizelge 5.3. Optimum koşullarda gözlenen sistem uygunluk testi sonuçları	13
Çizelge 5.4. Doğrusallık analizi sonuçları	14
Çizelge 5.5. Doğruluk analizi sonuçları	15
Çizelge 5.6. 0,5 µg/mL için kesinlik analizi sonuçları	15
Çizelge 5.7. 10 µg/mL için kesinlik analizi sonuçları	16
Çizelge 5.8. 50 µg/mL için kesinlik analizi sonuçları	16
Çizelge 5.8. LKZ çözeltisinin bozundurma koşulları	17

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Laktozamidin kimyasal yapısı	3
Şekil 2.2. Diyot Dizi Dedektörün çalışma prensibi	6
Şekil 2.3. Elektrokimyasal Detektörün çalışma prensibi	6
Şekil 5.1. 1.5 saat boyunca oda sıcaklığında 0.5 N HCl bekletilen LKZ kromatogramı	17
Şekil 5.2. LKZ içermeyen 0,5 N HCL çözeltisinin kromatogram.....	17
Şekil 5.3. 24s saat boyunca oda sıcaklığında 0.5 N HCl bekletilen LKZ kromatogramı	18
Şekil 5.4. 48s 60°C’de oda sıcaklığında asitle muamele edilen LKZ kromatogramı	18
Şekil 5.5. 1.5 saat boyunca oda sıcaklığında 0.5 N NaOH bekletilen LKZ kromatogramı	19
Şekil 5.6. LKZ içermeyen 0,5 N NaOH çözeltisinin kromatogramı	19
Şekil 5.7. 24 saat boyunca oda sıcaklığında 0.5 N NaOH bekletilen LKZ kromatogramı	20
Şekil 5.8. 48 saat boyunca oda sıcaklığında 0.5 N NaOH bekletilen LKZ kromatogramı	20
Şekil 5.9. 1.5 saat boyunca oda sıcaklığında %10 H ₂ O ₂ bekletilen LKZ kromatogramı	20
Şekil 5.10. LKZ içermeyen %10 H ₂ O ₂ çözeltisinin kromatogramı.....	21
Şekil 5.11. 24 saat boyunca oda sıcaklığında %10 H ₂ O ₂ bekletilen LKZ kromatogramı	21

Şekil 5.12. 48 saat boyunca oda sıcaklığında %10 H ₂ O ₂ bekletilen	
LKZ kromatogramı	21
Şekil 5.13. 1.5saat boyunca su banyosunda 60 °C ‘de bekletilen	
LKZ kromatogramı	22
Şekil 5.14. LKZ’nin 24 saat boyunca ışık’ta bekletilmesi sonucunda	
LKZ kromatogramı	22



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	: Asetonitril
DAD	: Diyot Dizi DeTektör
ICH	: Uluslararası Uyumlandırma Konferansı
HCl	: Hidroklorik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
MeOH	: Metanol
mL	: millimetre
µg	: mikrogram
NaOH	: Sodyum Hidroksit

1. GİRİŞ

Son yıllarda, epilepsi tedavisi için birçok yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen, hastaların epileptik nöbetleri sırasında mevcut ilaçların etki mekanizmalarının yetersiz olması sebebiyle nöbet kontrolleri sağlanamamaktadır. Bu durum, epilepsi hastalarının yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemekte ve daha etkili tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ihtiyacını ortaya koymaktadır. Epilepsi tedavisinde temel hedef, hastalar için nöbet kontrolünde etki mekanizması yetersiz kalan mevcut ilaçların yerine daha güçlü etki mekanizmasına sahip yeni antiepileptik ilaçların geliştirilmesidir (Beyreuther vd., 2007).

Epilepsi hastalığında kullanılan yeni antiepileptik ilaçlardan biri de Lakozamid'dir. Dünya genelinde birçok ülkede, Lakozamid kısmi başlangıçlı nöbetleri kontrol altına almak için hem esas hem de yardımcı tedavi olarak kullanılmaktadır. Sağlıklı bir insanın beyindeki elektriksel sinyal oluşumu, sodyum kanallarının aktive olması ve hücreye sodyum iyonlarının geçişine olanak sağlanmasıyla oluşur. Ancak epileptik nöbetler sırasında hastalarda voltaj kapılı sodyum kanallarının inaktivasyon mekanizmasının bozulması ile meydana gelen epileptik deşarjlar beyindeki nöronların anormal şekilde senkronize olarak aşırı uyarılmasına sebep olur. Bu uyarılmış nöronlar normalden daha fazla elektrik sinyali üretir ve beyindeki diğer nöronlara da bu sinyalleri yayarak nöbetlere neden olur. Lakozamid ise voltaj kapılı sodyum kanallarını hedef alarak epileptik nöbetleri önlediği için epilepsi tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Hoy, 2013).

YBSK ilaç etken madde analizlerinde en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. YBSK yönteminin bu kadar çok tercih edilmesinin sebebi madde yapısına göre hareketli fazda değişiklikler yapmaya olanak sağlaması, çeşitli kolon seçeneğinin olması, farklı dedektörlerin hem aynı anda hem de maddeye özgü dedektör seçilebilmesindeki çeşitliliğidir (Nikolin vd., 2004).

Bu tez çalışmasında Lakozamidin Diyot Dizi (DAD) dedektörlü ve Elektrokimyasal dedektörlü (EKD) YBSK kullanılarak analizinin yapılmasına, bu tekniğin geliştirilmesine, doğrulanmasına yöneliktir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

Epilepsi her yaştan insanı etkileyen en yaygın nörolojik bozukluklardan biridir (Banerjee vd., 2009) ve dünya çapında yaklaşık 65 milyon insanı etkilemektedir (Moshé vd., 2015). Bu hastalık beyindeki sinir hücrelerinin anormal bir şekilde elektrik sinyalleri yollamasıyla meydana gelir. Epileptojenik ağların oluşumunda nörotransmitterler (Glutamat, GABA vb.), iyon kanalları (sodyum, potasyum ve kalsiyum kanalları vb.), reseptörler (N-metil-D-aspartat reseptörleri, GABA reseptörleri vb) ve gen ekspresyonu önemli bir rol oynamaktadır (Staley, 2015). Epilepsi hastalığı beyindeki bir fonksiyon bozukluğu olması sebebiyle, beynin etkilenen bölgesine göre semptomlar farklılaşabilir. Genel olarak hastada dalgın bakış, istemsiz kasılmalar, tekrarlayan hareketler, bilinç kaybı gibi belirtiler gözlemlenebilir veya nöbetler şeklinde semptomlar ortaya çıkabilir. (Aykaç, 2020) Şimdiye kadar yapılan araştırmalarda epilepsi hastalığının neden kaynaklandığı ile ilgili kesin bir sonuca varılamamıştır. Ancak yapılan çalışmalar beyin tümörü, alkol, doğum anında oluşan beynin hasarları gibi durumların epilepsi hastalığına sebep olabileceğini göstermiştir (Marangoz ve Yildirim, 2012).

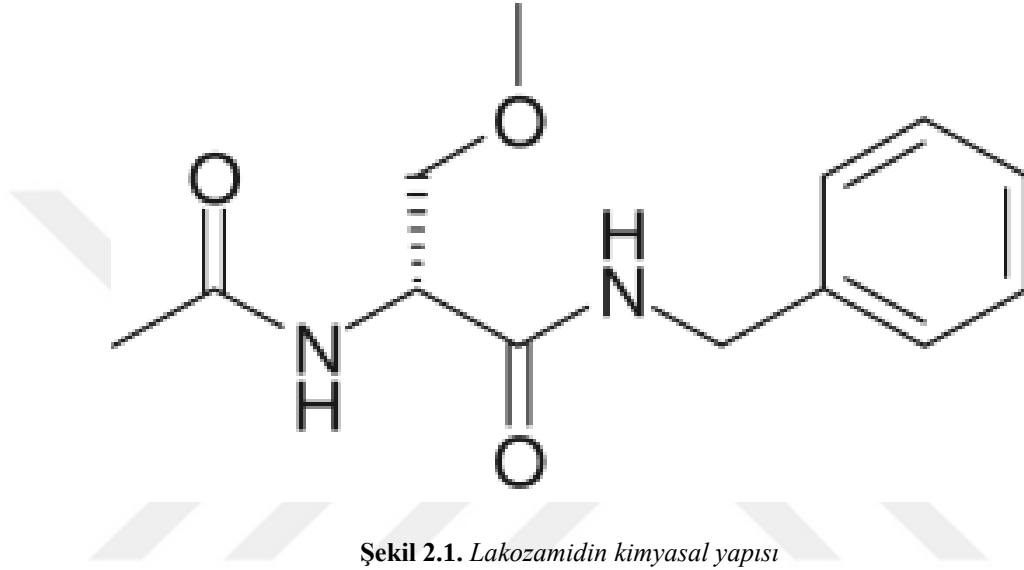
2.2. Antiepileptik İlaçlar

Epilepsi tedavisinde kullanılan antiepileptik ilaçlar, hastanın yaşam kalitesini düşürmeden nöbetleri önlemek veya nöbetlerin şiddetini azaltmak için tasarlanmıştır (Cawello vd, 2014). Antiepileptik ilaçlar epilepsi tedavisinin temel dayanağıdır. Geçtiğimiz son on yılda 14'den fazla antiepileptik ilaç geliştirilmiştir. Bu sayede hastaların gösterdiği semptomlara göre uygulanan tedavi yönteminde kullanılan ilaçların seçiminde de artış görülmüştür. Ancak bu artışa rağmen epileptogeneze karşı nörokoruma sağlamada herhangi bir önemli ilerleme kaydedilememiş, yalnızca hastada oluşan nöbet semptomları kontrol altına alınabilinmiştir (R.Sankaranen vd, 2015). Tedavide kullanılacak olan antiepileptik ilacın seçimi yapılırken, farmakokinetik özellikleri de dikkate alınmalıdır. dikkArzu edilen farmakokinetik özellikler, hızlı ve tam absorpsiyon, aktif metabolitlerin yokluğu, minimum enzim indüksiyonu, hızlı kan-beyin bariyeri penetrasyonu ve renal eliminasyonu içerebilir (Cawello vd., 2014).

2.3. Lakozamidin Kimyasal Özellikleri

Lakozamid (LKZ), UIPAC adı R-2-asetamido-N-benzil-3-metoksipropionamid olan, suda eser miktarda, asetonitril ve etanolde ise az çözünürlüğe sahip açık sarı kristal

yapıda antiepileptik bir etken maddedir (V.K Chakravarthy and D.Gowri Sankar, 2011). LKZ'nin molekül formülü $C_{13}H_{18}N_2O_3$ ve molekül ağırlığı 250.30 g/mol'dur (Beyreuther vd., 2007). LKZ, işlevselleştirilmiş bir amino asittir. İşlevselleştirilmiş amino asitler, belirli kimyasal grupların eklenmesiyle oluşan ve bu kimyasal değişiklikler sebebiyle daha etkili hale getirilebilen türevlerdir (Staley, 2015). LKZ'nin molekül yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



2.4. Farmakolojik Özellikler

LKZ, epilepsi gibi hastalıkların tedavisi için geliştirilmiş yeni nesil antiepileptik bir ilaçtır. Sadece R enantiyomeri terapötik aktiviteye sahiptir (Skořepová vd., 2021) ve aynı zamanda kan-beyin bariyerini geçebilme özelliğine sahip lipofilik bir maddedir. Bu özelliği sayesinde beyne daha hızlı ve verimli bir şekilde ulaşarak nöbetlerin önlenmesine yardımcı olabilir. (Staley, 2015) Aynı zamanda parenteral yolla da uygulanabilmektedir. Bu ilacın etki mekanizması diğer antiepileptik ilaçlardan farklıdır. Fenitoin veya karbamazepin gibi hızla inaktive olan yaygın antiepileptik ilaçların aksine, LKZ sodyum kanalının yavaş inaktivasyonu destekler. Bu, nöronal membranların stabilizasyonuna ve nöronal ateşlemede bir azalmaya yol açar (Zwierzyńska ve Pietrzak, 2021). Kısaca LKZ diğer sodyum kanal bloke edici antiepileptik ilaçlar gibi sodyum kanallarının hızlı inaktivasyonunu etkilemez. Bunun yerine, voltaj kapılı sodyum kanallarının yavaş inaktivasyonunu artırır. (Cawello vd., 2014). Bu mekanizma, nöbetlere neden olan aşırı uyarılmış nöronların, normal işlevini bozmadan aşırı aktif hale gelmesini önleyerek

çalışır. Bu şekilde nöbetlerin oluşması engellenebilir veya şiddeti azaltılabilir (Cawello, 2015).

2.5. Lakozamid ile Yapılmış Çalışmalar

Kestelyn ve ark'nın 2011 yılında yapmış olduğu yayında, insan plazmasındaki LKZ'i tayin etmek için yeni bir Ultraviyole-Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (UV-YBSK) yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem, plazma örneklerinden LKZ'in katı faz ekstraksiyonu işlemine tabi tutulmasını ve daha sonra UV detektörüyle LKZ'nin tespit edilerek miktarının ölçülmesini amaçlamaktadır. Bu yönteme göre öncelikle, metanol ile protein çöktürmesi yapılarak ACE® C18-AR kolonu (2,1 mm x 150 mm, 3,0 µm) ve pH 9 amonyum format tamponu ve asetonitril karışımlarından oluşan bir mobil faz kullanılarak kromatografik ayırma yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi 0,5 ila 12,5 µg/mL aralığında çizilmiş ve LOQ ve LOD değerleri sırasıyla 0,5 µg/mL ve 12,5 µg/mL olarak bulunmuştur. (Kestelyn vd., 2011)

D.G.Shankar ve ark'nın 2011 yılında yapmış olduğu çalışmada YBSK yöntemi geliştirilmiş ve daha sonra bulk ve farmasötik formülasyonlarda lakosamid S(-) enantiyomerinin belirlenmesi için validasyonu yapılmıştır. Ayırmak için izokritik modda 1,0 mL/dk izokritik akış hızında ve eluent olarak %100 etanol içeren mobil fazlı Regis Pack (250 mm x 4,6 mm ID; partikül boyutu 5 µm) kolonu kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C'ye ayarlanmıştır. UV dalga boyu 210 nm kullanılmış, enjeksiyon hacmi 10 µL olacak şekilde ayarlanmıştır. Lakosamid S(-) enantiyomeri için açıklanan yöntemde, 0.128 µg/mL ila 3.0525 µg/mL arasında doğrusallık grafiği çizilmiş ve LOD için 0,0427 µg/mL, LOQ için 0,128 µg/mL olarak belirtilmiştir (V.Kalyan Chakravarthy and D.Gowri Sankar, 2011).

V.K.Chakravarthy ve ark'ı tarafından 2011 yılında bir izokritik ters fazlı sıvı kromatografisi (RP-LC) yöntemi geliştirilmiş ve daha sonra lakosamid ve bunun farmasötik preparatlarının tayini için validasyonu yapılmıştır. Metot Develosil ODS HG (150 mmx4,6 mm iç çap; parçacık boyutu 5 µm) kolon ile elde edilmiştir. Mobil faz olarak NaH₂PO₄ tamponu (pH=3) ve asetonitril 70:30 h/h kullanılmıştır. Akış hızı olarak 1 mL/dak ayarlanmıştır. UV dalga boyu 210 nm'ye ayarlanmış ve numune sıcaklığı oto örnekleyici içerisinde 5 °C'de tutulmuştur. Yöntem basit, hızlı ve seçici olduğunu ifade etmişlerdir. Açıklanan lakosamid yöntemi, 3.996 µg/mL ila 47.952 µg/mL arasında doğrusallık grafiği çizilmiştir. Test maddesinin belirlenmesine yönelik yöntemin kesinliği, %2,0 RSD'den az olduğu belirtilmiştir. Aktif farmasötik bileşenin (API) dozaj

formundan geri kazanım yüzdesi, %100.0 ila %101.3 aralığında hesaplamışlardır (V.K Chakravarthy and D.Gowri Sankar, 2011).

J.Gonçalves ve ark'nın 2018 yılında yapmış olduğu çalışmada insan plazmasında lakozamid ile birlikte levetirasetam ve zonisamidin eş zamanlı miktarının belirlenmesi için ilk YBSK diyot dizisi tespit yöntemini geliştirmiş ve validasyonu yapılmıştır. Ortaya çıkan yeni antiepileptik ilaçların dozajları bireyselleştirmiş ve farmakokinetik takibi yapılmıştır. Kromatografik ayırım C18 kolonu ve su/asetonitril hareketli faz kullanılarak yapılmıştır. UV dalga boyu olarak 220 nm kullanılmıştır. Yöntem validasyonu, ICH yönergelerine göre gerçekleştirmiştir. Bu yenilikçi YBSK yöntemi, epilepsi hastaları için kişiselleştirilmiş ilaç tedavisi sağlamayı amaçlayan klinik uygulamada başarıyla uygulanmıştır (Gonçalves vd., 2018).

Payto, D ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada hassas bir LC–MS/MS analizi yöntemi geliştirilmiş ve insan serumunda LCM ve ODL miktarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada numune hazırlama, metanol ile protein çöktürmesiyle yapılmıştır. Kalibrasyon aralığı 0,95–30,29 µg/ml ve 0,95–30,41 µg/ml iken, genişletilmiş doğrusal aralık LCM ve ODL için sırasıyla 0,41–47,49 µg/ml ve 0,34–48,17 µg/ml ve analitik doğruluk %87,2–106,0 23 olarak belirlenmiştir. Yöntem AB SCIEX QTRAP 5500 (MA, ABD) ile birleştirilmiş bir Nexra Shimadzu YBSK (Nakagyo-ku, Kyoto, Japonya) ile yapılmıştır. Mobil faz olarak A hattında %0,1'lik formik asit çözeltisi ve B hattında %0,1 formik asit içeren metanol çözeltisi kullanılmıştır. Analizler Thermo (MA, ABD) Accucore C18 (2,6 µm, 50 x 2,1 mm) analitik kolon ile gerçekleştirilmiştir. 23 kişiden 200 mg/gün veya 400 mg/gün LCM tedavisi alan 45 rastgele serum numunesi, LCM için 2,2–19,8 µg/ml ve ODL için 2,5 µg/ml'ye kadar konsantrasyonlar göstermiştir. (Payto, D)

2.6. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK), biyolojik numunelerdeki kompleks karışımlarda hedef molekülleri belirli bir seviyeye kadar ayırmak için kullanılan en gelişmiş sıvı kromatografisi yöntemlerinden biridir (Sabourian vd., 2020). İlaç analizinde sıkça kullanılan YBSK, özellikle ters fazlı sıvı kromatografisi, ilaç endüstrisinde uzun zamandır kullanılan bir teknik olmuştur. (Galea vd., 2015) Ters faz YBSK, biyolojik sıvılardaki ilaç maddelerinin ayrılması için yüksek seçicilik ve hassasiyet sağlar. YBSK'nın ilaç geliştirme ve analizinde önemli bir rol oynamasının sebebi yüksek

seçiciliğe, hassaslığa ve analitik duyarlılığa sahip olmasındır. Bu nedenle YBSK ilaç maddelerinin analizinde kullanılan en uygun yöntemlerden biridir (Sabourian vd., 2020). YBSK, diğer analitik yöntemlere göre (rn. ince tabaka kromatografisi gibi) daha kısa analiz sürelerine sahip olması, daha yüksek çözünürlük ve daha yüksek hassasiyete sahip olması açısından karmaşıık bileşenleri ayırmak için güçlü bir araçtır (Galea vd., 2015).

2.7. Detektörler

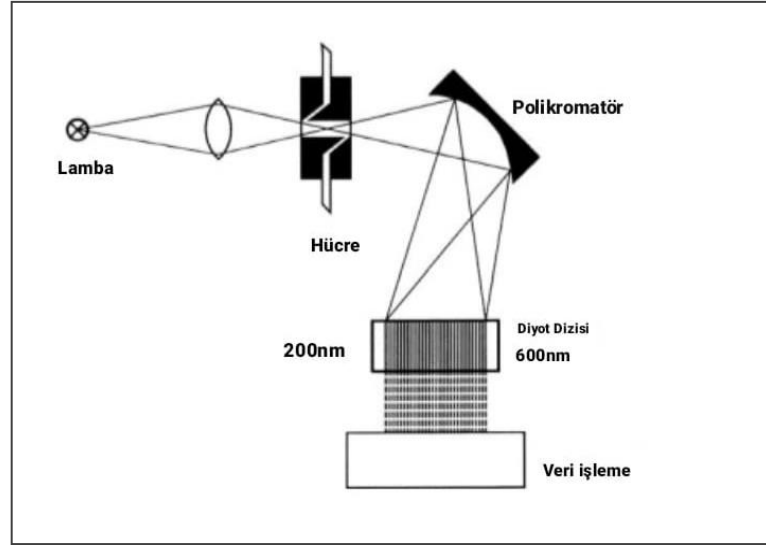
Dedektör, kolondan hareketli faz ile sürünerek ayrılan bileşikleri tanımlamak için sinyalleri elektronik olarak pik görüntülerine eviren, nicel ve nitel analizin yapılmasına yarayan YBSK kompartımanlarıdır (Veronika R. Meyer, 2010).

İdeal olarak dedektörler şunları sağlamalıdır:

- Tüm ayrılmış piklerine eşit derecede hassas olmalı veya yalnızca ilgili pikleri kaydetmelidir;
- Sıcaklık veya mobil faz bileşimindeki değişikliklerden etkilenmemelidir (rn. gradyan elsyonda);
- Az sayıda bileşiğin izlenmesi,
- Bant genişlemesine katkıda bulunmamalı, bu nedenle hücre boyutu kk olmalıdır;
- Doğru pik tepe noktasını hızlı bir şekilde yakalamak için hızlı tepki vermelidir;
- Kullanımı kolay, sağlam ve ucuz olmalıdır (Veronika R. Meyer, 2010).

2.7.1. Diyot Dizisi Dedektörü (DAD)

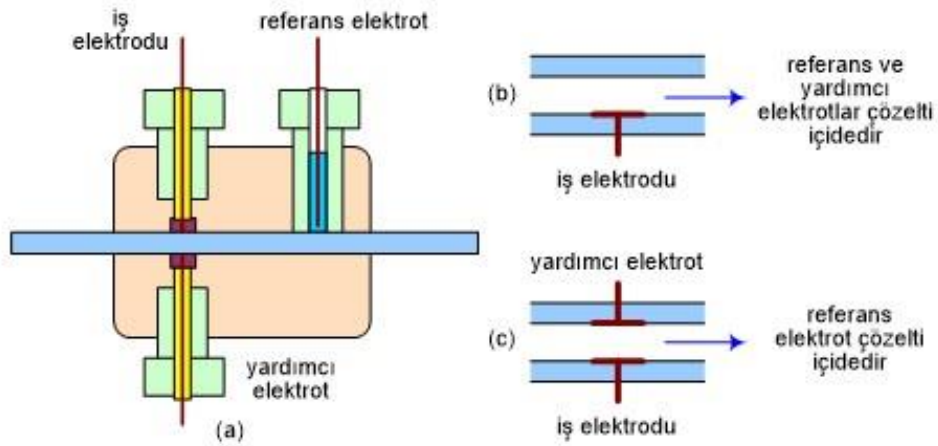
Diyot Dizi Dedektörleri geleneksel Ultraviyole (UV) dedektörleriyle karşılaştırıldığında, ters optiklerle oluşturulmuştur. Tam ışık önce bir detektör hücresinden geçer ve daha sonra bir polikromatrde (ızgara) spektral olarak ayrılır. Spektral ışık daha sonra yan yana düzenlenmiş çok sayıda (100-1000) ışığa duyarlı diyot içeren bir ip olan diyot dizisine ulaşır. Her diyot, veri işleme için elektronik devreler tarafından okunan bilgilerin yalnızca iyi tanımlanmış bir bölümünü yakalar (Veronika R. Meyer, 2010). Diyot Dizi dedektör çalışma prensibi **şekil 2.2**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Diyot dizisi detektörünün çalışma prensibi (Veronika R. Meyer, 2010)

2.7.2. Elektrokimyasal dedektör (ED)

Analitik kimya ve biyokimyanın birçok alanında elektroaktif analitlerin doğru tespiti ve ölçümü için bir elektrokimyasal detektör (ED) kullanılır. UV veya floresan detektörlerinden farklı olarak ED, analitin fiziksel bir özelliğini değil, indirgenme ve yükseltgenme kimyasal reaksiyon göstergesi olarak düşünülmelidir. Bununla birlikte ED, analiti kimyasal olarak değiştirmek için genellikle hiçbir reaktif (elektronlar hariç) veya reaksiyon ekipmanı gerektirmemesi nedeniyle YBSK'da kullanılan diğer dedektörlerden farklıdır (Flanagan R.J vd., 1981).



Şekil 2.3. Elektrokimyasal detektörünün çalışma prensibi (http-1)

3. KULLANILAN CİHAZ ve KİMYASALLAR

3.1. Kullanılan Kimyasal

Lakozamid Standart madde	: Cerilliant, L-029, Germany
Lakozamid İçeren Tablet	: Lamide 50 mg (Ali Raif İlaç Sanayi)
Asetonitril	: Sigma-Aldrich marka ($\geq$ %99,9; gradiyent saflıkta)
Metanol	: Sigma-Aldrich marka ($\geq$ %99,9; gradiyent saflıkta)
HCl	: Merck, Almanya
H ₂ O ₂	: Merck, Almanya
KH ₂ PO ₄	: Merck, Almanya
Kafein	: Sigma Aldrich, Almanya
Su	: Sigma Aldrich, Almanya

3.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

YBSK	: Agilent 1290 Infinity binary, Almanya
EKD	: Esainc, Newyork, USA
Kolon	: Agilent Zorbax Eclipse C18 (3.0mm x 150 mm)
Buzdolabı	: Arçelik, No Frost & Electronic, Türkiye
Hassas Terazı	: Mettler Toledo, XP205, İsviçre
Ultrasonik Banyo	: Millipore Ultrapure Water System, Fransa
pH metre	: Mettler Toledo,
Ultra saf su cihazı	: Millipore Ultrapure Water System, Fransa
Vorteks Karıştırıcı	: Jeio Tech, VM 96 B, KORE
Pipet	: Eppendorf AG, Almanya
Su Banyosu	: Memmert, WNB 14, Almanya

4. YÖNTEM

4.1. Standart Stok Çözeltilerin ve İç Standardın Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan amber ampül içerisinde -20 °C’de saklanan 1 mg/mL derişimdeki standart stok LKZ çözeltisi, 50 mM KH₂PO₄ tamponu ve MeOH (90:10(h/h)) çözeltisi ile son konsantrasyonu 0.1-0.5-1-5-10-25-50 µg/mL olacak şekilde seyreltilmiştir.

İç standart olarak kafein (CFN) standart maddesi kullanılmıştır. CFN’nin stok çözeltisi 1 mg/mL olacak şekilde 50 mM KH₂PO₄ tamponu ve MeOH (90:10(h/h)) çözeltisi ile hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler bu çözelti ile yapılmış ve analizi yapılacak olan bütün örneklerde 10 µg/mL CFN içerecek şekilde ayarlamalar yapılmıştır.

4.2. Tablet Numune Çözeltilerinin Hazırlanması

50 mg LKZ etkin maddesini içerdği bilinen tablet alınarak tartılmıştır. Tartımı alınan tablet havanda ezilerek toz haline getirilmiştir. Bir tabletin içerisinde bulunan LKZ miktarı göz önünde bulundurularak toz haline getirilmiş numuneden 1mg tartılmış ve 10 mL asetonitril ile çözündürülmüştür. Çözelti 45/25 mm çapına sahip 0.45 µm por çaplı PES (Polietersülfon) membran filtre ile süzölmüştür. Elde edilen çözelti mobil faz çözeltisi ile gerekli seyreltmeleri yapılarak analiz edilmiştir.

4.3. Kromatografik Koşullar ve Çalışma Tamponu

Analitlerin ayrımı Agilent Zorbax Eclipse C18 (3.0mm x 150 mm) kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak A hattında 50 mM KH₂PO₄ ve B hattında ise MeOH kullanılmıştır. Tün validasyon ve analizler izokritik (A:B, 90:10) olarak 1mL/dak akış hızında, 30 °C kolon sıcaklığı, 3µL enjeksiyon hacmi ve 210 nm dalga boyu koşullarında yapılmıştır.

4.4. Yöntemin Validasyonu

Validasyon çalışmaları ICH (Q2(R1), 2005) uygun olarak yapılmıştır. Çalışma boyunca optimum koşullar elde etmek için farklı sıcaklık, enjeksiyon hacmi, kolon ve hareketli fazlar araştırılmıştır. Kesinlik, doğruluk, doğrusallık çalışmaları yapılmış, yöntemin saptama sınırı ve tayin sınırı belirlenmiştir.

4.4.1. Doğrusallık (Linearity)

Doğrusallık için 0,1-0,5-1-5-10-25-50 µg/mL derişimlerindeki LKZ çözeltileri ve son konsantrasyonu 10 µg/mL CFN iç standardından oluşan analitler üç set halinde hazırlanmış ve her konsantrasyon üç gün boyunca üçer tekrarlı analizleri yapılmıştır. LKZ

konsantrasyonu ve her konsantrasyona karşılık gelen pik alanlarının tutklanma zamanına göre oranları yapılarak pik normalizasyonu elde edilmiş ve elde edilen pik normalizasyonlarına karşılık konsantrasyon ile doğrusallık eğrisi çizilmiştir.

4.4.2. Doğruluk (Accuracy)

Yöntemin doğruluğunu göstermek 0,5-10-50 µg/mL derişimlerdeki analitler altı tekrarlı analiz edilmiş ve elde edilen veriler ile % geri kazanım (REC) ve % hata değerleri hesaplanmıştır. Bunun için **Denklem 4.1** kullanılmıştır.

$$\%REC = \frac{[(Bulunan\ Derişim - Eklenen\ Derişim)]}{Eklenen\ Derişim} \times 100 \quad (\text{Denklem 4. 1})$$

4.4.3. Kesinlik (Precision)

Yöntemin kesinliği için 0,5-10-50 µg/mL LKZ derişimi ve 10 µg/mL IS içeren çözeltiler gün içi ve günler arası olmak koşuluyla altışar tekrarlı olarak analizleri yapılmıştır. elde edilen veriler ile % bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplanmıştır. Bunun için **Denklem 4.2** kullanılmıştır.

$$\%BBS = \frac{[(Standart\ Sapma)]}{Ortalama} \times 100 \quad (\text{Denklem 4. 2})$$

4.4.4. Saptama sınırı ve tayin sınırı (Limit of dedektion-Limit of quantification)

Tayin sınırı ve saptama sınırını görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı ve eğimin standart sapmasına göre belirlemek mümkündür Saptama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) sinyal/gürültü oranından yararlanarak hesaplanmıştır. Bunun için **Denklem 4.3** ve **Denklem 4.4** kullanılmıştır.

$$LOD = 3.3 \times \left(\frac{Sinyal}{Gürültü} \right) \quad (\text{Denklem 4. 3})$$

$$LOQ = 10 \times \left(\frac{Sinyal}{Gürültü} \right) \quad (\text{Denklem 4. 4})$$

4.5. Bozunma Ürünü Tayini

Bozunma ürünü tayini için LKZ içeren tablet farklı koşullar altında bozunmaya zorlanmıştır. Bozunma koşulları olarak asidik ortama, bazik ortama, H₂O₂, sıcaklığa ve ışığa maruz bırakılan LKZ farklı zamanlarda analiz edilerek bozunma ürünleri taranmıştır.

4.5.1. Asidik bozunma

Son konsantrasyonları 0,5 N HCl ve 25 µg/mL LKZ içerecek şekilde hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 1,5 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra örnek ve LKZ içermeyen 0,5 N HCL çözeltisinin analizleri yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Örnek analizleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

4.5.2. Bazik bozunma

Son konsantrasyonları 0,5 N NaOH ve 25 µg/mL LKZ içerecek şekilde hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 1,5 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra örnek ve LKZ içermeyen 0,5 N NaOH çözeltisinin analizleri yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Örnek analizleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

4.5.3. H₂O₂ bozunma

Son konsantrasyonları %10 H₂O₂ ve 25 µg/mL LKZ içerecek şekilde hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 1,5 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra örnek ve LKZ içermeyen %10 H₂O₂ çözeltisinin analizleri yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Örnek analizleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

4.5.4. Sıcaklık ile bozunma

Son konsantrasyonu 25 µg/mL LKZ içerecek şekilde hazırlanan çözelti 60 °C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Daha sonra örnek analizleri yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Örnek analizleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

4.5.5. Işık ile bozunma

Son konsantrasyonu 25 µg/mL LKZ içerecek şekilde hazırlanan çözelti oda sıcaklığında ışığa maruz bırakılmıştır. Daha sonra örnek analizleri yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Örnek analizleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. Yöntem Optimizasyonu

Optimizasyon çalışmaları sırasında 5 µg/ml LKZ çözeltisi kullanılmıştır. Gerekli seyreltmeler ilk başta asetonitril ile yapılmıştır.

Çalışmada ilk olarak Agilent Zorbax Eclipse C18 (3 x 15 mm, 5µm) kolonu kullanılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarında maddenin, teorik tabaka sayısının düşük olması nedeniyle kolon değiştirilmiş ve Agilent Zorbax C18 (3,5 x 10 mm, 3 µm) kolonu ile analizlere devam edilmiştir. Agilent Zorbax Eclipse C 18 kolonunda 30 °C kolon sıcaklığında teorik tabaka sayısı 9587,30 iken, Agilent Zorbax C18 kolonunda bu değer 18024,67 olarak hesaplanmıştır.

Yapılan literatür taramasına baz alınarak LKZ analizinde tampon çözelti içeren hareketli faz denenmiştir. KH_2PO_4 - metanolden oluşan hareketli faz ile çalışmaya başlanılmıştır. Tampon derişimi ilk olarak 20mM olacak şekilde hazırlanmış, fakat teorik tabaka sayısı ve pik simetrisinin analitik parametrelere göre istenilen düzeyde olmaması sebebiyle daha yüksek derişimli olan 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılmıştır. Aynı zamanda pH=3 pH=4,5 ve pH=7.5 olacak şekil tampon çözelti hazırlanarak bu pH değerlerinde de analiz yapılmış ve pH=4,5 değeri diğer pH'lara göre LKZ için daha uygun olduğuna karar verilmiştir. KH_2PO_4 : MeOH oranı (70:30 h/h), (80:20 h/h), (85:15 h/h) ve (90:10 h/h) oranlarında analizler yapılmıştı ve bu şartlarda pik morfolojisi ve maddenin alıkonma zamanı gözlemlenmiştir. Pik morfolojisinde gözle görülür bir değişiklik olmasada, oranlar arttıkça maddenin alıkonma zamanı artmıştır. O sebeple optimum oran olarak (90:10 h/h) oranı seçilmiştir. Tüm çalışma boyunca, 3µl enjeksiyon hacmi kullanılmış ve optimum sonuçlar elde edilmiştir.

Kolon sıcaklığını belirlemek için 25, 30 ve 35°C'de analizler gerçekleştirilmiştir. 25 °C yapılan analizlerde pik morfolojisi uygun olmadığı ve teorik tabaka sayısının diğer sıcaklıklara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Fakat 30 °C ve 35 °C'de değerlerin birbirine görece yakın olması nedeniyle kolon sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanmıştır. Sıcaklık ve teorik tabaka sayısına ait verileri içeren veriler **Çizelge 5.1**'de gösterilmiştir. Analiz için optimum koşullar ise **Çizelge 5.2**'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1: Sıcaklık etki tablosu

Mobil Faz Oranı (A : B)	Sıcaklık	Teorik tabaka sayısı
90:10 (h/h)	25 °C	16534,12
90:10 (h/h)	30 °C	18024,67
90:10 (h/h)	35 °C	18612,38

Çizelge 5.2: Optimum çalışma koşulları

Parametre	Durum
Akış Hızı	1 mL/dk
Dalga boyu	210 nm
Enjeksiyon Hacmi	3 µL
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Kolon	Agilent Zorbax Eclipse C18 (3,0 mm x 150 mm; 3 µm)
Mobil Faz A Hattı	50 mM KH ₂ PO ₄
Mobil Faz B Hattı	MeOH

Yöntem için iç standart seçmek amacıyla, ketoprofen, ibuprofen, nikotin, olanzapin kafein standart maddeleri sırasıyla denenmiştir. Optimize edilmiş deney koşullarında en uygun rezolüsyon, kapasite faktörü ve simetri kafein standardında gözlenmiş, alıkonma zamanının da uygun olması nedeniyle kafein (CFN) iç standart olarak seçilmiştir. Optimum koşullarda yapılan analizlerin sistem uygunluk testi sonuçları Çizelge 5.3’de görülmektedir. LKZ ve CFN standart maddelerini içeren bir çözeltinin optimum koşullarda yapılan analizinden elde edilen kromatogram ise Şekil 5.1’de görülmektedir.

Çizelge 5.3: Optimum koşullarda gözlenen sistem uygunluk testi sonuçları

Parametre (n=6, 10 µg/mL)	Gözlenen Değer	Beklenen Değre
Alıkonma zamanı	6,107 dk	-
Kapasite Faktörü (k')	5,7	2-10
Kuyruklanma Faktörü (T)		≤ 2
Rezolüsyon (Rs)	8,76	>2
Teorik Tabaka Sayısı (N)	18226	>2000

5.2. Yöntem Validasyonu

Validasyon parametreleri hesaplanırken, pik normalizasyonu hesaplanarak analiz sonuçları değerlendirilmiştir. Pik normalizasyonu için Denklem 5.1 kullanılmıştır. Hesaplamalar Microsoft Excel programı kullanılarak yapılmış ve yöntem Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) yönergelerinde belirtilen sınırlar çerçevesine göre uygunluğu test edilmiştir.

5.2.1. Doğrusallık

Doğrusallık grafiği için LKZ'nin 0,1-0,5-1-5-10-25-50 µg/mL derişimlerdeki ve herbir konsantrasyonda da 10 µg/mL CFN iç standardı içeren 7 farklı konsantrasyon çözeltisi üç set halinde hazırlanmıştır. Her set üç farklı günde analiz edilmiştir. Elde edilen verilere göre doğrusallık grafiği çizilmiş ancak düşük derişimdeki konsantrasyonları doğrusallık eğrisinden sapması sebebiyle ağırlıksız regresyon hesaplamaları yerine 1/x ağırlıklı regresyon yöntemine göre doğrusallık grafiği çizilmiştir. Doğrusallık verilerine göre elde edilen sonuçlar Çizelge 5.4'te gösterilmektedir.

Çizelge 5.4: Doğrusallık analizi sonuçları

Parametre (0.1- 50 µg/ml)	Gün içi			Günler arası
	1.gün n=7	2.gün n=7	3.gün n=7	Tüm günler n=21
Eğim ± standart sapma	0,30613±0,000597462	0,29725±0,000581094	0,315358±0,000597462	0,30664 ±3,42737E-17
Kesim ± standart sapma	-0,003088213±0,01344325	0,00190±0,013441785	- 0,003691196±0,008872342	-0,002882039 ± 7,69877E-16
R ²	0,999	0,999	0,999	1,000
LOD(µg/mL)				0,0622 µg/mL
LOQ (ppb)				0,1866 µg/mL
%95 Güven aralığı	-	-	-	-

5.2.2. Doğruluk

Yöntemin doğruluğunu bulmak için 0,5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL derişimlerde altı tekrarlı 3 setin analiz verileri ile yapılan hesaplamalar sonucunda %99-102 arasında değişkenlik gösteren % geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Çizelge 5.4'te gösterilmiş olan % geri kazanım ve % hata değerleri yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

Çizelge 5.5: Doğruluk analizi sonuçları

Parametre µg/ml)	0,5 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL
Bulunan LKZ derişimi (ortalama ± standart sapma) (µg/ml)	0,518±1.,187	9,98±1,136	50,968±2,008
% BSS	1,117	1,136	1,969
% Geri Kazanım	100,830	99,977	101,930
%Hata	-0,83	0,023	-1,93

5.2.3. Kesinlik

LKZ içeren 3 farklı derişim (0.5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml) 6 tekrarlı 3 set halinde hazırlanmıştır ve her set 3 farklı günde analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bulunan ortalama LKZ derişimi, standart sapma ve % BSS'nin gün içi ve günler arası değerleri Çizelge 5.5, Çizelge 5.6'da ve Çizelge 5.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.6: 0,5 µg/mL için kesinlik analizi sonuçları

Parametre 0,5 µg/mL)	Gün içi			Günler arası
	1.gün	2.gün	3.gün	Tüm günler
	n=6	n=6	n=6	n=16
Bulunan LKZ derişimi (ortalama ± standart sapma) (µg/mL)	0,5153± 0,0088	0,5215±0,0076	0,5138± 0,0099	0,5169± 0,0009
% BSS	1,716	1,4545	1,9226	0,1313
% Geri Kazanım	103,059	104,306	102,750	103,372
% Hata	-3,059	-4,306	-2,570	-3,372

Çizelge 5.7: 10 µg/mL için kesinlik analizi sonuçları

Parametre 10 µg/mL)	Gün içi			Günler arası
	1.gün	2.gün	3.gün	Tüm günler
	n=6	n=6	n=6	n=16
Bulunan LKZ derişimi (ortalama ± standart sapma) (µg/ml)	10,0101± 0,0734	10,073 ± 0,1923	9,9363 ± 0,1182	9,9845± 0,0488
% BSS	0,733	1,9213	1,2315	0,4485
% Geri Kazanım	100,101	100,073	99,363	99,845
% Hata	-0.101	-0.073	0.637	0.155

Çizelge 5.8: 50 µg/mL için kesinlik analizi sonuçları

Parametre 50 µg/mL)	Gün içi			Günler arası
	1.gün	2.gün	3.gün	Tüm günler
	n=6	n=6	n=6	n=16
Bulunan LKZ derişimi (ortalama ± standart sapma) (µg/ml)	50,4518 ± 0,9712	50,4453 ± 0,7904	50,5501 ± 0,8772	50,4824 ± 0,0738
% BSS	1,9251	1,5669	1,7354	0,1462
% Geri Kazanım	102,670	100,897	101,100	101,554
% Hata	-2.67	-0.891	-1,100	-1.554

5.3. Bozunma ürünü tayini

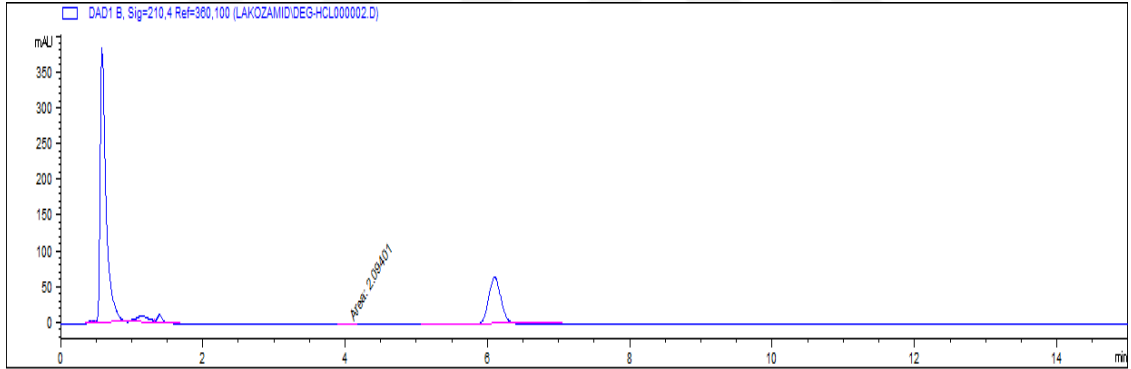
LKZ çözeltilerinin asit, baz ve %10'lük H₂O₂ çözeltileri ile muamele edilme koşulları **Çizelge 5.8**'te gösterilmiştir. Asit, baz ve %10'luk H₂O₂ çözeltileri ile muamele edilmiş.

Çizelge 5.9: LKZ çözeltisinin bozundurma koşulları

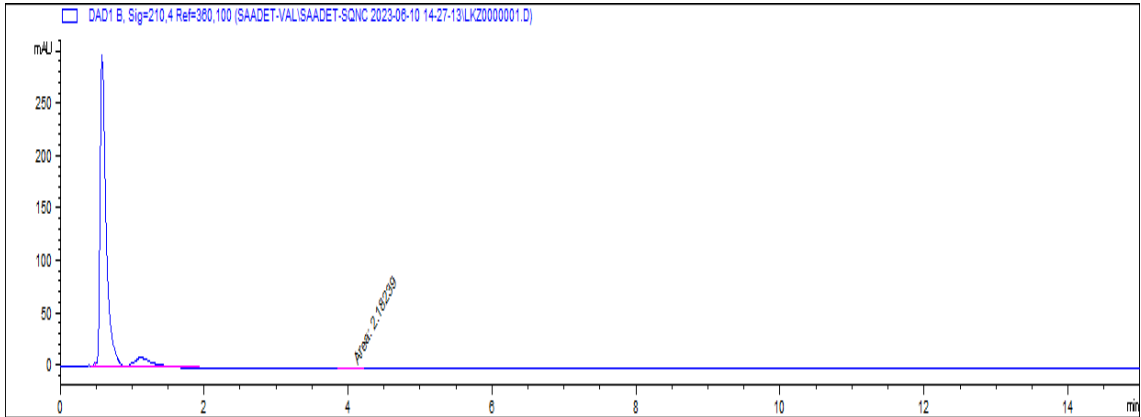
Koşullar	Süre	Sıcaklık
0,5 N HCl		Oda Sıcaklığı
0,5 N NaOH		Oda Sıcaklığı
%10'luk H ₂ O ₂	90 dakika – 24 saat – 48 saat	Oda Sıcaklığı
Sıcaklık		60 °C
Işık		Gün Işığı

5.3.1. Asidik bozunma

Son konsantrasyonları 0,5 N HCl ve 25 µg/mL LKZ içerecek şekilde hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 1,5 saat boyunca bekletilmesi sonucunda %22 oranında bozunma gözlemlenmiştir. Daha sonra örnek kromatogramı LKZ içermeyen 0,5 N HCL çözeltisinin Kromatogramı ile karşılaştırılmıştır. Kromatogram şekil 5.4 ve şekil 5.5’de gösterilmiştir.



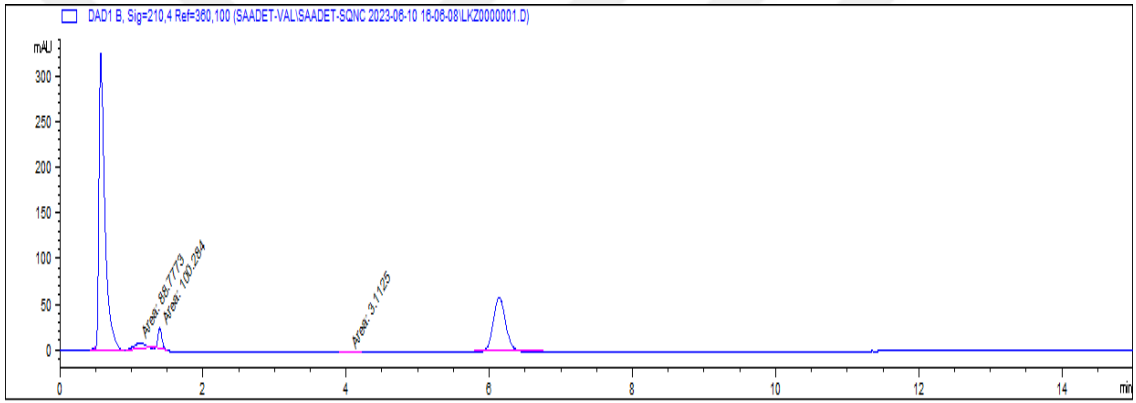
Şekil 5.1 1.5saat boyunca oda sıcaklığında 0.5 N HCl bekletilen LKZ kromatogramı



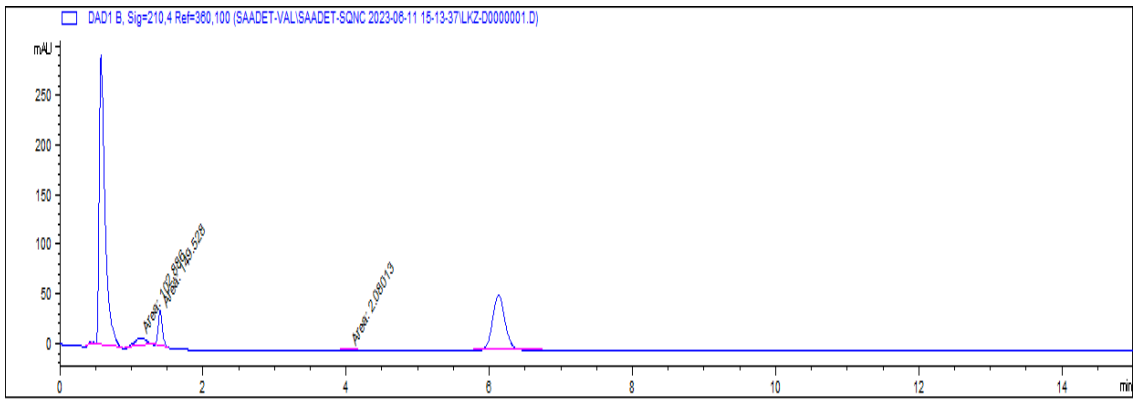
Şekil 5.2 LKZ içermeyen 0,5 N HCL çözeltisinin kromatogramı

Pik alanlarının çok küçük olması sebebiyle kromatogram görüntüsünde gözle görüle bilecek pikler gözükmemiştir. Fakat farklı alıkonma zamanlarında pik alanları çok küçük olan pikler (zoom yapılarak) gözlemlenmiştir. Bozunma ürünleri 6.1 alıkonma zamanına sahip LKZ maddesi ile girişim yapmamaktadır.

25 µg/mL LKZ çözeltisinin oda sıcaklığında 24s ve 48s 0,5 N HCL maruz bırakılma süresi arttıkça bozunma oranı da artmıştır. Fakat kromatogramda yine bozunma ürün alanlarının çok küçük olması sebebiyle gözle görülür bir pik görülmemiştir. LKZ maddesinin alanın da azaldığı gözlemlenmiştir. 24 s ve 48s oda sıcaklığında 0,5 N HCL maruz bırakılan 25 µg/mL LKZ çözeltisinin kromatogramları şekil 5.6 ve şekil 5.7 de gösterilmiştir.



Şekil 5.3 24s saat boyunca oda sıcaklığında 0.5 N HCl bekletilen LKZ kromatogramı

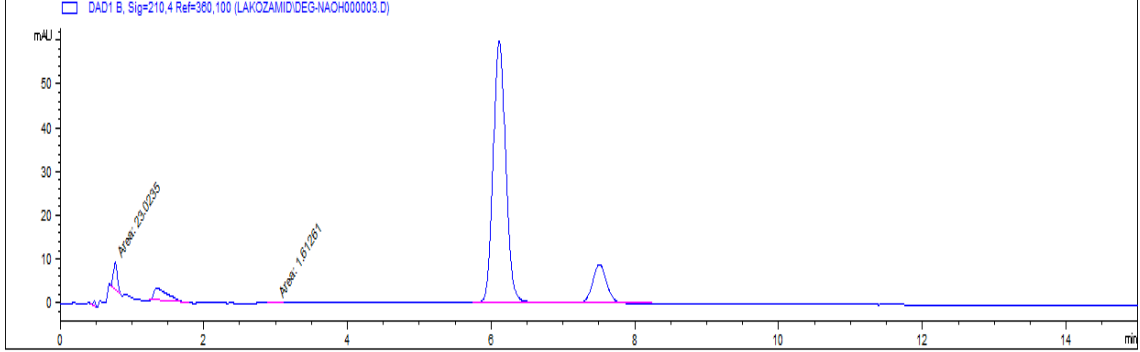


Şekil 5.4 48s 60°C'de oda sıcaklığında asitle muamele edilen LKZ kromatogramı

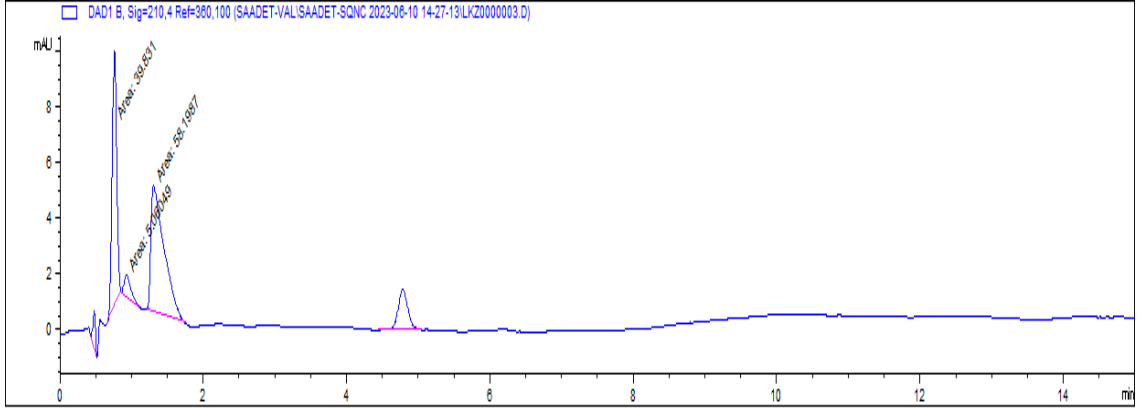
5.3.2. Bazik bozunma

Son konsantrasyonları 0,5 N NaOH ve 25 µg/mL LKZ içerecek şekilde hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 1,5 saat boyunca bekletilmesi sonucunda %30'a varan bozunma

olmuştur.. Daha sonra örnek kromatogramı LKZ içermeyen 0,5 N NaOH çözeltisinin Kromatogramı ile karşılaştırılmıştır. Kromatogram şekil 5.8 ve şekil 5.9’de gösterilmiştir.

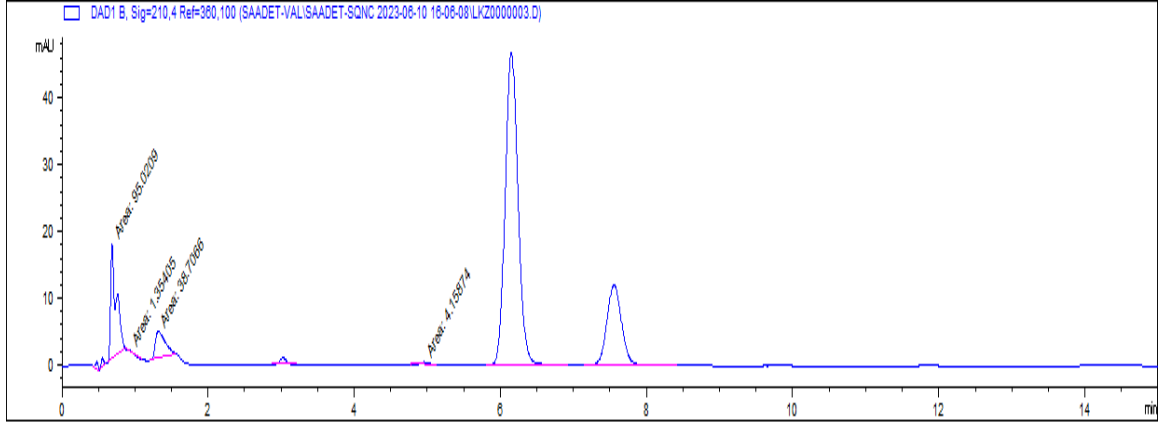


Şekil 5.5 1.5 saat boyunca oda sıcaklığında 0.5 N NaOH bekletilen LKZ kromatogramı

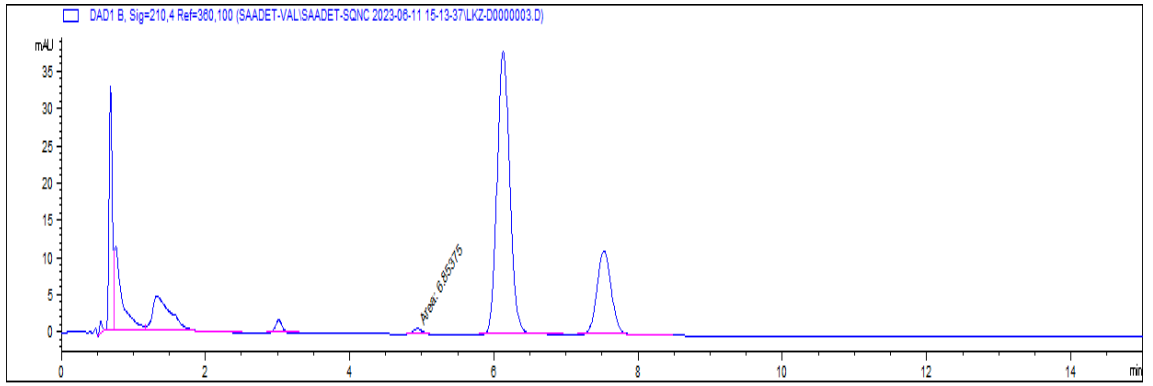


Şekil 5.6 LKZ içermeyen 0,5 N NaOH çözeltisinin kromatogramı

25 µg/mL LKZ çözeltisinin oda sıcaklığında 24s ve 48s 0,5 N NaOH maruz bırakılma süresi arttıkça bozunma oranı da artmıştır. 0,5 N HCl ve 25 µg/mL LKZ içerecek şekilde hazırlanan çözeltiden farklı olarak, 0.5 N NaOH ile bozunmaya maruz bırakılan 25 µg/mL LKZ çözeltisinin kromatogramında gözle görüle bilecek pikler gözlemlenmiştir. Bozunma ürünleri 6.1 alıkonma zamanına sahip LKZ çözeltisi ile girişimde bulunmamıştır. 24 s ve 48s oda sıcaklığında 0,5 N NaOH maruz bırakılan 25 µg/mL LKZ çözeltisinin kromatogramları şekil 5.10 ve şekil 5.11 de gösterilmiştir.



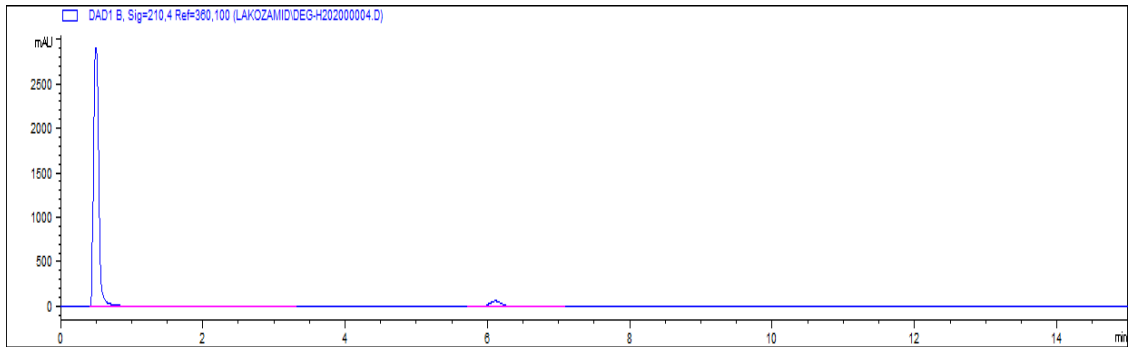
Şekil 5.7 24 saat boyunca oda sıcaklığında 0.5 N NaOH bekletilen LKZ kromatogramı



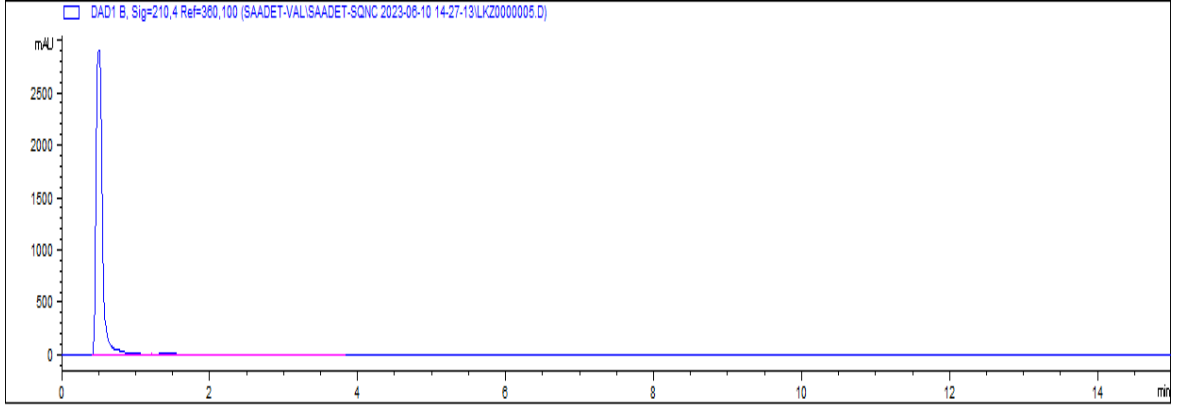
Şekil 5.8 48 saat boyunca oda sıcaklığında 0.5 N NaOH bekletilen LKZ kromatogramı

5.3.3. H₂O₂ bozunma

Son konsantrasyonları %10 H₂O₂ ve 25 µg/mL LKZ içerecek şekilde hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 1,5 saat boyunca bekletilmesi sonucunda %22'e varan bozunma oluşmuştur. Daha sonra örnek kromatogramı LKZ içermeyen %10 H₂O₂ çözeltisinin Kromatogramı ile karşılaştırılmıştır. Kromatogram şekil 5.12 ve şekil 5.13'de gösterilmiştir.

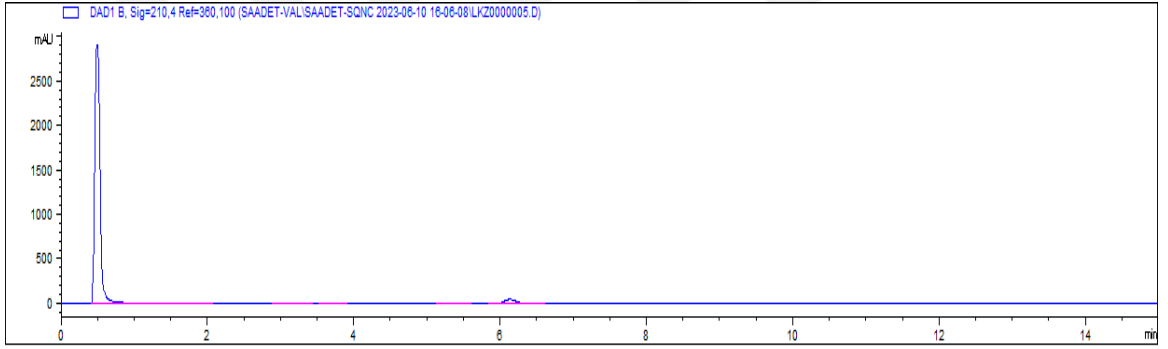


Şekil 5.9 1.5 saat boyunca oda sıcaklığında %10 H₂O₂ bekletilen LKZ kromatogramı

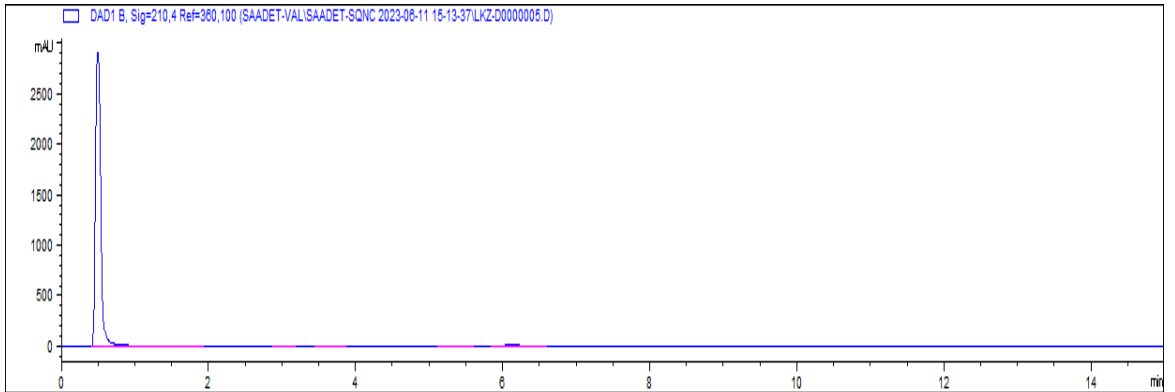


Şekil 5.10 LKZ içermeyen %10 H₂O₂ çözeltisinin kromatogramı

24 s ve 48s oda sıcaklığında %10 H₂O₂ maruz bırakılan 25 µg/mL LKZ çözeltisinin kromatogramları şekil 5.14 ve şekil 5.15 de gösterilmiştir.

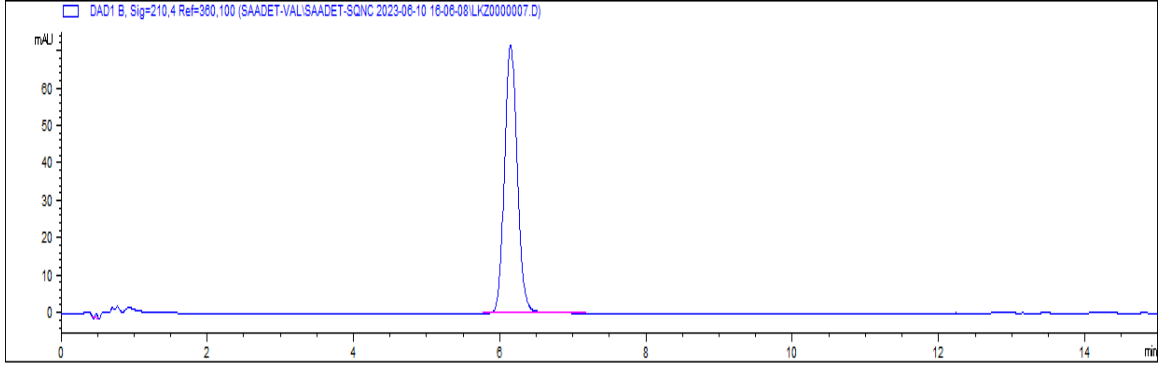


Şekil 5.11 24 saat boyunca oda sıcaklığında %10 H₂O₂ bekletilen LKZ kromatogramı



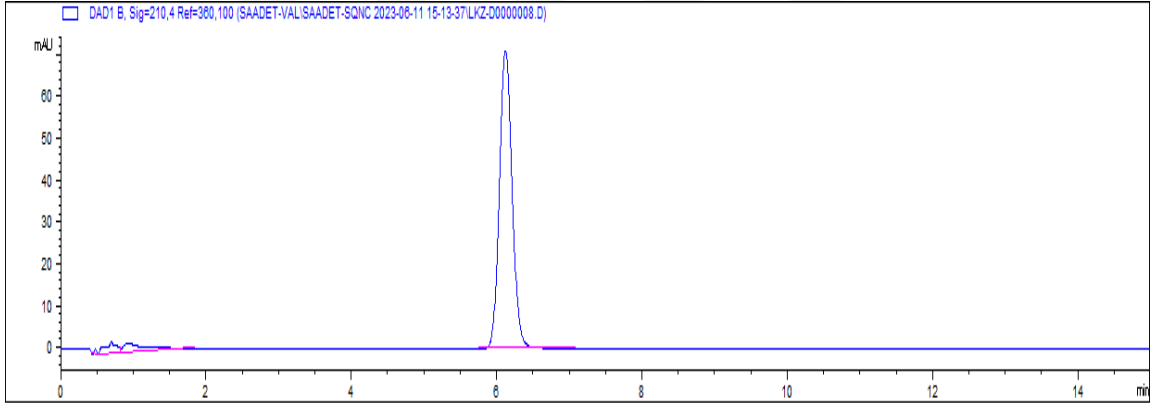
Şekil 5.12 48 saat boyunca oda sıcaklığında %10 H₂O₂ bekletilen LKZ kromatogramı

25 µg/mL LKZ içerecek şekilde hazırlanan çözelti 1.5 saat boyunca su banyosunda 60 °C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Bozunma kromatogramı şekil 5.15de gösterilmiştir.



Şekil 5.13 1.5saat boyunca su banyosunda **60 °C** 'de bekletilen LKZ kromatogramı

LKZ'nin 1,5 saat boyunca su banyosunda 60 °C 'de bekletilmesi sonucunda %16'a varan bozunma oluşmuştur. 25 µg/mL LKZ içerecek şekilde hazırlanan çözelti 48 saat boyunca ışıktaki bırakılmıştır. Bozunma kromatogramı şekil 5.17de gösterilmiştir. LKZ'nin 24 saat boyunca ışık'ta bekletilmesi sonucunda %17'e varan bozunma oluşmuştur.



Şekil 5.14 : LKZ'nin 24 saat boyunca ışık'ta bekletilmesi sonucunda LKZ kromatogramı

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada antiepileptik ilaç olan ve epilepsi tedavisinde kullanılan Lakozamid'in tayini için basit, hızlı, hassas YBSK yöntemi geliştirilmiş ve geliştirilen yöntem ICH'e göre doğrusalılık, kesinlik, doğruluk parametreleri açısından valide edilmiştir. Yöntem 0.1-50 µg/ml derişim aralığında doğrusal bulunmuş, saptama sınırı a µg/ml, tayin sınırı ise b µg/ml olarak hesaplanmıştır. Analiz çapı 3.5µm olan Agilent Zorbax Eclipse C18 kolonunda yapılmıştır. Yapılan analizlerde en iyi deney sonuçları derişimi 50mM ve pH'ı 4,65 olan K2PO4 tamponu ile 210 nm dalga boyunda elde edilmiştir.

Literatürde LKZ'in tayini ile alakalı geliştirilmiş bazı yöntemler vardır. Bu yöntemler arasında YBSK yöntemleri (Kestelyn vd., 2011, V.Kalyan Chakravarthy and D.Gowri Sankar, 2011 Gonçalves vd., 2018) YBSK-KS/KS yöntemi bulunmaktadır. Literatürde herhangi bir YBSK-EKD yöntemine rastlanmamıştır. YBSK-EKD yöntemi ile analizler yapılmış lakin sonuç elde edilememiştir. Kullanılan EKD cihazının potensialleri maddenin redoks tepkimesine yeterli gelmemesi sebebiyle herhangi bir kromatogram elde edilmemiştir

KAYNAKÇA

- Aykaç, K. 2020. "*Epilepsi Tedavisinde Kullanılmak Üzere Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyonu Çalışmaları*". Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Banerjee, P. N., Filippi, D., Allen Hauser, W. 2009. "The descriptive epidemiology of epilepsy-A review". *Epilepsy Research*, 85(1), 31–45.
- Beghi, E. 2020. "The Epidemiology of Epilepsy". *Neuroepidemiology*, 54(2), 185–191.
- Beyreuther, B. K., Freitag, J., Heers, C., Krebsfänger, N., Scharfenecker, U., Stöhr, T. 2007. "Lacosamide: A review of preclinical properties". *CNS Drug Reviews*, 13(1), 21–42.
- Bonan, S., Fedrizzi, G., Menotta, S., Elisabetta, C. 2013. "Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector". *Dyes and Pigments*, 99(1), 36–40.
- Bramley, P. M. 1992. "Analysis of carotenoids by high performance liquid chromatography and diode-array detection". *Phytochemical Analysis*, 3(3), 97–104.
- Cawello, W. 2015. "Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Lacosamide". *Clinical Pharmacokinetics*, 54(9), 901–914.
- Cawello, W., Stockis, A., Andreas, J. O., Dimova, S. 2014. "Advances in epilepsy treatment: Lacosamide pharmacokinetic profile". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1329(1), 18–32.
- Chen, G., Chen, X. 2007. "Measurement of bioactive constituents in traditional Chinese medicines by CE with electrochemical detection". *Natural Products: Essential Resources for Human Survival*.
- Chistyakov, D., Sergeev, G. 2020. "The polymorphism of drugs: New approaches to the synthesis of nanostructured polymorphs". *Pharmaceutics*, 12(1), 1–9

- Da Silva, J. D., Cabral, L. M., de Sousa, V. P. 2022. "Stability Indicating Methods for Determination of Third Generation Antiepileptic Drugs and Their Related Substances". *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52(7), 1524–1536.
- Flanagan R.J, Perret, D., Whetpton R. 1981. "*Electrochemical Detection in HPLC. Analysis of Drugs and Poisons*". *Journal of Chemical Information and Modeling* (C. 53).
- Galea, C., Mangelings, D., Vander Heyden, Y. 2015. "Characterization and classification of stationary phases in HPLC and SFC - a review". *Analytica Chimica Acta*, 886, 1–15.
- Gibson, A. P., Patel, N. C. 2006. "Mechanisms of action of antiepileptic drugs". *Antiepileptic Drugs to Treat Psychiatric Disorders, Current Medicinal Chemistry*, 13,2467–2485.
- Giusti, F., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Vittori, S., Sagratini, G. 2017. "Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour". *Food Chemistry*, 221, 689–697.
- Gonçalves, J., Alves, G., Bicker, J., Falcão, A., 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(8), 541–557.
- Grybinik, S., Bosakova, Z. 2021. "An overview of chiral separations of pharmaceutically active substances by HPLC (2018–2020)". *Monatshefte fur Chemie*, 152(9), 1033–1043.
- He, X. G. 2000. "On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques". *Journal of Chromatography A*, 880(1–2), 203–232.

- Hensley, K., Williamson, K. S., Maidt, M. L., Gabbita, S. P., Grammas, P., Floyd, R. A. 1999. "Determination of biological oxidative stress using high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD)". *HRC Journal of High Resolution Chromatography*, 22(8), 429–437.
- 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.
- Jacob, S., Nair, A. B. 2016. "An Updated Overview on Therapeutic Drug Monitoring of Recent Antiepileptic Drugs". *Drugs in R and D*, 16(4), 303–316.
- Jalakam, S. P., Tambe, V. S., Deodhar, M. N., Prakya, V., Waghmode, J., Pawar, P. 2020. "Direct Chiral HPLC-MS/MS Method for Determination of R-Lacosamide in Human Plasma". *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 54(1), 90–97.
- Kotani, A., Kusu, F., Takamura, K. 2002. "New electrochemical detection method in high-performance liquid chromatography for determining free fatty acids". *Analytica Chimica Acta*, 465(1–2), 199–206.
- Lämmerhofer, M. 2010. "Chiral recognition byby enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases". *Journal of Chromatography A*, 1217(6), 814–856.
- Macleod, S., Appleton, R. E. 2007. "The new antiepileptic drugs". *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 92(6), 605–614.
- Madonini, F., Villa, F. 2021. "Single photon avalanche diode arrays for time-resolved raman spectroscopy". *Sensors*, 21(13).
- Marangoz, A. H., Yildirim, M. 2012. "Penisilinle oluşturulan epilepside kolinerjik ve nitreerjik maddelerin diken amplitüdüne etkisi". *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi*, 29(4), 304–310.
- Moshé, S. L., Perucca, E., Ryvlin, P., Tomson, T. 2015. "Epilepsy: New advances". *The Lancet*, 385(9971), 884–898.
- Naylor, D. E., Liu, H., Niquet, J., Wasterlain, C. G. 2013. "Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus". *Neurobiology of Disease*, 54, 225–238.

- Nikolin, B., Imamović, B., Medanhodžić-Vuk, S., Sober, M. 2004. "High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses.". *Bosnian journal of basic medical sciences*, 4(2), 5–9.
- Perucca, E. 2005. "An introduction to antiepileptic drugs". *Epilepsia*, 46(SUPPL. 4), 31–37.
- Perucca, P., Gilliam, F. G. 2012. "Adverse effects of antiepileptic drugs". *The Lancet Neurology*, 11(9), 792–802.
- Pragst, F., Herzler, M., Erxleben, B. T. 2004. "Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)". *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42(11), 1325–1340.
- Sabença, R., Bicker, J., Silva, R., Carona, A., Silva, A., Santana, I., ... Fortuna, A. 2021. "Development and application of an HPLC-DAD technique for human plasma concentration monitoring of perampanel and lamotrigine in drug-resistant epileptic patients". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1162, 122491.
- Sabourian, R., Mirjalili, S. Z., Namini, N., Chavoshy, F., Hajimahmoodi, M., Safavi, M. 2020. "HPLC methods for quantifying anticancer drugs in human samples: A systematic review". *Analytical Biochemistry*, 610(April), 113891.
- Sankaraneni, R., Lachhwani, D. 2015. "Antiepileptic drugs-a review". *Pediatric Annals*, 44(2), 36–42.
- Skořepová, E., Rohlíček, J., Chatziadi, A., Zvoníček, V., Jiráť, J., Čejka, J., ... Šoóš, M. 2021. "Low-temperature polymorphs of lacosamide". *Journal of Crystal Growth*, 562-568.
- Staley, K. 2015. "Molecular mechanisms of epilepsy". *Nature Neuroscience*, 18(3), 367–372.
- Swartz, M. 2010. "HPLC detectors: A brief review". *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33(9–12), 1130–1150.

- Tauler, R., Barceló, D. 1993. "Multivariate curve resolution applied to liquid chromatography-diode array detection". *Trends in Analytical Chemistry*, 12(8), 319–327
- V.Kalyan Chakravarthy and D.Gowri Sankar. 2011. "HPLC method for determination of Lacosamide S(-)Enantiomer in bulk and pharmaceutical formulation". *Rasayan Journal of Chemistry*, 4(4), 744–752.
- Veronika R. Meyer. 2010. "*Practical High-Performance Liquid Chromatography*".
- Wang, C., Xu, J., Zhou, G., Qu, Q., Yang, G., Hu, X. 2007. "Electrochemical Detection Coupled with High-Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical and Biomedical Analysis: A Mini Review". *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 10(7), 547–554.
- Zwierzyńska, E., Pietrzak, B. 2021. "The antiepileptic drug lacosamide and memory – A preclinical study". *Epilepsy and Behavior*, 13,12-16

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : .Saadat ALLAHYAROVA

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- Lisans: 2021, Bakü Devlet Üniversitesi, Kimya Fakültesi, Kimya Öğretmenliği.
- Lise: 2017, 23 Numaralı Tam Mektebi.