



**RUFİNAMİT, LAMOTRİJİN VE ZONİSAMİTİN KAPİLER ELEKTROFOREZ
YÖNTEMİ İLE MİKTAR TAYİNİ**

Doktora Tezi

Selen Duygu ÇEÇEN

Eskişehir 2024

**RUFİNAMİT, LAMOTRİJİN VE ZONİSAMİTİN KAPİLER ELEKTROFOREZ
YÖNTEMİ İLE MİKTAR TAYİNİ**

Selen Duygu ÇEÇEN

DOKTORA TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül DAL POÇAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Aralık 2024

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2205S054 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Selen Duygu ÇEÇEN'in "Rufinamit, Lamotrijin ve Zonisamitin Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Miktar Tayini" başlıklı tezi 06.12.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Unvanı Adı Soyadı</u>		<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül DAL POÇAN	
Üye :	Prof. Dr. Sena ÇAĞLAR ANDAÇ	
Üye :	Doç. Dr. Erol ŞENER	
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Sema KOYUTÜRK	
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Sakine ATİLA KARACA	

Prof. Dr. Saime ÖNCE

Enstitü Müdürü

ÖZET

RUFİNAMİT, LAMOTRİJİN VE ZONİSAMİTİN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE MİKTAR TAYİNİ

Selen Duygu ÇEÇEN

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Aralık 2024

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül DAL POÇAN

Bu çalışmada, rufinamit (RFN), lamotrijin (LMT) ve zonisamit (ZNS) bileşiklerinin eşzamanlı analizine olanak tanıyan basit, hızlı ve duyarlı bir kapiler elektroforez (KE) yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (YPSK) yöntemi ile karşılaştırılmıştır. KE yönteminde tespit, 210 nm dalga boyunda bir fotodiyot dizisi (DAD) dedektörü ile gerçekleştirilmiş ve 75 µm iç çaplı, 40 cm efektif uzunlukta kapiler kullanılmıştır. Optimum koşullar, %5 izopropil alkol (IPA) içeren 35 mM SDS, 6 mM borat ve 10 mM fosfat tamponu (pH 9,00) ile 15 kV potansiyel uygulanarak sağlanmıştır. Bu koşullarda ZNS, RFN ve LMT'nin göç süreleri sırasıyla 5,99, 6,77 ve 8,46 dakika olarak belirlenmiştir. YPSK yönteminde ise tespit, aynı dedektörle gerçekleştirilmiş; C18 kolon (4,6×100 mm, 3,5 µm) ve hareketli faz olarak %18 asetonitril içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 4,0) kullanılmıştır. Bu yöntemde ZNS, RFN ve LMT'nin alıkonma süreleri sırasıyla 6,41, 7,29 ve 4,95 dakika olarak bulunmuştur. Her iki yöntemin doğrusal aralık, kesinlik, duyarlılık, kararlılık ve sağlamlık gibi validasyon parametreleri incelenmiştir. KE yönteminde ZNS, RFN ve LMT için tespit sınırı (LOD) değerleri sırasıyla $1,63 \times 10^{-7}$ M (0,035 µg/ml), $6,86 \times 10^{-8}$ M (0,016 µg/ml) ve $2,65 \times 10^{-8}$ M (0,007 µg/ml); YPSK yönteminde ise LOD değerleri ZNS için $1,61 \times 10^{-8}$ M (0,003 µg/ml), RFN için $9,69 \times 10^{-9}$ M (0,002 µg/ml) ve LMT için $3,33 \times 10^{-9}$ M (0,001 µg/ml) olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemler, farmasötik dozaj formlarında başarıyla uygulanmış ve USP 47-NF 42'ye uygun bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Rufinamit, Lamotrijin, Zonisamit, Kapiler elektroforez, Miseller Elektrokinetik Kromatografi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ABSTRACT

DETERMINATION of RUFINAMIDE, LAMOTRIGINE, and ZONISAMIDE by CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Selen Duygu ÇEÇEN

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School, December 2024

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Arın Gül DAL POÇAN

In this study, a simple, rapid, and sensitive capillary electrophoresis (CE) method was developed for the simultaneous determination of rufinamide (RFN), lamotrigine (LMT), and zonisamide (ZNS). The method was compared to a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) method. CE analysis was performed using a photodiode array detector (DAD) at 210 nm, employing a capillary with a 75 μm internal diameter and a 40 cm effective length. Optimal separation was achieved by using a background electrolyte consisting of 35 mM SDS, 6 mM borate, 10 mM phosphate buffer (pH 9.00), and 5% isopropyl alcohol (IPA), with an applied potential of 15 kV. Under these conditions, the migration times for ZNS, RFN, and LMT were found to be 5.99, 6.77, and 8.46 minutes, respectively. In the HPLC method, detection was also conducted at 210 nm using a C18 column (4.6 $\times$ 100 mm, 3.5 μm) and a mobile phase of 18% acetonitrile and 50 mM phosphate buffer (pH 4.0) at a flow rate of 1.0 mL/min. The retention times for ZNS, RFN, and LMT were 6.41, 7.29, and 4.95 minutes, respectively. Both methods were validated for parameters such as linearity, precision, sensitivity, stability, and robustness. The limits of detection (LOD) in the CE method for ZNS, RFN, and LMT were 1.63×10^{-7} M (0.035 $\mu\text{g/mL}$), 6.86×10^{-8} M (0.016 $\mu\text{g/mL}$), and 2.65×10^{-8} M (0.007 $\mu\text{g/mL}$), respectively. For HPLC, the LOD values were 1.61×10^{-8} M (0.003 $\mu\text{g/mL}$) for ZNS, 9.69×10^{-9} M (0.002 $\mu\text{g/mL}$) for RFN, and 3.33×10^{-9} M (0.001 $\mu\text{g/mL}$) for LMT. Both methods were successfully applied to pharmaceutical formulations and were compliant with USP 47-NF 42 standards.

Keywords: Rufinamide, Lamotrigine, Zonisamide, Capillary electrophoresis, Micellar electrokinetic chromatography, High-Performance Liquid Chromatography

ÖNSÖZ

Bu çalışmada RFN, LMT ve ZNS'nin KE yöntemi ile miktar tayininin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda KE yönteminin karşılaştırılması için bir YPSK yöntemi geliştirilmiş, her iki yöntem de farmasötik dozaj formlarına uygulanmıştır.

Akademik hayatımın başından itibaren her daim yanımda olan, doktora tezim süresince sabır ve ilgiyle rehberlik eden, desteğini her zaman hissettiğim, bilimsel gelişimime büyük katkılar sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan kıymetli tez hocam Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül DAL POÇAN'a

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda bulunan tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Pınar ATUKEREN ve Temel Eczacılık Bilimleri Bölüm Başkanı Doç. Dr. Engin KAPLAN başta olmak üzere, bu süreçte bana destek ve anlayış gösteren tüm İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Eczacılık Fakültesi ailesine,

Birlikte çalışmaktan onur duyduğum, bilgi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan değerli hocam Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Şükriye Nihan KARUK ELMAS'a,

Bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan sayın hocam Doç. Dr. Fatma Nur ARSLAN'a,

İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Mühendislik Fakültesi Kimya bölümünün değerli hocaları Prof. Dr. Mustafa Reşat APAK, Prof. Dr. Ayşem ARDA ve ekibine,

Hayatımın her anında ve her koşulda yanımda olan, sevgi, sabır ve destekleriyle bana güç veren kıymetli 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 çalışmamın 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 durum saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Selen Duygu ÇEÇEN

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.

Selen Duygu ÇEÇEN

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE ve KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Antiepileptikler.....	3
2.2. RFN'nin Farmakolojik Özellikleri	4
2.3. RFN'nin Farmakokinetik Özellikleri.....	4
2.4. LMT'nin Farmakolojik Özellikleri	5
2.5. LMT'nin Farmakokinetik Özellikleri	5
2.6. ZNS'nin Farmakolojik Özellikleri.....	6
2.7. ZNS'nin Farmakokinetik Özellikleri	6
2.8. Kullanılan Yöntemler	6
2.8.1. KE yöntemi.....	6
2.8.2. MEKK yöntemi.....	9
2.8.3. YPSK yöntemi.....	10
2.9. RFN'nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	11
2.10. LMT'nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	12
2.11. ZNS'nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	13
2.12. RFN, LMT ve ZNS'nin Miktar Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar	13
3. GEREÇLER.....	14

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	14
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	14
4. YÖNTEMLER	16
4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı.....	16
4.2. KE Yöntemi	16
4.2.1. Cihazla ilgili koşullar	16
4.2.2. Çalışma tamponu.....	17
4.2.3. Optimizasyon çalışmaları	17
4.2.3.1. <i>Tampon bileşimi ve derişimi</i>	17
4.2.3.2. <i>pH</i>	18
4.2.3.3. <i>Organik çözücü oranı</i>	18
4.2.3.4. <i>Potansiyel</i>	18
4.2.4. Validasyon çalışmaları	18
4.2.4.1. <i>Doğrusallık</i>	19
4.2.4.2. <i>Kesinlik</i>	19
4.2.4.3. <i>Doğruluk</i>	19
4.2.4.4. <i>Duyarlılık</i>	20
4.2.4.5. <i>Kararlılık</i>	20
4.2.4.6. <i>Sağlamlık</i>	20
4.2.4.7. <i>Spesifiklik</i>	20
4.3. YPSK Yöntemi	20
4.3.1. Cihaz ile ilgili koşullar.....	20
4.3.2. Hareketli fazın hazırlanışı	21
4.3.3. Optimizasyon çalışmaları	21
4.3.3.1. <i>Dalga boyu</i>	21
4.3.3.2. <i>Hareketli fazdaki tampon derişimi</i>	21
4.3.3.3. <i>Organik çözücü oranı</i>	21
4.3.3.4. <i>pH</i>	22
4.3.3.5. <i>Akış hızı</i>	22
4.3.4. Validasyon	22
4.3.4.1. <i>Doğrusallık</i>	22

4.3.4.2. Kesinlik.....	23
4.3.4.3. Doğruluk	23
4.3.4.4. Duyarlılık.....	23
4.3.4.5. Kararlılık	23
4.3.4.6. Sağlamlık.....	23
4.3.4.7. Spesifiklik.....	24
4.4. Yöntemlerin Uygulanması.....	24
5. BULGULAR VE YORUM.....	25
5.1. KE Yöntemi	25
5.1.1. Yöntemin Optimizasyonu	25
5.1.1.1. Tampon bileşimi ve derişimi.....	26
5.1.1.2. pH	28
5.1.1.3. Organik çözücü	29
5.1.1.4. Uygulanan potansiyel	30
5.1.1.5. İç standart.....	31
5.1.2. Validasyon	32
5.1.2.1. Doğrusallık.....	32
5.1.2.2. Kesinlik.....	34
5.1.2.3. Doğruluk	36
5.1.2.4. Duyarlılık.....	40
5.1.2.5. Kararlılık	40
5.1.2.6. Sağlamlık.....	41
5.1.3. Sistem uygunluk testleri.....	41
5.2. YPSK Yöntemi	42
5.2.1. Optimizasyon	42
5.2.1.1. Organik çözücü yüzdesi	42
5.2.1.2. Hareketli fazdaki tampon derişimi	43
5.2.1.3. pH	44
5.2.1.4. Akış hızı	45
5.2.1.5. Dalga boyu	46
5.2.2. Validasyon	47

5.2.2.1. Doğrusallık.....	48
5.2.2.2. Kesinlik.....	50
5.2.2.3. Doğruluk	51
5.2.2.4. Duyarlılık.....	54
5.2.2.5. Kararlılık	54
5.2.2.6. Sağlamlık.....	55
5.2.3. Sistem uygunluk testleri.....	56
5.3. Yöntemlerin Uygulanması.....	57
6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER.....	60
KAYNAKÇA.....	62
ÖZ GEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. KE sisteminin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.2. KE yönteminde elektroozmotik akış şeması	8
Şekil 2.3. YPSK sisteminin şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.4. RFN'nin açık kimyasal formülü.....	12
Şekil 2.5. LMT'nin açık kimyasal formülü	12
Şekil 2.6. ZNS'nin açık kimyasal formülü	13
Şekil 5.1. Çalışma tamponunda anyonik sürfaktan derişimi incelemesi	26
Şekil 5.2. Çalışma tamponunda borat derişimi incelemesi.....	27
Şekil 5.3. Çalışma tamponunda fosfat derişimi incelemesi.....	28
Şekil 5.4. Çalışma tamponu pH incelemesi.....	29
Şekil 5.5. Çalışma tamponunda organik çözücü oranı incelemesi.....	30
Şekil 5.6. Uygulanan potansiyelin incelemesi.....	31
Şekil 5.7. Optimum koşullar altında ZNS, RFN ve LMT'ye ait elektroferogram	32
Şekil 5.8. KE yönteminde RFN, LMT ve ZNS'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi.....	33
Şekil 5.9. Hareketli fazdaki organik çözücü oranının incelenmesi.....	43
Şekil 5.10. Hareketli fazdaki tampon derişiminin incelenmesi.....	44
Şekil 5.11. pH incelenmesi	45
Şekil 5.12. Akış hızı incelenmesi.....	46

Şekil 5.13. Dalga boyu incelenmesi.....	47
Şekil 5.14. Optimum koşullar altında RFN, LMT ve ZNS'ye ait kromatogram	47
Şekil 5.15. YPSK yönteminde RFN, LMT ve ZNS'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi.....	48
Şekil 5.16. RFN, LMT, ZNS içeren farmasötik dozaj formlarına ait elektroferogram...	57
Şekil 5.17. RFN, LMT, ZNS içeren farmasötik dozaj formlarına ait kromatogram.....	58



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 5.1. RFN'nin KE yöntemi ile kalibrasyon verileri	33
Tablo 5.2. LMT'nin KE yöntemi ile kalibrasyon verileri	34
Tablo 5.3. ZNS'nin KE yöntemi ile kalibrasyon verileri	34
Tablo 5.4. RFN'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri	33
Tablo 5.5. LMT'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri	34
Tablo 5.6. ZNS'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri	35
Tablo 5.7. RFN'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri	33
Tablo 5.8. LMT'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri	34
Tablo 5.9. ZNS'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri	39
Tablo 5.10. RFN, LMT ve ZNS'nin kararlılık verileri	40
Tablo 5.11. KE yönteminin sağlamlık verileri	41
Tablo 5.12. KE yönteminde RFN, LMT ve ZNS'nin sistem uygunluk verileri	42
Tablo 5.13. RFN'nin YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri	49
Tablo 5.14. LMT'nin YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri	49
Tablo 5.15. ZNS'nin YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri	49
Tablo 5.16. RFN'nin YPSK yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri	50
Tablo 5.17. LMT'nin YPSK yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri	50
Tablo 5.18. ZNS'nin YPSK yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri	51
Tablo 5.19. RFN'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri	51

Tablo 5.20. LMT'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri	52
Tablo 5.21. ZNS'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri.....	53
Tablo 5.22. YPSK yönteminde RFN, LMT ve ZNS'nin kararlılık verileri	55
Tablo 5.23. YPSK yönteminin sağlamlık verileri.....	56
Tablo 5.24. YPSK yönteminde RFN, LMT ve ZNS'nin sistem uygunluk verileri	56
Tablo 5.25. RFN, LMT, ZNS içeren farmasötik dozaj formlarının KE ve YPSK yöntemleri ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	59



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Seçicilik faktörü
a	: Eğim
As	: Asimetri faktörü
b	: Kesim
BH	: Bağlı hata
BSS	: Bağlı standart sapma
DAD	: Foto diyot dizisi
dk	: Dakika
GA	: Güven aralığı
h	: Hacim
H ₃ PO ₄	: Fosforik asit
ICH	: Uluslararası uyum konferansı
IS	: İç standart
IPA	: İzopropil alkol
k'	: Kapasite faktörü
KE	: Kapiler elektroforez
KMK	: Kritik misel konsantrasyonu
LC-MS	: Kütle spektrometresine bağlı sıvı kromatografisi
LC-MS/MS	: Tandem (dizili) kütle spektrometresine bağlı sıvı kromatografisi
LMT	: Lamotrijin

LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
MEKK	: Miseller elektrokinetik kromatografi
n	: Deney sayısı
N	: Tabaka sayısı
NaOH	: Sodyum hidroksit
Ort	: Ortalama
PNO	: Pik normalizasyon oranı
r	: Korelasyon katsayısı
rpm	: Döngü/dakika
Rs	: Ayrım gücü
RFN	: Rufinamit
SD	: Serbestlik derecesi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Ss	: Standart sapma
USP	: Amerikan Farmakopesi
UV	: Mor ötesi
YPSK	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ZNS	: Zonisamit

1. GİRİŞ

Bu tez çalışmasında rufinamit (RFN), lamotrijin (LMT) ve zonisamit (ZNS) olmak üzere üç farklı antiepileptik ilacın eş zamanlı belirlenmesi için bir kapiler elektroforez (KE) yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem; Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile doğrulanmıştır.

Epilepsi, dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen ve tekrarlayan nöbetlerle karakterize edilen kronik bir nörolojik hastalıktır. Nöbetlerin kontrol altına alınması ve hastaların yaşam kalitesinin iyileştirilmesi amacıyla antiepileptik ilaçlar (AEİ'ler) yaygın olarak kullanılmaktadır (Carcak ve Ozkara, 2017). Bu ilaçlar, nöbetlerin sıklığını ve şiddetini azaltarak merkezi sinir sistemindeki anormal elektriksel aktiviteleri düzenlerler. AEİ'ler, etki mekanizmaları ve kimyasal yapılarına göre çeşitli sınıflara ayrılır (Gerlach ve Krajewski, 2010). Bu nedenle, bu ilaçların doğru bir şekilde belirlenmesi ve dozajlarının izlenmesi, tedavinin etkinliğini ve güvenliğini sağlamak açısından kritik önem taşır (Gaspar vd., 2021).

RFN bir triazol türevidir ve Lennox-Gastaut sendromu gibi dirençli epilepsi türlerinin tedavisinde kullanılır. Kimyasal olarak, RFN bir amid fonksiyonel grubu içerir ve düşük çözünürlük özellikleri gösterir. Moleküler yapısı, diğer AEİ'lerden belirgin şekilde farklıdır (Bialer ve White, 2010; Kearney ve Rho, 2009).

LMT, feniltiriazin sınıfına ait bir antiepileptik olup, özellikle fokal ve jeneralize nöbetlerin tedavisinde kullanılır. LMT, sodyum kanallarını bloke ederek sinir hücrelerinin aşırı uyarılmasını engeller. Yapısal olarak, LMT fenil halkası içeren bir triyazin türevidir ve hem asidik hem de bazik özellikler sergiler (Kwan ve Brodie, 2001; Glauser vd., 2013).

ZNS, benzizoksazol türevi bir AEİ olup, özellikle fokal nöbetlerin tedavisinde kullanılır. ZNS, sodyum ve kalsiyum kanallarını inhibe ederek nöbetlerin kontrol altına alınmasına yardımcı olur. ZNS, yapısında hem benzizoksazol hem de sülfamat grupları içerir, bu da ona farklı fizikokimyasal özellikler kazandırır. ZNS'in lipofilik yapıda ve zayıf asidik karakterdedir (Loscher ve Schmidt, 2011; Vahle vd., 2008).

RFN, LMT ve ZNS, yapı bakımından önemli ölçüde farklılık göstermekte ve bu durum, ilgili ilaçların klasik yöntemlerle eşzamanlı analizlerini zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte, bu ilaçlar genellikle refrakter epilepsi tedavisinde birlikte kullanılmaktadır. Her biri farklı farmakokinetik özelliklere sahip olduğundan, bu ilaçların doğru bir şekilde izlenmesi, tedavi sürecinin etkinliğini ve güvenliğini sağlamak için kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda, RFN, LMT ve ZNS'nin eşzamanlı analizinin gerçekleştirilmesi, tedavi izlemine katkı sağlanmasına ve farmakokinetik etkileşimlerin daha iyi anlaşılmasına olanak tanımaktadır.

Mevcut farmasötik dozaj formlarında, bu üç ilaç bir arada bulunmamaktadır. Ancak literatürde, refrakter epilepsinin tedavisinde RFN, LMT ve ZNS kombinasyonlarının etkinliği üzerine birçok çalışma mevcuttur. RFN ve LMT'nin kombinasyonunun refrakter epilepsi tedavisinde etkinliği gösterilmiş (Wang vd., 2019), ve benzer şekilde, ZNS'nin bu kombinasyona dahil edilmesiyle tedavi sürecinin iyileşebileceği öne sürülmüştür (Lee vd., 2021). Bu bağlamda, çalışmamda geliştirdiğim yöntem, bu ilaçların kombinasyon tedavisinde farmakokinetik izlemeyi kolaylaştırmakta ve gelecekteki farmasötik dozaj formu geliştirme süreçlerine katkı sağlayabilecek bir temel oluşturmaktadır.

Bu çalışmada RFN, LMT ve ZNS'nin eş zamanlı analizleri için bir KE yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin optimizasyonunun ardından yöntemin geçerliliği doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, spesifiklik, duyarlılık, sağlamlık ve kararlılık parametreleri ile gösterilmiştir. Geliştirilen yöntem YPSK yöntemi ile doğrulanmıştır. Daha sonra yöntemler farmasötik dozaj formlarına uygulanmış, sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Antiepileptikler

Antiepileptik ilaçlar (AEİ'ler), epilepsi hastalığının tedavisinde kullanılan ve nöbetlerin kontrol altına alınmasını sağlayan ilaçlardır. Epilepsi, beyindeki anormal elektriksel aktiviteler sonucu ortaya çıkan ve bilinç kaybı, kasılmalar, duyuşsal bozukluklar gibi semptomlarla karakterize edilen bir nörolojik hastalıktır. AEİ'ler, bu anormal elektriksel aktiviteleri düzenleyerek nöbetleri önler veya şiddetlerini azaltır.

AEİ'ler, etki mekanizmalarına ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılabilir (Rogawski ve Löscher, 2004). Genel olarak, bu ilaçların etki mekanizmaları şunları içerir:

Sodyum Kanal Blokajı:

Birçok AEİ, voltaj kapılı sodyum kanallarını bloke ederek sinir hücrelerinin (nöronların) aşırı uyarılmasını engeller. Bu durum, nöronların anormal elektriksel aktiviteler üretmesini önleyerek nöbetleri kontrol altına alır. Örnek olarak, LMT ve karbamazepin gibi ilaçlar verilebilir.

Kalsiyum Kanal Blokajı:

Bazı AEİ'ler, voltaj kapılı kalsiyum kanallarını bloke ederek nöbetlerin önlenmesine katkıda bulunur. Kalsiyum iyonlarının hücre içine girişi, nöronal eksitasyonu artırabilir, bu nedenle bu kanalların inhibisyonu nöbetlerin kontrolünde etkilidir. ZNS, bu mekanizma ile etki gösteren ilaçlardan biridir.

GABA (Gamma-Aminobutirik Asit) Sisteminin Modülasyonu:

GABA, merkezi sinir sisteminde inhibitör bir nörotransmitter olarak görev yapar. AEİ'ler, GABA'nın etkisini artırarak nöronal eksitasyonu azaltır ve nöbetleri kontrol eder. Benzodiazepinler (örneğin, diazepam) ve valproik asit, bu mekanizma üzerinden etki gösteren AEİ'lerdendir.

Glutamat Salınımının İnhibisyonu:

Glutamat, beyinde eksitator (uyarıcı) bir nörotransmitterdir. Glutamat salınımını inhibe eden AEİ'ler, nöronal eksitasyonu azaltarak nöbetleri önler. Örneğin, topiramet bu mekanizma ile çalışır (Brodie ve Dichter, 1996; Perucca, 2005).

Çeşitli Diğer Mekanizmalar:

Bazı AEİ'ler, yukarıda belirtilen mekanizmaların bir kombinasyonunu kullanarak veya tamamen farklı bir yol üzerinden nöbetleri kontrol altına alabilir. RFN, hem sodyum kanallarını bloke eder hem de diğer nöronal yolları modüle ederek etkisini gösterir (McNamara, 2006).

2.2. RFN'nin Farmakolojik Özellikleri

RFN, özellikle Lennox-Gastaut sendromu gibi dirençli epilepsi türlerinin tedavisinde kullanılan bir antiepileptik ilaçtır. RFN'nin etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsa da esas olarak sodyum kanallarının yavaş inaktivasyonunu artırarak çalıştığı düşünülmektedir.

Bu durum, sinir hücrelerinin aşırı uyarılabilirliğini azaltır ve nöbetlerin kontrol altına alınmasına yardımcı olur. Bu mekanizma, özellikle Lennox-Gastaut sendromu gibi dirençli epilepsi türlerinde etkili olmasını sağlar (Rx-Media, 2024).

2.3. RFN'nin Farmakokinetik Özellikleri

RFN, oral yolla alındığında gastrointestinal sistemden hızla emilir. Ancak, biyoyararlanımı doza bağlı olarak azalma eğilimi gösterir; bu durum, ilacın doza bağlı doyurulabilir bir emilim kinetiği olduğunu gösterir. Yağ içeriği yüksek bir yemekle birlikte alındığında, emilimi %30-40 oranında artabilir.

RFN, plazma proteinlerine yaklaşık %34 oranında bağlanır, bu da ilacın serbest fraksiyonunun önemli bir kısmının biyolojik olarak aktif olmasını sağlar. Dağılım hacmi 50 L civarındadır, bu da ilacın vücutta geniş bir alana dağıldığını gösterir (Perucca ve Franco, 2010).

RFN, karaciğerde sınırlı ölçüde metabolize olur. Ana metabolik yolak, amid bağı hidrolizi ile oluşan inaktif bir karboksilik asit türevidir. Bu metabolit, daha sonra idrarla atılır. RFN, sitokrom P450 enzim sistemi tarafından anlamlı bir şekilde metabolize edilmez, bu da diğer ilaçlarla metabolik etkileşim riskini azaltır (Glauser ve Pellock, 2009).

İlacın eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 6-10 saat arasındadır, bu nedenle genellikle günde iki kez dozlama gerektirir. RFN, büyük oranda idrarla, daha az oranda ise feçesle atılır.

Atılımının %85'i idrar yoluyla olur ve bu oranın yaklaşık %50-60'ı değişmeden atılan ilaçtır (European Medicines Agency, 2007).

2.4. LMT'nin Farmakolojik Özellikleri

LMT, geniş spektrumlu bir antiepileptik ilaç olup hem fokal hem de jeneralize nöbetlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Ayrıca bipolar bozukluğun tedavisinde de etkilidir (Rx-Media, 2024).

LMT, sodyum kanallarının hızlı inaktivasyonunu stabilize ederek nöronlardaki aşırı uyarılabilirliği azaltır. Bu, sinir hücrelerinin aşırı uyarılmasını ve anormal elektriksel aktivitenin yayılmasını engeller. Özellikle glutamat ve aspartat gibi uyarıcı nörotransmitterlerin salınımını azaltarak, nöbetlerin kontrol altına alınmasına yardımcı olur. Bu mekanizma hem epileptik nöbetlerin hem de bipolar bozuklukta görülen mani ve depresyon ataklarının önlenmesinde etkilidir (Baker ve Furtado, 2008a).

2.5. LMT'nin Farmakokinetik Özellikleri

LMT, oral yoldan alındığında gastrointestinal sistemden hızla ve tamamen emilir. Biyoyararlanımı %98 civarındadır, bu da ilacın büyük kısmının dolaşıma girdiğini gösterir. Yemeklerle birlikte alındığında emilim hızı etkilenmez, bu nedenle aç veya tok karnına alınabilir. LMT'nin plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık %55 civarındadır. Dağılım hacmi geniştir (yaklaşık 0.9-1.3 L/kg), bu da ilacın vücutta geniş bir alana dağıldığını gösterir. Beyin omurilik sıvısına geçişi iyi düzeydedir.

Karaciğerde glukuronidasyon yoluyla büyük ölçüde metabolize edilir. Ana metaboliti 2-N-glukuronid, inaktif olup, büyük ölçüde idrarla atılır. LMT, karaciğer enzimleri tarafından metabolize edilmediği için diğer ilaçlarla daha az metabolik etkileşim gösterir.

LMT'nin eliminasyon yarı ömrü, genellikle 24-30 saat arasındadır. Ancak, bu süre eşzamanlı olarak valproat gibi ilaçlar alındığında uzayabilir veya fenitoin, karbamazepin gibi ilaçlarla birlikte kullanıldığında kısalabilir. LMT'nin büyük kısmı idrar yoluyla, az bir kısmı ise feçesle atılır (Hirsch ve French, 2007; Zaccara ve Morano, 2009; European Medicines Agency, 2009).

2.6. ZNS'nin Farmakolojik Özellikleri

ZNS, epilepsi tedavisinde kullanılan bir antiepileptik ilaçtır ve geniş spektrumlu nöbet kontrolü sağlar. Aynı zamanda bazı nöropatik ağrı sendromları ve Parkinson hastalığında da kullanımı mevcuttur (Rx-Media, 2024).

ZNS, birden fazla etki mekanizmasına sahip bir ilaçtır. Voltaj bağımlı sodyum kanallarını bloke eder. Bu mekanizma, nöronların aşırı uyarılabilirliğini azaltır ve epileptik nöbetlerin önlenmesine yardımcı olur. Ayrıca voltaj bağımlı T-tip kalsiyum kanallarını inhibe eder. Bu durum, özellikle absans nöbetleri gibi belirli nöbet tiplerinde etkilidir. ZNS, karbonik anhidraz enzimini inhibe eder. Böylece, beyinde asit-baz dengesi etkilenerek ve nöbet eşiği arttırılabilir. Bu mekanizma, ZNS'nin diüretik etkilerini de açıklayabilir (Baker ve Furtado, 2008b).

2.7. ZNS'nin Farmakokinetik Özellikleri

ZNS, oral yolla alındığında iyi emilir ve biyoyararlanımı %100'e yakındır. Yemekle birlikte alındığında emilim hızında önemli bir değişiklik olmaz, bu nedenle ZNS yemekle birlikte veya aç karnına alınabilir. ZNS'nin plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık %40-50 arasındadır. Dağılım hacmi 1.1-1.7 L/kg'dır, bu da ilacın vücutta geniş bir alana yayıldığını gösterir. ZNS hem santral sinir sistemine hem de beyine iyi bir şekilde penetre olabilir.

Karaciğerde büyük ölçüde CYP3A4 izoenzimi aracılığıyla metabolize edilir. Ana metabolitleri inaktif olup, idrarla atılır. Ayrıca karboksilik asit türevlerine ve glukuronid konjugatlarına metabolize olur.

ZNS'nin eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 50-70 saattir, bu da ilacın günde bir kez dozlanmasına olanak tanır. İlacın büyük kısmı, değişmeden veya metabolitleri olarak idrar yoluyla atılır. Az bir kısmı ise feçesle atılır (Kank ve Kim, 2016; Kwan ve Brodie, 2000, European Medicines Agency, 2010).

2.8. Kullanılan Yöntemler

2.8.1. KE yöntemi

KE yöntemi, yüklü taneciklerin (iyonlar, kolloidal tanecikler gibi) elektrik alanı etkisi altında farklı hızlarda hareket etme özelliklerinden faydalanarak ayrılmalarını sağlayan

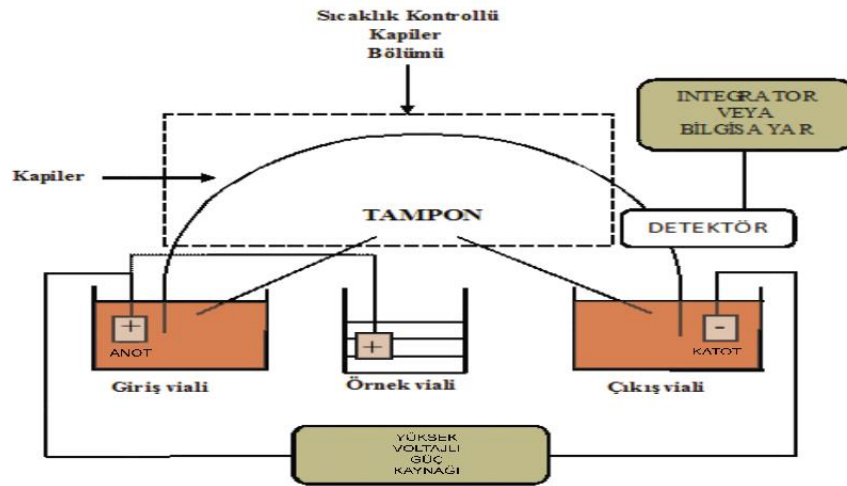
bir yöntemdir. Dar çaplı bir kapiler (20-200 μm) bir elektrolit çözeltisiyle (BGE) doldurulur ve kapilerin iki ucu arasında yüksek voltaj uygulanır. Elektrik alan sıvı boyunca uygulandığında, numunedeki iyonlar boyutlarına ve yüklerine göre kapiler boyunca farklı hız ve yönlerde göç eder (Baker ve Huang, 2020).

Numune kapilerin anodik ucuna yerleştirildiğinde, pozitif yüklü katyonlar negatif yüklü elektrota (katot) doğru göç ederken, negatif yüklü anyonlar pozitif yüklü elektrota (anot) doğru göç edecektir. Göç hızları, yük-boyut oranına bağlıdır; aynı yüke sahip küçük iyonlar, büyük iyonlardan daha hızlı göç edecek ve aynı boyuttaki iyonlar arasında daha yüksek yüklü iyonlar, daha düşük yüklü iyonlardan daha hızlı göç edecektir. Nötr bileşikler ise elektroosmotik akış hızında hareket edecektir (Landers, 2008).

Ayrılan moleküller kapiler sonuna yerleştirilen bir detektör yardımı ile analiz edilirler. Detektör çıktısı, zamana karşı detektör yanıtının bir grafiğidir ve buna elektroferogram adı verilir. Sistem temel olarak; örnek, giriş ve çıkış vialleri, kapiler, detektör, yüksek voltajlı güç kaynağı ve bilgisayar gibi bir bilgi işleme cihazından meydana gelir (Kovács vd., 2021) (Şekil 2.1).

Şekil 2.1

KE sisteminin şematik gösterimi

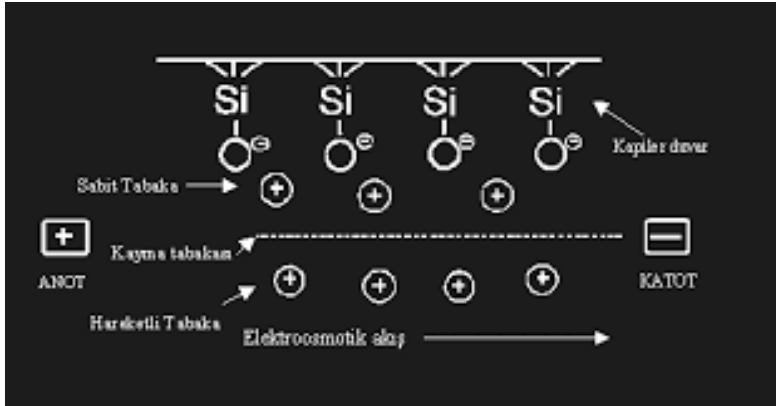


KE'yi yönlendiren temel süreçlerden biri elektroosmozdur. Elektroosmoz, silika kapilerlerin duvarındaki yükün bir sonucudur. Tamponla temas halindeki negatif yüklü

silanol grupları, tampondan pozitif yüklü iyonları çeker ve elektriksel çift katmanlı bir tabaka oluşturur. Voltaj uygulandığında, çift katmanın yaygın kısmındaki hidratlanmış katyonlar katoda doğru göç eder ve bu da negatif elektroda doğru tampon çözeltisinin akışını, yani elektroosmotik akışı meydana getirir (Jorgenson ve Lukacs, 1981). (Şekil 2.2).

Şekil 2.2

KE yönteminde elektroosmotik akış şeması



Kapiler içerisindeki tamponun elektroosmotik akışı, genellikle negatif yüklü anyonların elektroforetik hareketliliklerinden daha büyük olduğu için, bu anyonlar tampon ile birlikte taşınmaktadır. Anyonik moleküller anot tarafından çekildikleri için, elektroosmotik akıştan daha yavaş hareket ederler ve dolayısıyla kapileri daha geç terk ederler. Yüksüz parçacıklar, elektroforetik hareketliliklerden etkilenmedikleri için elektroosmotik akış hızıyla göç ederler. Pozitif yüklü parçacıklar ise katoda doğru hem elektroforetik etki hem de elektroosmotik akışın birleşimi ile göç ederler. Bu nedenle, pozitif yüklü moleküllerin akış hızı, elektroosmotik akış hızından daha fazladır. Elektroosmotik akış hızının deneysel tayininde, mezitil oksit veya dimetil sülfoksit gibi elektroforetik çekime uğramayan maddeler kullanılabilir (Reijenga vd., 2007).

KE’de uygun tampon çözeltilerinin seçimi, analitlerin uygun göçünü sağlamak ve numune konsantrasyonundan bağımsız olarak stabil ayırma koşulları sunmak açısından önemli bir husustur. Tamponun pH’ı, konsantrasyonu ve bileşimi ayırma performansı ve seçicilik üzerinde doğrudan etkiye sahiptir. Tamponun pH’ı hem elektroosmotik akışı hem de numunenin elektroforetik hareketliliğini etkiler ve bu parametreler ayırma

boyunca sabit kalmalıdır. Tamponun pH'ı değiştirildikçe, kapilerin iç duvarındaki silanol gruplarının iyonizasyonu değiştiğinden elektroosmotik akış da değişir. Kapiler duvarında ne kadar fazla iyonizasyon olursa, zeta potansiyeli o kadar büyük olur ve bu potansiyel doğrudan elektroosmotik akış ile ilişkilidir (Liu vd., 2019).

Bir numunedeki bileşiklerin ayrılması söz konusu olduğunda, tampon yalnızca optimum elektroosmotik hızı sağlamak için değil, aynı zamanda en iyi ayırmayı elde etmek için de seçilir. Tamponun pH'ı, zayıf asitler, zayıf bazlar veya amfolitler gibi iyonize olabilen gruplara sahip ilaçların elektromigrasyonu üzerinde büyük etkiye sahiptir. Bu durumda, göç davranışı, çalışma pH'ında mevcut olan bireysel iyon türlerinin hareketliliği ile ilişkilidir. Etkin hareketlilik, bir bileşiğin denge halinde olan iyonik türlerinin genel elektroforetik hareketliliğidir ve bu nedenle kısmen iyonize olmuş bir maddenin elektromigrasyonu ile ilişkilidir (Britz-McKibbin ve Chen, 2000).

Kapiler zon elektroforezi (KZE), KE'de en yaygın ve en basit moddur. KZE, küçük moleküllü ilaçların analizinde iyi bir şekilde yerleşmiş bir tekniktir. İlaç analizindeki uygulama alanı, yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK) ile benzerdir ve bir ilacın kimliğinin belirlenmesi, saflık testi, tuz stokiometrisi, ilgili maddeler, bozunma ürünleri, kiral saflık ve karşı iyon içeriği gibi analizleri kapsar. Ayrıca, ham madde ve yardımcı madde analizinde de kullanılabilir. KZE'deki hareketlilik bileşiklerin iyonizasyonuna güçlü bir şekilde bağlı olduğundan, KZE'nin öne çıkan bir uygulaması, ilaç keşfi ve geliştirme süreçlerinde kritik bir fizikokimyasal parametre olan pKa tayinidir (Landers, 2008).

2.8.2. MEKK yöntemi

KZE'nin önemli sınırlamalarından biri, nötr bileşikleri ayıramamasıdır. Bu durum, nötr bileşiklerin elektriksel bir yüke sahip olmamasından kaynaklanmaktadır. Bu eksikliği gidermek amacıyla, elektrokinetik kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Elektrokinetik kromatografi, elektroosmoz, elektroforez ve kromatografik süreçlerin bir kombinasyonunu içermekte olup, nötr bileşiklerin de ayrılabilmesini sağlamaktadır. 1984 yılında Terabe tarafından geliştirilen miseller elektrokinetik kromatografi (MEKK), yüzey aktif maddelerin kritik misel konsantrasyonunun (KMK) üzerinde sulu bir tampona eklenmesiyle uygulanmaktadır.

Yüzey aktif maddeler genel olarak anyonik, katyonik, zwitter iyonik ve noniyonik olmak üzere dört ana sınıfa ayrılmaktadır. Ancak, zwitteriyonik ve noniyonik yüzey aktif maddeler yüklü olmadıkları için, MEKK'de genellikle anyonik veya katyonik yüzey aktif maddelerle birlikte kullanılmaktadırlar. MEKK'de en yaygın olarak kullanılan yüzey aktif madde, anyonik özellikteki sodyum dodesil sülfattır (SDS). SDS'nin negatif yüklü olması sebebiyle miseller elektroforetik hıza sahiptir. Kapiler sistemde katot çıkış ucuna yerleştirildiğinde, elektroosmotik akış anottan katoda doğru hareket ederken, negatif yüklü miseller elektroforetik olarak anot yönüne doğru çekilmektedir. Ancak, EOF hızı elektroforetik hızdan daha büyük olduğu için, miseller genel akış yönüne göre hareket etmektedir.

Bu sistemde miseller, mobil fazdan daha yavaş hareket eden, çözünmüş bileşiklerle etkileşime giren bir denge fazı oluşturmaktadır. Bu etkileşim, ters faz kromatografide gözlemlenen etkileşime benzer şekilde, hidrofobik etkileşimler yoluyla gerçekleşmektedir. Sonuç olarak hem nötr hem de yüklü bileşikler, sulu mobil faz ile misel fazı arasındaki dengelemelere dayalı olarak ayrılmaktadır. Yüklü bileşiklerin ayrılmasında elektroforetik fenomenler ve misellere dağılımın bir kombinasyonu etkili olurken, nötr bileşiklerin ayrılması tamamen dağılım dengesi ile yönetilmektedir. Genelde, hidrofobik bileşikler yüzey aktif maddelerin hidrofobik zincirleriyle daha güçlü bir etkileşime girerek misellerde daha uzun süre tutulmakta ve daha az hidrofobik bileşiklere kıyasla daha geç elüe edilmektedir (Terabe vd., 1984; Riekkola ve Kenndler, 2013).

2.8.3. YPSK yöntemi

YPSK, modern kimyada güçlü bir analitik yöntem olarak öne çıkmaktadır. Sıvıda çözünen numunelerin bileşenlerini tanımlamada, ölçmede ve ayırmada başarıyla uygulanır. Farmakolojik ürün analizlerinde yaygın olarak kullanılan YPSK hem nicel hem de nitel analizlerde yüksek duyarlılık göstermekte ve analitik kimyadaki gelişmelere önemli katkılarda bulunmaktadır (Rao vd., 2015).

YPSK'de numune çözeltisi gözenekli bir kolona (sabit faz) enjekte edilir. Ardından, bir sıvı (hareketli faz) kolondan yüksek basınç altında pompalanır. Numunedeki bileşenler, sabit faz ile hareketli faz arasındaki ayrışma nedeniyle farklı göç hızları sergiler. Bu

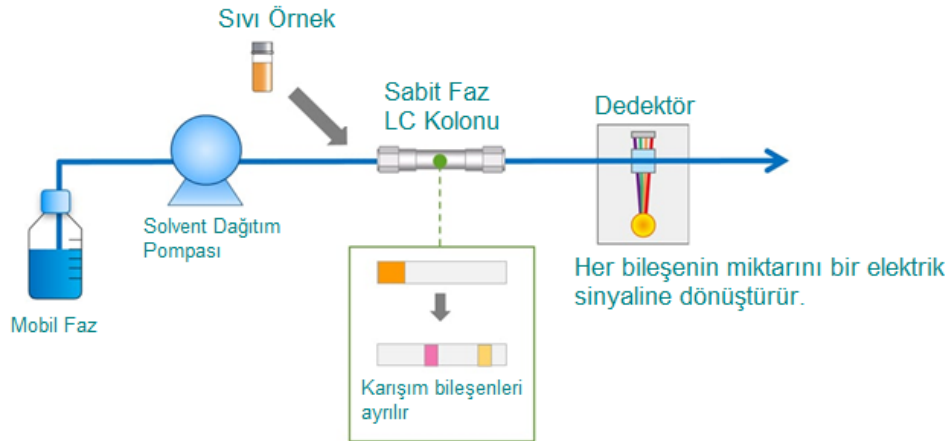
durum, bileşenlerin farklı zamanlarda elüe olmasına ve böylece ayrılmalarına yol açar (Rajan, 2015).

YPSK’de, sabit faza daha düşük afinitesi olan bir bileşik daha hızlı hareket ederek daha uzun bir mesafe kat ederken, sabit faza daha yüksek afinitesi olan bir bileşik daha yavaş hareket eder ve daha kısa bir mesafe kat eder. Farklı göç hızları, numune bileşenlerinin etkili bir şekilde ayrılmasını ve analiz edilmesini sağlar (Kumar vd., 2015).

Ayırım prensibi, analitin sabit faz ile hareketli faz arasında dağılımına dayanır ve bu fazlar genellikle kolondaki dolgu maddesiyle etkileşim içindedir. Analitin kimyasal yapısı, sabit faz içindeki hareket hızını belirler ve bu özellik, ayırımın temelini oluşturur. Bu prensip sayesinde bileşiklerin hassas bir şekilde ayrılması ve analizi sağlanır. YPSK, özellikle farmasötik ve kimya endüstrilerinde analitik kimyanın temel tekniklerinden biridir, çünkü bileşiklerin etkili bir şekilde analiz edilmesine olanak tanır. YPSK cihazı, hareketli faz, pompa, enjektör, kolon, detektör ve bilgisayar gibi bir kayıt cihazından oluşur (Sabir vd., 2013) (Şekil 2.3).

Şekil 2.3

YPSK sisteminin şematik gösterimi



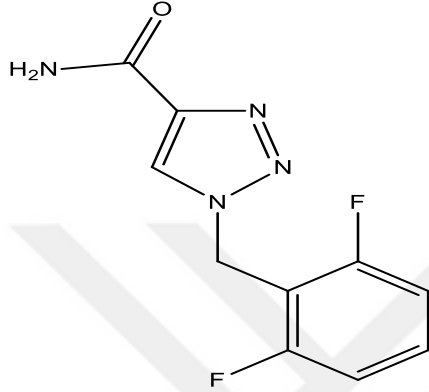
2.9. RFN’nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

RFN beyaz renkli, kokusuz bir tozdur. Suda çözünürlüğü zayıftır. Ancak, metanol, etanol ve diğer organik çözücülerle çözünebilir. RFN’nin çözeltisinin pH değeri, çözünürlük

koşullarına bağlı olarak değişebilir. Genel olarak, pH değeri nötr veya hafif asidik olabilir. Molekül ağırlığı 238,19 g/mol'dür. Kapalı formülü ise $C_{10}H_8F_2N_4O$ 'dır (Rx Media, 2024; Perucca ve Franco, 2010). Açık formülü Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

Şekil 2.4

RFN'nin açık kimyasal formülü

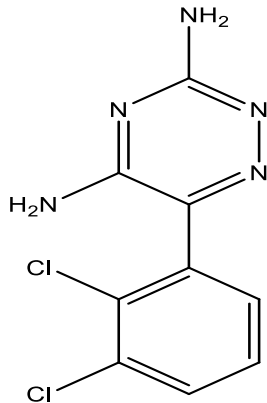


2.10. LMT'nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

LMT beyaz renkli, kokusuz kristalize bir tozdur. Suda çözünürlüğü zayıftır. Ancak, metanol, etanol gibi organik çözücülerde iyi çözünür. Molekül ağırlığı 256,091 g/mol'dür. Kapalı formülü ise $C_9H_7Cl_2N_5$ 'dir (Rx Media, 2024; Baker ve Furtado, 2008a). Açık formülü Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

Şekil 2.5

LMT'nin açık kimyasal formülü

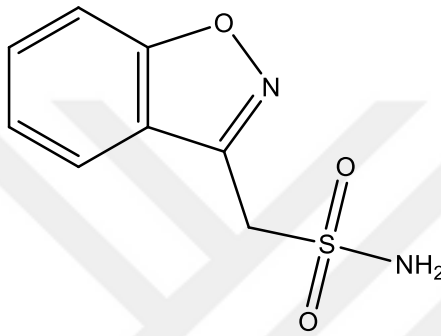


2.11. ZNS'nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

ZNS beyaz renkli, kokusuz kristalize bir tozdur. Suda çözünürlüğü zayıftır. Ancak, metanol, etanol gibi organik çözücülerde iyi çözünür. Molekül ağırlığı 212,227 g/mol'dür. Kapalı formülü ise $C_8H_8N_2O_3S$ 'dir (Rx Media, 2024; Baker ve Furtado, 2008b). Açık formülü Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

Şekil 2.6

ZNS'nin açık kimyasal formülü



2.12. RFN, LMT ve ZNS'nin Miktar Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar

Literatürdeki KE çalışmaları incelendiğinde; LMT, RFN ve ZNS'nin bir arada analiz edildiği bir KE yöntemine rastlanmamıştır. LMT ve ZNS'nin tek başına analiz edildiği KE çalışmalarında bu çalışmaya göre analiz süresinin uzun ve pik morfolojilerinin bozuk olduğu görülmektedir (Theurillat vd., 2002; Makino vd., 1997). RFN analizi için geliştirilen bir kapiler elektroforez yöntemi bulunmamaktadır.

Literatürdeki kromatografik çalışmalar incelendiğinde üç maddenin birlikte analiz edildiği bir YPSK (Contin vd., 2010) ve bir LC- MS (Abadi vd., 2024) çalışması bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda analiz süreleri uzun olup pik morfolojilerinin bozuk olduğu görülmektedir. Ayrıca her iki çalışmada da RFN ve ZNS' nin alıkonma zamanları çok yakın olup Sistem Uygunluk Testlerinden geçmesi için beklenen R_s değeri sınırının altında kalmaktadır.

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik asit	: Merck, Almanya
Asetonitril	: Merck, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat	: Fluka, Almanya
Fosforik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Hidroklorik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
İzopropil alkol	: Merck, Almanya
Lamotrijin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Rufinamit	: Sigma-Aldrich, Almanya
SDS	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum asetat	: Merck, Almanya
Sodyum borat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum dihidrojen fosfat	: Fluka, Almanya
Sodyum hidroksit	: Merck, Almanya
Zonisamit	: Sigma-Aldrich, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik, No Frost&Electronic, Türkiye
Hassas terazi	: Mettler Toledo, İsviçre
Kapiler elektroforez	: Agilent Technologies, CE7100, A.B.D.
Kapiler	: Agilent Technologies, A.B.D.

Otomatik pipet	: Eppendorf, Almanya
pH metre	: Mettler Toledo, İsviçre
Şırınga filtresi	: Macherey Nagel, Almanya
Ultra saf su cihazı	: Millipore, A.B.D.
Ultrasonik banyo	: Sonorex, Almanya
Vorteks karıştırıcı	: Jeio Tech, Kore
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	: Agilent Technologies, 1260, A.B.D
Kolon	: Agilent Technologies, A.B.D.



4. YÖNTEMLER

4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı

Geliştirilecek yöntemde kullanılacak çözücüü belirlemek amacıyla öncelikle RFN, LMT ve ZNS maddeleri için uygun çözücü araştırılmıştır. Literatür bilgileri ve ön denemelerin değerlendirilmesi sonucunda, üç etkin madde için de çözücü metanol olarak seçilmiştir. Ardından, her bir madde uygun miktarlarda tartılarak metanolde çözülmüştür. Hazırlanan çözeltiler, vorteks karıştırıcıda 10 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra 10 dakika süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Bu işlemler sonucunda, üç etkin maddenin de 10^{-3} M konsantrasyonunda ana stok çözeltileri elde edilmiştir. Tüm çözeltiler, alüminyum folyo ile sarılarak -18°C 'de buzdolabında saklanmıştır. Gerekli seyreltmeler bu stok çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, KE yöntemi için seyreltme çözeltisi olarak, çalışma tamponunun 1/10 seyreltilmiş hali kullanılmıştır. YPSK yönteminde ise seyreltmeler, metanol ile yapılmıştır.

4.2. KE Yöntemi

4.2.1. Cihazla ilgili koşullar

KE yönteminde deteksiyon, DAD kullanılarak 210 nm, 214 nm ve 227 nm dalga boylarında gerçekleştirilmiştir. Ayrım işlemi için $75\ \mu\text{m}$ iç çapına ve 40 cm efektif uzunluğa (toplam 48,5 cm) sahip çıplak silika kapillerler kullanılmıştır. Kapillerin ilk kullanımı öncesinde, şartlandırma amacıyla 30 dakika boyunca 1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile yıkanmıştır. Cihaz her açıldığında, kapillerler sırasıyla 10 dakika 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi, 10 dakika distile su ve 10 dakika çalışma tamponu ile yıkanmıştır.

Numune analizleri arasında şartlandırma işlemi, 2 dakika 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi, 2 dakika distile su ve 2 dakika çalışma tamponu ile gerçekleştirilmiştir. Günlük kullanım sonrası, kapillerler önce 10 dakika 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile, ardından 5 dakika distile su ile yıkanmış ve son olarak 2 dakika süreyle hava çekilerek kurutulmuştur. Enjeksiyonlar, 10 saniye boyunca 50 mbar basınç altında gerçekleştirilmiştir.

4.2.2. Çalışma tamponu

Yöntemde pH 3,0 ile 9,0 arasında farklı tampon çözeltileri kullanılmıştır. pH 3,0, 6,0, 7,0 ve 8,0 değerleri fosfat tamponları ile, pH 4,0 ve 5,0 değerleri asetat tamponu ile, pH 9,0 ise borat tamponu ile hazırlanmıştır. Fosfat tamponlarının hazırlanmasında, hedeflenen pH değerine göre disodyum hidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat ve fosforik asit uygun oranlarda kullanılmıştır. Asetat tamponları için ise sodyum asetat ve asetik asit uygun miktarlarda karıştırılarak istenen pH elde edilmiştir. Borat tamponları hazırlanırken sodyum tetraborat ve HCl kullanılmıştır.

Her bir tampon için 50 mM'lik ana stok çözeltileri hazırlandıktan sonra, gerekli seyreltmeler yapılarak istenilen derişim ve pH değerleri elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan anyonik yüzey aktif maddelerin hazırlanması için uygun miktarda SDS tartılmış 100 mM derişiminde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stoktan, ihtiyaç duyulan derişimdeki çözeltiler su ile seyreltilerek elde edilmiştir.

Tüm yıkama ve çalışma tamponu çözeltileri için, analiz öncesinde 0,45 µm'lik filtre kullanılmıştır.

4.2.3. Optimizasyon çalışmaları

KE yönteminin optimizasyon çalışmaları kapsamında tampon çözeltinin bileşimi ve derişimi, pH, organik çözücü oranı ve uygulanan potansiyel parametreleri incelenmiştir. Optimizasyon çalışmalarında 10^{-6} M derişiminde RFN, LMT ve ZNS çözeltileri kullanılmıştır.

4.2.3.1. Tampon bileşimi ve derişimi

Yöntemdeki çalışma tamponunun bileşimi ve derişimini belirlemek amacıyla önce 25, 30, 35 ve 40 mM SDS içeren 6 mM borat-10 mM fosfat tamponu (pH 9,00) hazırlanmıştır. RFN, LMT ve ZNS çözeltileri 15 kV potansiyel altında üçer kez analiz edilmiştir. Analiz süreleri ve analiz sonucunda elde edilen piklerin morfolojileri değerlendirilerek optimum SDS derişimi belirlenmiştir. Tampon derişimini ayarlamak için 35 mM SDS içeren 3 mM, 6 mM ve 9 mM derişimde üç farklı borat-10 mM fosfat tamponu (pH 9,00) hazırlanmış ve RFN, LMT ile ZNS çözeltileri yine 15 kV potansiyel altında üçer kez analiz edilmiştir.

Analiz süresi ve analiz sonucu elde edilen piklerin morfolojileri değerlendirilerek optimum borat tampon derişimi belirlenmiştir. Fosfat derişimini tespit etmek amacıyla, 35 mM SDS içeren 6 mM borat tamponu ile 5 mM, 10 mM ve 15 mM derişimde üç farklı fosfat tamponu (pH 9,00) hazırlanmıştır. RFN, LMT ve ZNS çözeltileri bu tamponlarla da 15 kV potansiyel altında üçer kez analiz edilmiştir. Analiz süresi ve analiz sonucu elde edilen piklerin morfolojileri değerlendirilerek optimum fosfat tampon derişimi belirlenmiştir.

4.2.3.2. pH

Çalışma tamponunun pH değerinin belirlenmesi için, pH'ı 8,50, 9,00 ve 9,50 olan 35 mM SDS içeren 6 mM borat-10 mM fosfat tamponları hazırlanmıştır. Bu üç farklı tampon ile RFN, LMT ve ZNS çözeltilerinin her biri üçer kez 15 kV potansiyel altında analiz edilmiştir. Analiz süresi ve analiz sonucu elde edilen piklerin morfolojileri değerlendirilerek en iyi ayırımı sağlandığı optimum pH değeri belirlenmiştir.

4.2.3.3. Organik çözücü oranı

Çalışma tamponundaki organik çözücü oranının ayırım üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, sırasıyla %0, %5 ve %10 (h/h) oranında izopropanol (IPA) içeren 35 mM SDS, 6 mM borat ve 10 mM fosfat tamponu (pH 9,00) hazırlanmıştır. RFN, LMT ve ZNS çözeltileri 15 kV potansiyel altında üçer kez analiz edilmiştir. Analiz süresi ve analiz sonucu elde edilen piklerin morfolojileri değerlendirilerek optimum organik çözücü oranı belirlenmiştir.

4.2.3.4. Potansiyel

Uygulanacak potansiyelin seçilmesi amacıyla, RFN, LMT ve ZNS çözeltileri optimum koşullar altında sırasıyla 12,5 kV, 15 kV ve 17,5 kV potansiyellerle üçer kez analiz edilmiştir. Analiz süresi ve analiz sonucu elde edilen piklerin morfolojileri değerlendirilerek optimum çalışma potansiyeli belirlenmiştir.

4.2.4. Validasyon çalışmaları

Geliştirilen KE yönteminin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, sağlamlık, spesifiklik ve kararlılık parametreleri incelenmiştir.

Validasyon hesaplamalarında alan oranları (AO) ($AO = \text{Alan}_{\text{madde}}/\text{Göç zamanı}_{\text{madde}}$) kullanılmıştır.

4.2.4.1. Doğrusallık

Analit derişimleri ile elde edilen sinyaller arasında doğrusal ilişkinin incelenmesi için RFN, LMT ve ZNS'nin $2,4 \times 10^{-5}$ M- 2×10^{-8} M aralığında 11 farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Bu derişimler RFN için $2,05 \times 10^{-8}$ M, $4,1 \times 10^{-8}$ M, $8,2 \times 10^{-8}$ M, $1,64 \times 10^{-7}$ M, $3,28 \times 10^{-7}$ M, $6,56 \times 10^{-7}$ M, $1,31 \times 10^{-6}$ M, $2,62 \times 10^{-6}$ M, $5,24 \times 10^{-6}$ M, $1,05 \times 10^{-5}$ M ve $2,1 \times 10^{-5}$ M, LMT için $1,9 \times 10^{-8}$ M, $3,8 \times 10^{-8}$ M, $7,62 \times 10^{-8}$ M, $1,52 \times 10^{-7}$ M, $3,05 \times 10^{-7}$ M, $6,09 \times 10^{-7}$ M, $1,22 \times 10^{-6}$ M, $2,44 \times 10^{-6}$ M, $4,88 \times 10^{-6}$ M, $9,76 \times 10^{-6}$ M ve $1,96 \times 10^{-5}$ M ve ZNS için $2,29 \times 10^{-8}$ M, $4,59 \times 10^{-8}$ M, $9,18 \times 10^{-8}$ M, $1,84 \times 10^{-7}$ M, $3,67 \times 10^{-7}$ M, $7,34 \times 10^{-7}$ M, $1,47 \times 10^{-6}$ M, $2,94 \times 10^{-6}$ M, $5,88 \times 10^{-6}$ M, $1,18 \times 10^{-5}$ M ve $2,35 \times 10^{-5}$ M şeklindedir. Bu 11 çözelti optimum koşullar altında analiz edilmiştir.

Yöntemin doğrusal olduğu aralığın belirlenmesinin ardından yöntemin kalibrasyonu için; $6,56 \times 10^{-7}$ M, $1,31 \times 10^{-6}$ M, $2,63 \times 10^{-6}$ M, $5,25 \times 10^{-6}$ M, $1,05 \times 10^{-5}$ M, $2,1 \times 10^{-5}$ M derişimlerinde altı adet RFN çözeltisi; $6,09 \times 10^{-7}$ M, $1,22 \times 10^{-6}$ M, $2,44 \times 10^{-6}$ M, $4,88 \times 10^{-6}$ M, $9,75 \times 10^{-6}$ M, $1,95 \times 10^{-5}$ M derişimlerinde altı adet LMT çözeltisi; $7,34 \times 10^{-7}$ M, $1,47 \times 10^{-6}$ M, $2,94 \times 10^{-6}$ M, $5,88 \times 10^{-6}$ M, $1,18 \times 10^{-5}$ M, $2,35 \times 10^{-5}$ M derişimlerinde altı adet ZNS çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiler gün içi ve günler arası olmak üzere 3'er kez analiz edilmiştir.

4.2.4.2. Kesinlik

Yöntemin tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla; RFN, LMT ve ZNS'nin son derişimleri sırasıyla $4,2 \times 10^{-6}$ M, $3,94 \times 10^{-6}$ M, $4,7 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde hazırlanan çözeltilerinin gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar analizi gerçekleştirilmiştir.

4.2.4.3. Doğruluk

Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi amacıyla; $5,46 \times 10^{-6}$ M, $4,62 \times 10^{-6}$ M ve $3,78 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde RFN, $5,12 \times 10^{-6}$ M, $4,33 \times 10^{-6}$ M ve $3,55 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde LMT ve $6,11 \times 10^{-6}$ M, $5,17 \times 10^{-6}$ M ve $4,23 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde ZNS çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar kez analizi edilmiştir.

4.2.4.4. Duyarluluk

Yöntemin duyarlılık çalışmaları, sinyal/gürültü (S/N) oranları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalarda S/N oranı LOD değeri için 3,3, LOQ değeri için 10 olarak kabul edilmiştir.

4.2.4.5. Kararlılık

Yöntemin kararlılık çalışması için son derişimleri sırasıyla $5,25 \times 10^{-6}$ M, $4,88 \times 10^{-6}$ M ve $5,88 \times 10^{-6}$ M olan RFN, LMT ve ZNS çözeltileri kullanılmıştır. Bu amaçla taze hazırlanmış çözelti ile $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiş ve alüminyum folyo ile sarılı halde -18°C 'de 1 ay bekletilmiş çözeltileri ile 3'er analiz gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

4.2.4.6. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlık çalışması için son derişimleri sırasıyla $5,25 \times 10^{-6}$ M, $4,88 \times 10^{-6}$ M ve $5,88 \times 10^{-6}$ M olan RFN, LMT ve ZNS çözeltileri optimum koşullarda küçük değışiklikler yapılarak analiz edilmiştir. Değıştirilen koşullar anyonik yüzey aktif madde derişimi, organik çözücü oranı ve pH olarak belirlenmiş ve her koşulda 3'er analiz yapılmıştır. Analiz sonuçları optimum koşullarla istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

4.2.4.7. Spesifiklik

Yöntemin spesifik olduğunu göstermek amacı ile yöntemin uygulanacağı farmasötik dozaj formlarının matriks ortamları analiz edilmiştir.

4.3. YPSK Yöntemi

4.3.1. Cihaz ile ilgili koşullar

YPSK yönteminde deteksiyon, DAD detektörü ile gerçekleştirilmiştir. Ayrım için C18 kolon (4.6×100.0 mm, $3.5 \mu\text{m}$ iç çap) kullanılmıştır. Cihazın açılış yıkamasında, kolondan öncelikle %50 asetonitril, devamında ise %40 asetonitril geçişi sağlanmıştır. Her analizden önce kolon 20 dakika boyunca hareketli faz ile yıkanmıştır. Kapanış için, kolon 20 dakika süreyle %40 asetonitril ile yıkanmıştır.

4.3.2. Hareketli fazın hazırlanışı

Hareketli fazın hazırlanmasında, 13.61 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tartılmış ve distile su ile 2 L hacmine ulaşacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Tam bir homojenlik sağlamak için bu çözelti 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur. Stok çözeltisinden seyreltmeler, su ile yapılmış ve pH ayarı fosforik asit (H_3PO_4) eklenerek gerçekleştirilmiştir. Oluşan karışım, vakum altında filtre edilip asetronitril ile birlikte hareketli faz olarak kullanılmıştır. Hazırlanan hareketli faz, analize başlamadan önce 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir.

4.3.3. Optimizasyon çalışmaları

Yöntemde kullanılacak olan RFN, LMT ve ZNS çözeltileri, KE yöntemi için hazırlanmış stok çözeltilerinden gereken oranda yapılan seyreltmelerle elde edilmiştir. YPSK yönteminin optimizasyonu kapsamında, dalga boyu, hareketli fazdaki tampon derişimi, hareketli fazın pH değeri, hareketli fazdaki organik çözücü oranı ve akış hızı gibi kritik parametreler incelenmiştir.

4.3.3.1. Dalga boyu

Yöntemde optimum uyarma ve yayma dalga boylarının belirlenmesi amacıyla, 220-310 nm, 220-360 nm, 300-360 nm, 250-310 nm ve 250-360 nm aralığında RFN, LMT ve ZNS'nin %18 asetronitril ve %82 50 mM fosfat tamponu (pH 4,0) içeren hareketli fazla 1,0 mL/dk akış hızı altında üçer analiz yapılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen piklerin morfolojisi ve pik alanları değerlendirilerek optimum dalga boyu seçilmiştir.

4.3.3.2. Hareketli fazdaki tampon derişimi

Hareketli fazdaki optimum tampon derişiminin belirlenmesi için, %18 asetronitril ve 30 mM, 40 mM ile 50 mM konsantrasyonlarda üç farklı fosfat tamponu (pH=4,0) içeren mobil faz hazırlanmıştır. Bu çalışma tamponları ile RFN, LMT ve ZNS'nin 1,0 mL/dk akış hızında üçer analiz yapılmıştır. Analiz süresi ve analiz sonucu elde edilen piklerin morfolojileri değerlendirilerek optimum fosfat tamponu derişimi belirlenmiştir.

4.3.3.3. Organik çözücü oranı

Hareketli fazdaki organik çözücü oranını belirlemek için 50 mM fosfat tamponu (pH=4,0) ile %18, %20 ve %25 (h/h) asetronitril içeren çeşitli hareketli fazlar hazırlanmıştır. Bu

hareketli fazlarla RFN, LMT ve ZNS 1,0 mL/dk akış hızında üçer kez analiz edilmiştir. Analiz süresi ve analiz sonucu elde edilen piklerin morfolojileri değerlendirilerek uygun organik çözücü oranı belirlenmiştir.

4.3.3.4. pH

Yöntemde ayırım için en uygun pH'ı belirlemek için 50 mM fosfat tamponu pH'ları sırasıyla 4,0, 4,5 ve 5,0 olarak ayarlanmıştır. Bu koşullarda RFN, LMT ve ZNS 1,0 mL/dk akış hızı altında üçer defa analiz edilmiştir. Analiz süresi ve analiz sonucu elde edilen piklerin morfolojileri değerlendirilerek optimum pH'ı belirlenmiştir.

4.3.3.5. Akış hızı

Yöntemin optimum akış hızını belirlemek amacıyla %18 asetonitril ve 50 mM fosfat tamponu (pH 4,0) içeren hareketli faz kullanılmıştır. Bu mobil faz ile 0,80, 1,0 ve 1,2 mL/dk akış hızlarında RFN, LMT ve ZNS üçer kez analiz edilmiştir. Analiz süresi ve analiz sonucu elde edilen piklerin morfolojileri değerlendirilerek optimum akış hızı belirlenmiştir.

4.3.4. Validasyon

Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, sağlamlık, spesifiklik ve kararlılık parametreleri incelenmiştir. Validasyon hesaplamaları için alan oranları (AO) ($AO = \frac{Alan_{madde}}{Göç\ zamanı_{madde}}$) kullanılmıştır.

4.3.4.1. Doğrusallık

Analit konsantrasyonu ile elde edilen sinyallerin doğrusal ilişki gösterip göstermediğinin incelenmesi amacıyla $1,9 \times 10^{-5}$ M- $1,9 \times 10^{-8}$ M aralığında 11 farklı derişimde RFN, LMT ve ZNS çözeltisi hazırlanmıştır. RFN için $2,05 \times 10^{-8}$ M, $4,1 \times 10^{-8}$ M, $8,2 \times 10^{-8}$ M, $1,64 \times 10^{-7}$ M, $3,28 \times 10^{-7}$ M, $6,56 \times 10^{-7}$ M, $1,31 \times 10^{-6}$ M, $2,62 \times 10^{-6}$ M, $5,24 \times 10^{-6}$ M, $1,05 \times 10^{-5}$ M ve $2,1 \times 10^{-5}$ M, LMT için $1,9 \times 10^{-8}$ M, $3,8 \times 10^{-8}$ M, $7,62 \times 10^{-8}$ M, $1,52 \times 10^{-7}$ M, $3,05 \times 10^{-7}$ M, $6,09 \times 10^{-7}$ M, $1,22 \times 10^{-6}$ M, $2,44 \times 10^{-6}$ M, $4,88 \times 10^{-6}$ M, $9,76 \times 10^{-6}$ M ve $1,96 \times 10^{-5}$ M ve ZNS için $2,29 \times 10^{-8}$ M, $4,59 \times 10^{-8}$ M, $9,18 \times 10^{-8}$ M, $1,84 \times 10^{-7}$ M, $3,67 \times 10^{-7}$ M, $7,34 \times 10^{-7}$ M, $1,47 \times 10^{-6}$ M, $2,94 \times 10^{-6}$ M, $5,88 \times 10^{-6}$ M, $1,18 \times 10^{-5}$ M ve $2,35 \times 10^{-5}$ M derişiminde hazırlanan çözeltiler optimum koşullar altında analiz edilmiştir.

Çalışılabilecek doğrusal aralığın belirlenmesinin ardından RFN'nin $6,72 \times 10^{-7}$ - $3,36 \times 10^{-6}$ M, LMT'nin $3,15 \times 10^{-7}$ - $1,58 \times 10^{-6}$ M ve ZNS'nin $7,25 \times 10^{-7}$ - $3,76 \times 10^{-6}$ M derişimleri arasında 6 farklı çözeltisi 3'er set olmak üzere hazırlanmış ve bu çözeltilerin gün içi ve günler arası analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.3.4.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliğinin gösterilmesi için sırasıyla $2,1 \times 10^{-6}$ M ve $1,97 \times 10^{-6}$ M ve $2,35 \times 10^{-6}$ M derişimde RFN, LMT ve ZNS çözeltileri hazırlanmış, bu çözeltilerin gün içi ve günler arası olacak şekilde analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.3.4.3. Doğruluk

Yöntemin doğruluğunun belirlenebilmesi amacıyla son derişimleri $1,89 \times 10^{-6}$, $2,31 \times 10^{-6}$, $2,73 \times 10^{-6}$ M RFN ve $1,77 \times 10^{-6}$, $2,17 \times 10^{-6}$, $2,56 \times 10^{-6}$ M LMT ve $2,12 \times 10^{-6}$, $2,59 \times 10^{-6}$, $3,06 \times 10^{-6}$ M ZNS olacak şekilde 3 set RFN, LMT ve ZNS çözeltileri hazırlanmıştır. Her set gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar kez analiz edilmiştir.

4.3.4.4. Duyarlılık

Yöntemin duyarlılık çalışmaları, sinyal/gürültü (S/N) oranları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalarda S/N oranı LOD değeri için 3,3, LOQ değeri için 10 olarak kabul edilmiştir.

4.3.4.5. Kararlılık

Kararlılık parametresinin incelenmesi amacıyla sırasıyla $2,1 \times 10^{-6}$ M, $1,97 \times 10^{-6}$ M ve $2,35 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde RFN, LMT ve ZNS çözeltileri kullanılmıştır. Taze hazırlanmış, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiş ve alüminyum folyo ile sarılı halde -18°C 'de 1 ay bekletilmiş çözeltiler 3'er kez analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

4.3.4.6. Sağlamlık

Sağlamlık parametresinin incelenmesi amacıyla son derişimleri sırasıyla $2,1 \times 10^{-6}$ M, $1,97 \times 10^{-6}$ M ve $2,35 \times 10^{-6}$ M olan RFN, LMT ve ZNS çözeltileri optimum koşullarda küçük değişiklikler yapılarak analiz edilmiştir. Değiştirilen koşullar tampon derişimi, hareketli fazın organik çözücü oranı ve pH olarak belirlenmiş ve her koşulda 3'er analiz yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar optimum koşullarla istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

4.3.4.7. Spesifiklik

Yöntemin spesifik olduğunu göstermek amacı ile yöntemin uygulanacağı farmasötik dozaj formlarının matris ortamları analiz edilmiştir.

4.4. Yöntemlerin Uygulanması

Farmasötik dozaj formlarının hazırlanması için, 400 mg RFN, 25 mg LMT ve 100 mg ZNS içeren ticari tabletler temin edilmiştir. Her bir ilaca ait on tablet tartılmış ve ortalama tablet ağırlığı belirlenmiştir. Daha sonra tabletler öğütülerek toz haline getirilmiş ve tozların ortalama ağırlığı ölçülmüştür. Tozlar metanol içinde çözülmüş ve karışım 10 dakika boyunca vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bunu takiben, çözeltiler 10 dakika süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiş ve ardından 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant, kalibrasyon aralığına uygun şekilde her iki yöntem için de uygun seyreltme çözeltisiyle seyreltilmiştir. Son olarak, analiz öncesinde çözeltiler 0,45 µm'lik bir filtre ile süzölmüştür.

5. BULGULAR VE YORUM

5.1. KE Yöntemi

5.1.1. Yöntemin Optimizasyonu

KE yöntemi ile yapılan analizlerde DAD detektör kullanılarak deteksiyon sağlanmıştır. Literatür incelendiğinde, RFN, LMT ve ZNS'nin miktar tayini için 210-325 nm arasında değişen çeşitli dalga boylarının tercih edildiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, DAD detektörde 200-325 nm aralığında elde edilen pikler değerlendirilmiş ve üç maddenin analizinde 210 nm dalga boyunun en uygun seçenek olduğuna karar verilmiştir.

Ayrım için iç çapı 75 µm olan, 40 cm efektif ve 48,5 cm toplam uzunlukta bir kapiler tercih edilmiştir. Çalışmalar boyunca kapiler sıcaklığı 25°C'de tutulmuştur. Örneklerin sisteme girişi, 10 saniye boyunca 50 mbar basınç altında gerçekleştirilmiştir. Yöntem optimize edilip valide edildikten sonra, geliştirilen yöntem RFN, LMT ve ZNS içeren farmasötik dozaj formlarına uygulanmıştır.

RFN, LMT ve ZNS'nin KE yöntemi ile miktar tayininde, her bir analit için en uygun analiz koşulları araştırılmıştır. Bu amaçla, analizde kullanılacak çalışma tamponunun bileşimi ve derişimi, pH değeri, organik çözücü oranı ve uygulanan potansiyel gibi parametreler incelenerek, en uygun ayırım koşulları belirlenmiştir. Yöntemin optimizasyonu sırasında RFN, LMT ve ZNS'nin her biri için son derişimi $4,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde çözeltiler hazırlanmıştır.

RFN, LMT ve ZNS'nin eş zamanlı analizini sağlamak için, öncelikle pH 3-9 aralığında çeşitli tampon çözeltileri kullanılmıştır. pH 3,0, 6,0, 7,0 ve 8,0 için fosfat tamponları, pH 4,0 ve 5,0 için asetat tamponu ve pH 9,0 için borat tamponu hazırlanmıştır.

Asidik koşullarda ZNS piki tespit edilirken, nötr koşullarda üç maddenin de sinyal vermediği görülmüştür. Bazik koşullarda ise yalnızca LMT pikine rastlanmıştır. Bu durum karşısında, çalışma tamponuna anyonik bir sürfaktan olan SDS eklenmesiyle üç maddenin piklerinin gözlemlenebileceği öngörülmüştür. Elektrozmotik akışın ayırımı destekleyeceği düşünülerek, bazik ortamda borat tamponuna SDS ilave edilmiştir; ancak bu durumda RFN piki gözlemlenememiştir. Antiepileptiklerin KE yöntemi ile analizlerine ait literatürdeki çalışmalar incelendiğinde hem asidik hem bazik tuz içeren

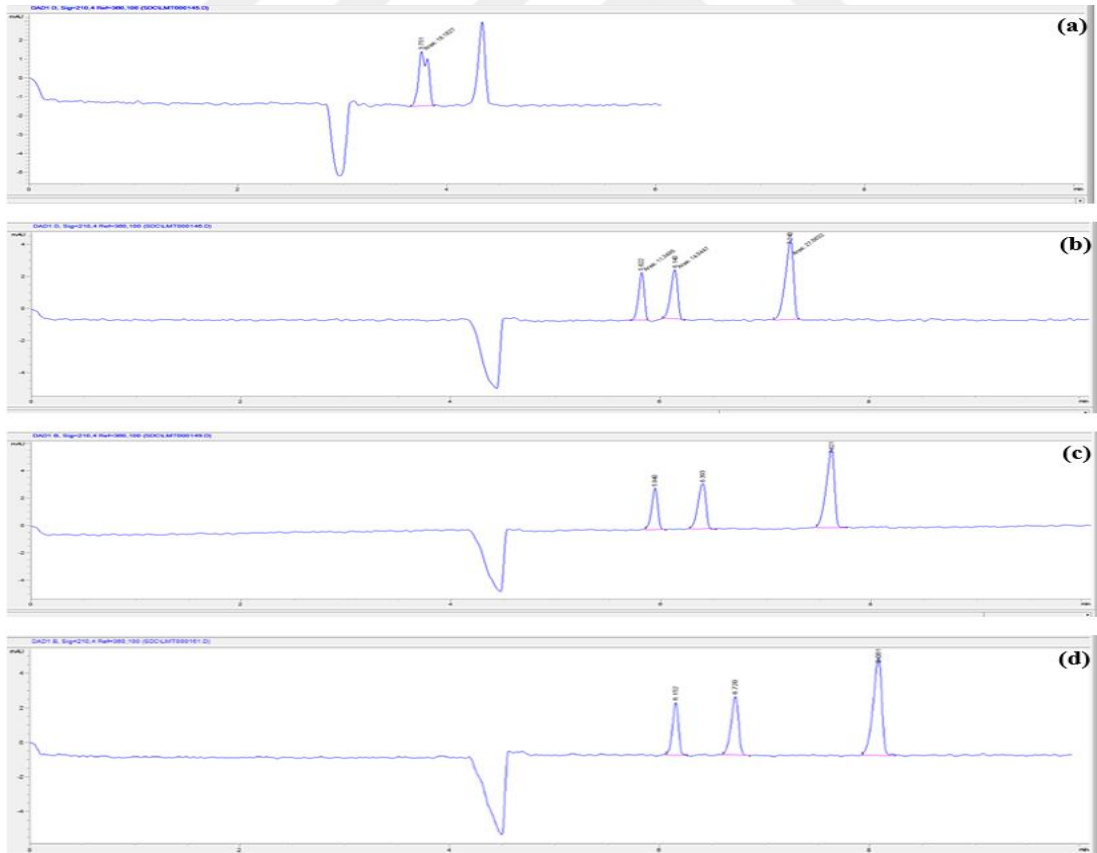
tampon kullanımının ayrımı iyileştirildiği görülmüştür (Kuldvee ve Thormann, 2001). Literatürdeki bu bilgiler ışığında anyonik sürfektan (SDS) içeren bir borat-fosfat karışımı tamponu hazırlanmış ve üç maddenin de piki gözlenmiştir. Ön denemeler sonucu ayırım sağlanmış ve çalışma bu temele dayandırılmıştır.

5.1.1.1. Tampon bileşimi ve derişimi

Tampon bileşimi ve derişimini belirlemek için sırasıyla 25, 30, 35 ve 40 mM SDS içeren 6 mM borat- 10 mM fosfat tamponu (pH 9,00) hazırlanmıştır. 10^{-6} M derişimindeki RFN, LMT, ZNS çözeltilerinin 15 kV potansiyel uygulanarak 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.1'de sunulan elektroferogramlar incelendiğinde SDS derişimi arttıkça ayırımda iyileşme olduğu gözlenmiştir. Ancak artan SDS derişimi akımın yükselmesine sebep olduğu için optimum SDS derişimi 35 mM olarak belirlenmiştir.

Şekil 5.1

Çalışma tamponunda anyonik sürfaktan derişimi incelemesi

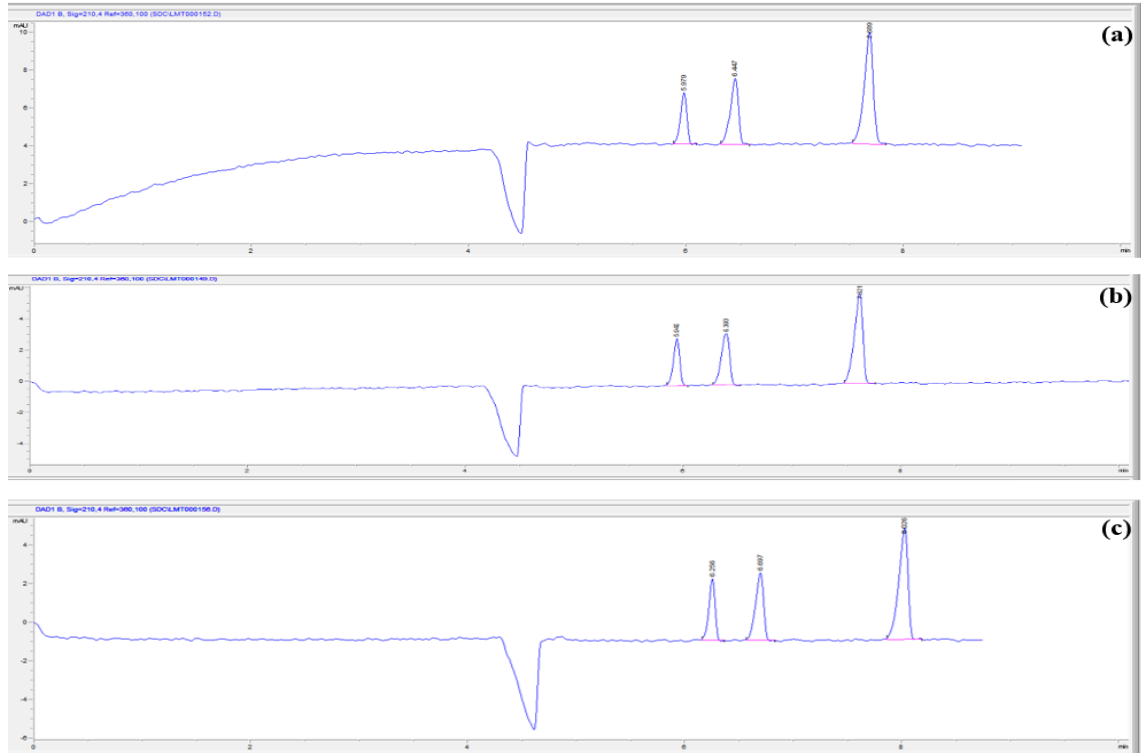


(a: 25 mM, b: 30 mM, c: 35 mM, d: 40 mM)

Tampon derişimini belirlemek amacıyla 35 mM SDS içeren 3 mM, 6 mM ve 9 mM derişimde 3 ayrı borat- 10 mM fosfat tamponu (pH 9,00) hazırlanmış ve 10^{-6} M düzeyindeki RFN, LMT ve ZNS çözeltilerinin 15 kV potansiyel uygulanarak 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.2'de verilen bu analizler sonucunda elde edilen elektroferogramlar incelendiğinde borat derişimi arttıkça baseline ve pik morfolojisinin düzeldiği ancak analiz süresinin uzadığı görülmüştür. Bu nedenle borat derişiminin 6 mM olmasına karar verilmiştir.

Şekil 5.2

Çalışma tamponunda borat derişimi incelemesi

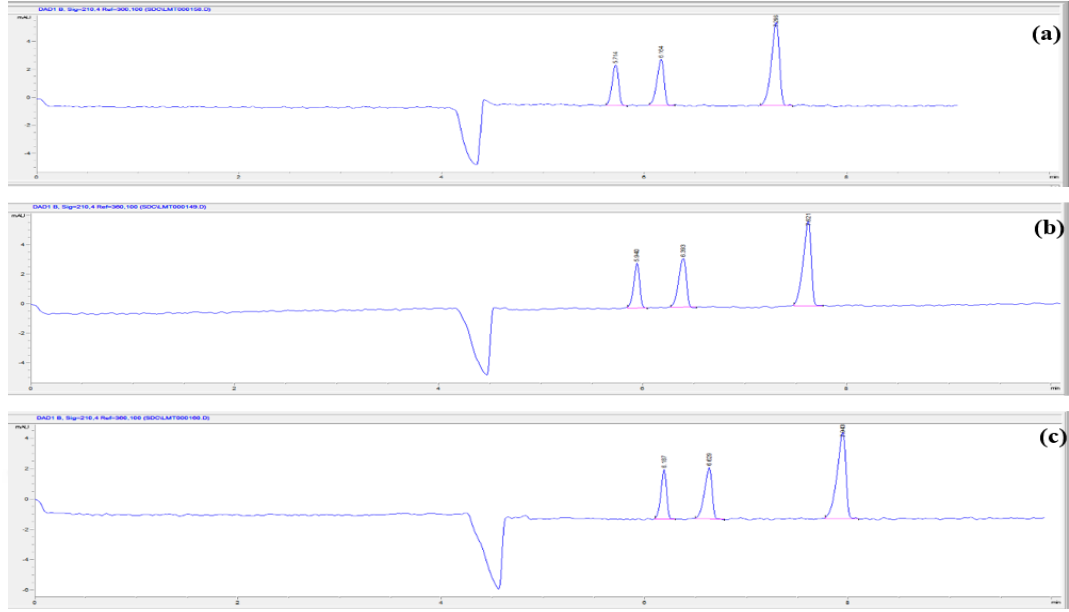


(a: 3 mM, b: 6 mM, c: 9 mM)

Fosfat derişimini belirlemek amacıyla 35 mM SDS içeren 6 mM borat- 5 mM, 10 mM ve 15 mM derişimde 3 ayrı fosfat tamponu (pH 9,00) hazırlanmıştır. 10^{-6} M düzeyindeki RFN, LMT ve ZNS çözeltilerinin 15 kV potansiyel uygulanarak 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.3'te bu analizler sonucunda elde edilen elektroferogramlar incelendiğinde pik morfolojileri açısından en uygun fosfat derişiminin 10 mM olduğu görülmüş ve optimizasyon çalışmalarının bu derişimde devam etmesine karar verilmiştir.

Şekil 5.3

Çalışma tamponunda fosfat derişimi incelemesi



(a:5 mM, b:10 mM, c:5 mM)

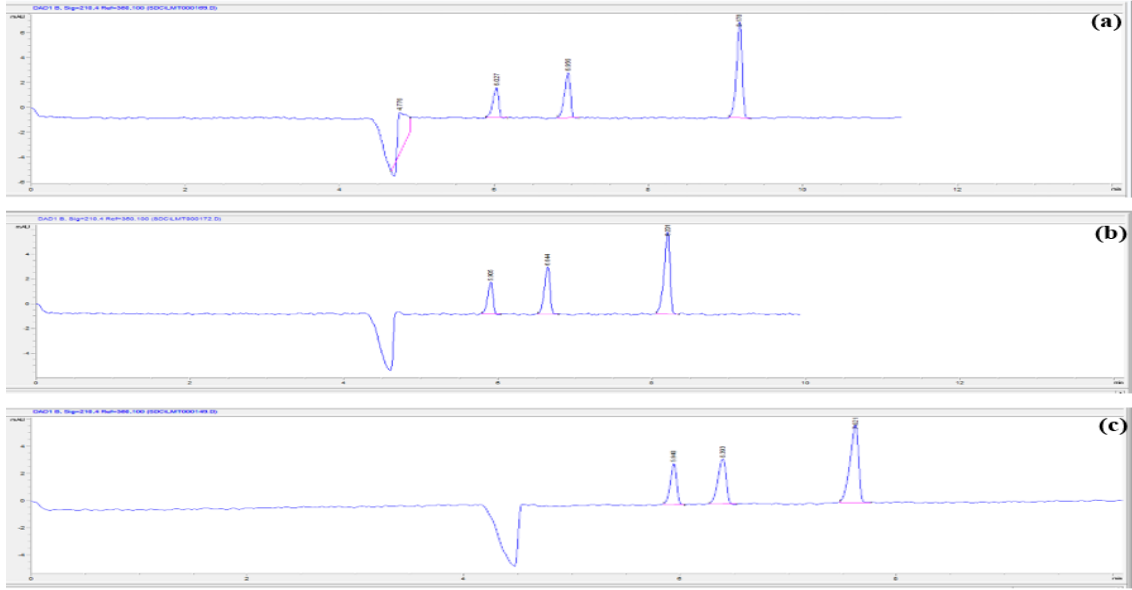
Tampon derişimindeki genel artışla beraber göç zamanları da artmıştır. Bununla birlikte akım da yükselmiştir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde optimizasyon çalışmalarına 35 mM SDS içeren 6 mM borat- 10 mM fosfat tamponu kullanarak devam edilmesi uygun görülmüştür.

5.1.1.2. pH

Çalışma tamponu pH'ının, RFN, LMT ve ZNS'nin elektroforetik davranışlarını nasıl etkilediğini gözlemlemek için pH'ı 8,50, 9,00 ve 9,50 olan 35 mM SDS içeren 6 mM borat- 10 mM fosfat tamponu hazırlanmıştır. Farklı pH'larda hazırlanan bu tamponlar kullanılarak RFN, LMT ve ZNS 3'er defa analiz edilmiştir. Şekil 5.4'te bu analizler sonucu elde edilen elektroferogramlar gösterilmektedir.

Şekil 5.4

Çalışma tamponu pH incelemesi



(a:8,50, b:9,00, c:9,50)

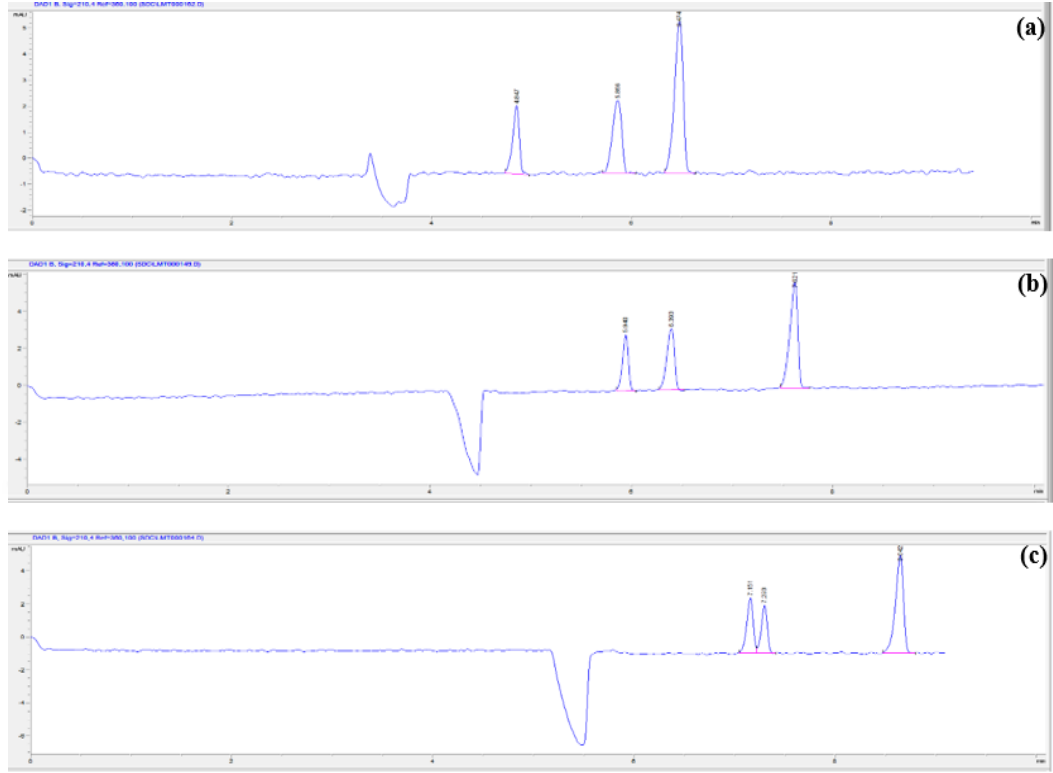
pH'ı 8,50 olan çalışma tamponunun kullanıldığı analizlerde analiz süresinin uzadığı gözlemlenmiştir. pH 9,50'de ise LMT ve ZNS'nin pik alanında azalma meydana geldiği görülmektedir. Bu veriler ışığında pH'ı 9,00 olarak ayarlanan çalışma tamponunun kullanılmasına karar verilmiştir.

5.1.1.3. Organik çözücü

Çalışma tamponuna eklenen organik çözücünün ayırma katkısını gözlemlemek için %, %5, %10 (h/h) oranında IPA içeren 35 mM SDS içeren 6 mM borat-10 mM fosfat tamponu (pH 9,00) hazırlanmıştır. RFN, LMT ve ZNS çözeltileri 15 kV potansiyel uygulanarak 3'er defa analiz edilmiştir. Şekil 5.5'te bu analizler sonucu elde edilen elektroferogramlar gösterilmektedir.

Şekil 5.5

Çalışma tamponunda organik çözücü oranı incelemesi



(a: 0, b:5, c:10)

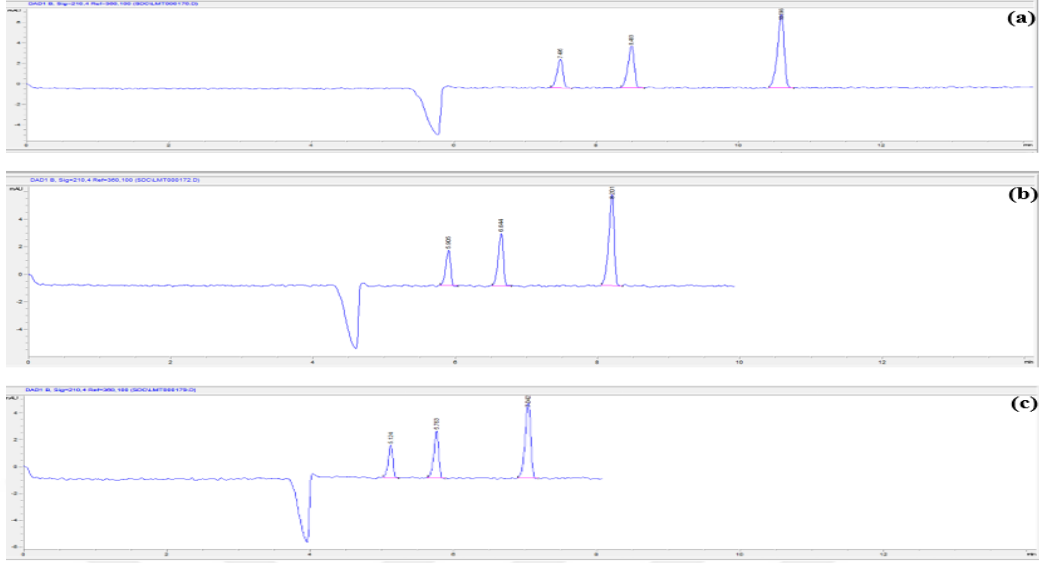
Çalışma tamponundaki organik çözücü miktarının artışı ile pik morfolojisinde iyileşme meydana gelmiş, ancak ayırım olumsuz etkilenmiştir. En düşük düzeyde organik çözücü bulunması ile pik morfolojisinde iyileşme meydana geldiği ve Rs değeri kabul edilebilir sınırdı kaldığı için; %5 (h/h) oranında organik çözücü kullanılmasına karar verilmiştir.

5.1.1.4. Uygulanan potansiyel

Analiz sırasında uygulanacak potansiyelin belirlenmesi amacıyla RFN, LMT ve ZNS çözeltileri 35 mM SDS içeren 6 mM borat- 10 mM fosfat tamponu (pH 9,00) ile 12,5 kV, 15 kV ve 17,5 kV potansiyel uygulanarak 3'er defa analiz edilmiştir. Şekil 5.6'da bu analizler sonucu elde edilen elektroferogramlar gösterilmektedir.

Şekil 5.6

Uygulanan potansiyelin incelemesi



(a:12,5 kV, b:15 kV, c:17,5 kV)

KE yönteminde, mümkün olan en yüksek potansiyelin uygulanması, ayrımların en kısa sürede gerçekleşmesini sağlar. Bu çalışmada da potansiyel arttıkça analiz sürelerinin kısaldığı gözlemlenmiştir. Ancak, yüksek potansiyelin neden olabileceği Joule ısınması sorunlarını önlemek amacıyla, çalışma 15,0 kV potansiyelde yürütülmeye karar verilmiştir.

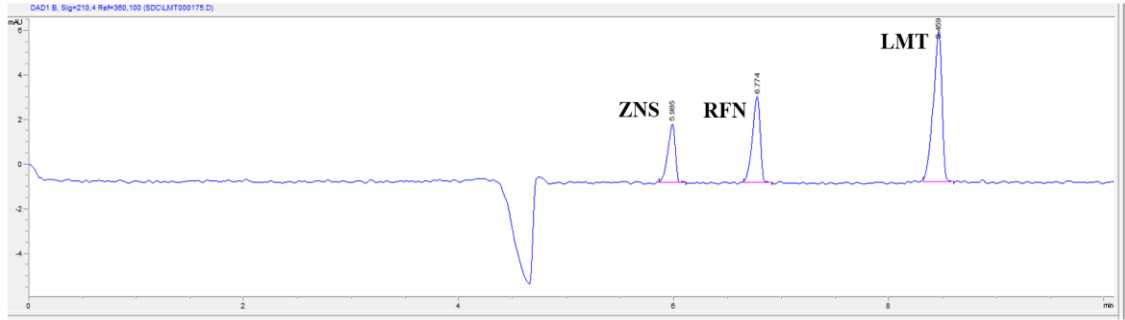
5.1.1.5. İç standart

İncelenen parametreler sonucunda RFN, LMT ve ZNS 'nin 35 mM SDS içeren 6 mM borat- 10 mM fosfat tamponu %5 IPA (pH 9,00) ve 15,0 kV potansiyel uygulanarak analiz edilmesi sonucu optimum koşulların sağlandığı görülmüştür. Deneyin en uygun koşulları belirlendikten sonra, yöntemin güvenilirliğini artırmak amacıyla bir iç standart (IS) araştırılması yapılmıştır. İncelenen ilaçlar (lakoza mit, almotriptan, eletriptan, frovatriptan, telmisartan, benidipin, granisetron ve zofenopril) içinde göç zamanı ve pik morfolojisi bakımından uygun bir aday tespit edilememiştir. Bu sebeple, çalışmada IS kullanılmaması yönünde karar alınmıştır.

Optimum koşullar altında analiz edilen RFN, LMT ve ZNS'ye ait elektroferogram Şekil 5.7'de sunulmuştur.

Şekil 5.7

Optimum koşullar altında ZNS, RFN ve LMT'ye ait elektroferogram



Optimum koşullar uygulandığında ZNS, RNF ve LMT'nin göç zamanı sırasıyla 5,99 dk, 6,77 dk ve 8,46 dk olarak belirlenmiştir.

5.1.2. Validasyon

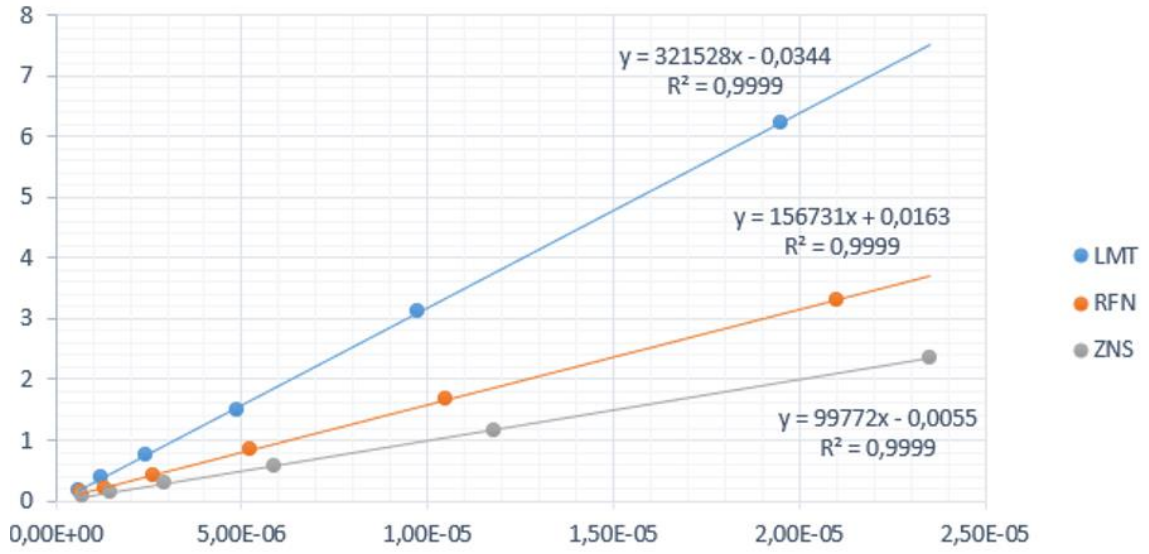
Optimum koşulların belirlenmesinin ardından geliştirilen yöntemin geçerli olduğunu göstermek için yöntemin doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık, spesifiklik ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. Hesaplamalarda AO değerlerinden yararlanılmıştır. Ek olarak sistem uygunluk parametrelerinden tabaka sayısı (N), Rs ve asimetri faktörü (As) hesaplanmıştır.

5.1.2.1. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallık çalışmaları kapsamında; sırasıyla $2,05 \times 10^{-8}$ M- $2,1 \times 10^{-5}$ M, $1,9 \times 10^{-8}$ - $1,96 \times 10^{-5}$ M, $2,29 \times 10^{-8}$ - $2,35 \times 10^{-5}$ M derişim aralıklarında 11'er farklı RFN, LMT ve ZNS çözeltisi hazırlanmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerin sonuçları incelendiğinde RFN için yöntemin $6,56 \times 10^{-7}$ - $2,1 \times 10^{-5}$ M aralığında doğrusal olduğu belirlenmiş ve yüksek korelasyon katsayısına sahip ($r=0,9999$) bir doğru ($y = 156731x + 0,0163$) elde edilmiştir. LMT için yöntemin $6,09 \times 10^{-7}$ - $1,95 \times 10^{-5}$ M aralığında doğrusal olduğu belirlenmiş ve yüksek korelasyon katsayısına sahip ($r=0,9999$) bir doğru ($y = 321528x - 0,0344$) elde edilmiştir. ZNS için yöntemin $7,34 \times 10^{-7}$ - $2,35 \times 10^{-5}$ M aralığında doğrusal olduğu belirlenmiş ve yüksek korelasyon katsayısına sahip ($r=0,9999$) bir doğru ($y = 99772x - 0,0055$) elde edilmiştir. Şekil 5.8'de elde edilen bu doğrular sunulmuştur.

Şekil 5.8

KE yönteminde RFN, LMT ve ZNS'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi



Çalışılabilecek doğrusal aralığın belirlenmesinin ardından RFN'nin $6,56 \times 10^{-7}$ - $2,1 \times 10^{-5}$ M, LMT'nin $6,09 \times 10^{-7}$ - $1,95 \times 10^{-5}$ M ve ZNS'nin $7,34 \times 10^{-7}$ - $2,35 \times 10^{-5}$ M derişimleri arasında 6 farklı çözeltisi 3'er set olmak üzere hazırlanmış ve bu çözeltilerin gün içi ve günler arası analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına ait istatistiksel değerlendirmeler Tablo 5.1, 5.2 ve 5.3'de sunulmuştur.

Tablo 5.1

RFN'nin KE yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	155904	155891	155838	155878
b	0,0148	0,01499	0,01508	0,01496
r	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Tablo 5.2. LMT'nin KE yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	309202	310814	307326	309114
b	0,0033	-0,0035	0,0088	0,0028
r	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Tablo 5.3

ZNS'nin KE yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	99453	98758	99534	99248
b	-0,0044	-0,0019	-0,0047	-0,0037
r	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

İstatistiksel değerlendirmeler incelendiğinde gün içi ve günler arası yapılan çalışmalarda kesim noktalarının sıfıra oldukça yakın olduğu ve yüksek korelasyon katsayısına sahip doğrular elde edildiği görülmektedir.

5.1.2.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliğinin gösterilmesi için sırasıyla $4,2 \times 10^{-6}$ M ve $3,94 \times 10^{-6}$ M ve $4,7 \times 10^{-6}$ M derişimde RFN, LMT ve ZNS çözeltileri hazırlanmış, bu çözeltilerin gün içi ve günler arası olacak şekilde analizleri gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerin sonuçları Tablo 5.4, 5.5 ve 5.6'da sunulmuştur.

Tablo 5.4*RFN'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	0,715	0,713	0,714	0,714
ss	0,008	0,006	0,007	0,007
%BSS	1,056	0,897	0,923	0,912
GA (%95)	±0,037	±0,032	±0,0323	±0,047

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Tablo 5.5*LMT'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	1,163	1,160	1,165	1,163
ss	0,006	0,007	0,006	0,006
%BSS	0,509	0,610	0,508	0,545
GA (%95)	±0,029	±0,035	±0,029	±0,047

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Tablo 5.6*ZNS'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	0,552	0,553	0,549	0,551
ss	0,008	0,006	0,004	0,006
%BSS	1,411	1,151	0,716	1,113
GA (%95)	±0,039	±0,031	±0,019	±0,045

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

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

5.1.2.3. Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluk çalışmaları için $3,78 \times 10^{-6}$, $4,62 \times 10^{-6}$, $5,46 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde RFN zeltisi, $3,55 \times 10^{-6}$, $4,33 \times 10^{-6}$, $5,12 \times 10^{-6}$ M derişim düzeylerinde LMT zeltisi ve $4,23 \times 10^{-6}$, $5,17 \times 10^{-6}$, $6,11 \times 10^{-6}$ M derişim düzeylerinde ZNS zeltisinin gün içi ve günler arası 6'şar analizi gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerin sonuçları Tablo 5.7, 5.8 ve 5.9'da sunulmuştur.



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

I. gün (n=6)	Eklenen (M)	$3,78 \times 10^{-6}$	$4,62 \times 10^{-6}$	$5,46 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$3,89 \times 10^{-6} \pm 1,92 \times 10^{-8}$	$4,66 \times 10^{-6} \pm 3,38 \times 10^{-8}$	$5,71 \times 10^{-6} \pm 1,88 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	103,11	100,78	104,59
	% BH	2,91	0,87	4,58
	% BSS	0,49	0,73	0,33
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$3,78 \times 10^{-6}$	$4,62 \times 10^{-6}$	$5,46 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$3,91 \times 10^{-6} \pm 1,97 \times 10^{-8}$	$4,67 \times 10^{-6} \pm 3,79 \times 10^{-8}$	$5,7 \times 10^{-6} \pm 1,14 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	103,12	100,87	104,31
	% BH	3,44	1,08	4,4
	% BSS	0,51	0,81	0,2
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$3,78 \times 10^{-6}$	$4,62 \times 10^{-6}$	$5,46 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$3,92 \times 10^{-6} \pm 1,92 \times 10^{-8}$	$4,65 \times 10^{-6} \pm 3,24 \times 10^{-8}$	$5,69 \times 10^{-6} \pm 9,97 \times 10^{-9}$
	% Geri Kazanım	103,09	100,55	104,13
	% BH	3,7	0,65	4,21
	% BSS	0,49	1,61	0,18
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$3,78 \times 10^{-6}$	$4,62 \times 10^{-6}$	$5,46 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$3,9 \times 10^{-6} \pm 1,82 \times 10^{-8}$	$4,65 \times 10^{-6} \pm 3,33 \times 10^{-8}$	$5,7 \times 10^{-6} \pm 1,68 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	103,11	100,73	104,34
	% BH	3,17	1,61	4,4
	% BSS	0,47	0,72	0,29
n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BH: Bağlı hata, BSS: Bağlı standart sapma				

Tablo 5.8*LMT'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri*

I. gün (n=6)	Eklenen (M)	$3,55 \times 10^{-6}$	$4,33 \times 10^{-6}$	$5,12 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$3,45 \times 10^{-6} \pm 1,74 \times 10^{-8}$	$4,3 \times 10^{-6} \pm 2,82 \times 10^{-9}$	$5,06 \times 10^{-6} \pm 5,33 \times 10^{-9}$
	% Geri Kazanım	97,17	99,29	98,83
	% BH	2,82	0,69	1,17
	% BSS	0,51	0,07	0,11
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$3,55 \times 10^{-6}$	$4,33 \times 10^{-6}$	$5,12 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$3,45 \times 10^{-6} \pm 1,62 \times 10^{-8}$	$4,3 \times 10^{-6} \pm 8,08 \times 10^{-9}$	$5,06 \times 10^{-6} \pm 1,18 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	97,25	99,29	98,83
	% BH	2,82	0,69	1,17
	% BSS	0,47	0,19	0,23
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$3,55 \times 10^{-6}$	$4,33 \times 10^{-6}$	$5,12 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$3,44 \times 10^{-6} \pm 1,79 \times 10^{-8}$	$4,3 \times 10^{-6} \pm 7,78 \times 10^{-9}$	$5,07 \times 10^{-6} \pm 1,19 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	97,15	99,29	98,84
	% BH	3,1	0,69	0,98
	% BSS	0,52	0,18	0,23
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$3,55 \times 10^{-6}$	$4,33 \times 10^{-6}$	$5,12 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$3,45 \times 10^{-6} \pm 1,62 \times 10^{-8}$	$4,3 \times 10^{-6} \pm 6,27 \times 10^{-9}$	$5,06 \times 10^{-6} \pm 9,44 \times 10^{-9}$
	% Geri Kazanım	97,19	100,73	98,83
	% BH	2,82	0,69	1,17
	% BSS	0,47	0,15	0,19
n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BH: Bağlı hata, BSS: Bağlı standart sapma				

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

I. gün (n=6)	Eklenen (M)	$4,23 \times 10^{-6}$	$5,17 \times 10^{-6}$	$6,11 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$4,43 \times 10^{-6} \pm 1,69 \times 10^{-8}$	$5,35 \times 10^{-6} \pm 3,82 \times 10^{-8}$	$6,33 \times 10^{-6} \pm 2,19 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	104,75	103,58	103,63
	% BH	4,73	3,48	3,6
	% BSS	0,38	0,71	0,35
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$4,23 \times 10^{-6}$	$5,17 \times 10^{-6}$	$6,11 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$4,42 \times 10^{-6} \pm 1,8 \times 10^{-8}$	$5,36 \times 10^{-6} \pm 2,8 \times 10^{-8}$	$6,34 \times 10^{-6} \pm 1,94 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	104,43	103,61	103,70
	% BH	4,49	3,68	3,8
	% BSS	0,41	0,52	0,31
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$4,23 \times 10^{-6}$	$5,17 \times 10^{-6}$	$6,11 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$4,43 \times 10^{-6} \pm 2,01 \times 10^{-8}$	$5,34 \times 10^{-6} \pm 2,54 \times 10^{-8}$	$6,34 \times 10^{-6} \pm 1,9 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	104,73	103,32	103,71
	% BH	4,73	3,29	3,8
	% BSS	0,45	0,48	0,3
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$4,23 \times 10^{-6}$	$5,17 \times 10^{-6}$	$6,11 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$4,43 \times 10^{-6} \pm 1,84 \times 10^{-8}$	$5,35 \times 10^{-6} \pm 3,0 \times 10^{-8}$	$6,34 \times 10^{-6} \pm 1,91 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	104,64	103,5	103,68
	% BH	4,73	3,48	3,8
	% BSS	0,42	0,56	0,31
n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma				

İstatistiksel değerlendirme sonuçları incelendiğinde, üç madde için de tüm derişimlerde %geri kazanım değerlerinin %97,15 ile %104,75 arasında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, hesaplanan %BSS değerlerinin %2'nin altında kaldığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, geliştirilen yöntemin analiz edilen maddeler için yüksek doğruluk ve kesinlik sağladığını ortaya koymaktadır.

5.1.2.4. Duyarluluk

Çalışmanın duyarlılığının belirlenmesi amacıyla yapılan hesaplamalarda S/N oranları kullanılmıştır. KE yönteminin tayin sınırı (LOQ) değerleri RFN, LMT ve ZNS için sırasıyla $2,06 \times 10^{-7}$ M (0,0523 µg /mL), $7,95 \times 10^{-8}$ M (0,023 µg /mL) ve $4,89 \times 10^{-7}$ M (0,116 µg /mL) olarak bulunmuştur. Gözlenebilme sınırı (LOD) değerleri ise RFN, LMT ve ZNS için sırasıyla $6,86 \times 10^{-8}$ M (0,016 µg/ml) $2,65 \times 10^{-8}$ M (0,007 µg/ml) ve $1,63 \times 10^{-7}$ M (0,035 µg/ml) olarak hesaplanmıştır.

5.1.2.5. Kararluluk

Yöntemin kararlılığının incelenmesi amacıyla taze hazırlanan RFN, LMT ve ZNS çözeltilerinin analizinden elde edilen sonuçlar -18°C’de karanlıkta 1 ay bekletilmiş ve +4°C’de karanlıkta 24 saat bekletilmiş RFN, LMT ve ZNS çözeltilerinin analizinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelere ait sonuçlar Tablo 5.10’da verilmiştir.

Tablo 5.10

KE yönteminde RFN, LMT ve ZNS’nin kararlılık verileri

		Taze çözelti	24 saat	1 ay
RFN	Ort (n=3)	0,835	0,823	0,822
	ss	0,36	0,44	0,08
	% BSS	0,36	0,45	0,08
	% Geri kazanım	99,50	98,01	97,97
LMT	Ort (n=3)	1,49	1,481	1,481
	ss	0,19	0,04	0,19
	% BSS	0,19	0,04	0,2
	% Geri kazanım	97,25	96,69	96,66
ZNS	Ort (n=3)	0,567	0,573	0,578
	Ss	0,95	0,29	0,23
	% BSS	0,97	0,3	0,23
	% Geri kazanım	97,65	98,67	99,42

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma

Hesaplanan %BSS ve %geri kazanım değerleri doğrultusunda, incelenen zaman diliminde RFN, LMT ve ZNS çözeltilerinin kararlı olduğu görülmektedir.

5.1.2.6. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığının incelenmesi için optimum koşullarda yapılan küçük değişikliklerin analizi nasıl etkilediği incelenmiştir. Yapılan analizlerin sonuçları optimum koşullarda yapılan analizlerin sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelere ait sonuçlar Tablo 5.11’de sunulmuştur.

Tablo 5.11

KE yönteminin sağlamlık verileri

	RFN					LMT		ZNS	
	Anyonik sürfaktan derişimi	Organik çözücü oranı	pH	Ort (n=3)	%BSS	Ort (n=3)	%BSS	Ort (n=3)	%BSS
Optimum Koşullar	35	%5	9,0	0,825	0,78	1,523	0,67	0,575	0,98
1. Koşul	34	%5	9,0	0,822	1,37	1,519	0,85	0,568	0,56
2. Koşul	36	%5	9,0	0,826	1,02	1,525	1,04	0,579	0,76
3. Koşul	35	%4	9,0	0,824	0,59	1,524	0,88	0,574	1,14
4. Koşul	35	%6	9,0	0,825	0,41	1,525	1,26	0,572	1,28
5. Koşul	35	%5	8,9	0,826	0,53	1,522	1,41	0,573	1,07
6. Koşul	35	%5	9,1	0,823	0,76	1,526	0,65	0,576	0,87

Hesaplanan %BSS değerlerinin %2’den küçük olması, yöntemin yapılan küçük değişikliklerden etkilenmediği ve sağlam bir yöntem olduğunu göstermektedir.

5.1.3. Sistem uygunluk testleri

KE yönteminin sistem uygunluğunu göstermek için hesaplanan parametreler ve kabul sınırları Tablo 5.12’de verilmiştir.

Tablo 5.12*KE yönteminde RFN, LMT ve ZNS'nin sistem uygunluk verileri*

	N			Rs		As		
	RFN	LMT	ZNS			RFN	LMT	ZNS
Hesaplanan Değer	330693	333743	329305	12,29	6,01	1,05	1,03	1,08
Kabul Sınırı	>2000			>1,5		0,95<As<1,2		
N: Tabaka sayısı, Rs: Ayrım gücü, As: Asimetri faktörü								

Yapılan hesaplamaların sonuçları incelendiğinde geliştirilen yöntem için hesaplanan sistem uygunluk parametrelerinin üç madde için de kabul sınırlarının içinde olduğu ve yöntemin sistem uygunluğunu sağladığı görülmektedir.

5.2. YPSK Yöntemi

Geliştirilen KE yöntemini karşılaştırmak için sıvı kromatografik bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde yapılan analizlerde deteksiyon için DAD detektör kullanılmıştır. KE yönteminde IS kullanılmadığı için bu yöntemde de kullanılmamıştır. Yöntemin optimize ve valide edilmesinin ardından geliştirilen yöntem RFN, LMT ve ZNS içeren farmasötik dozaj formlarına uygulanmıştır ve elde edilen sonuçlar KE yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

5.2.1. Optimizasyon

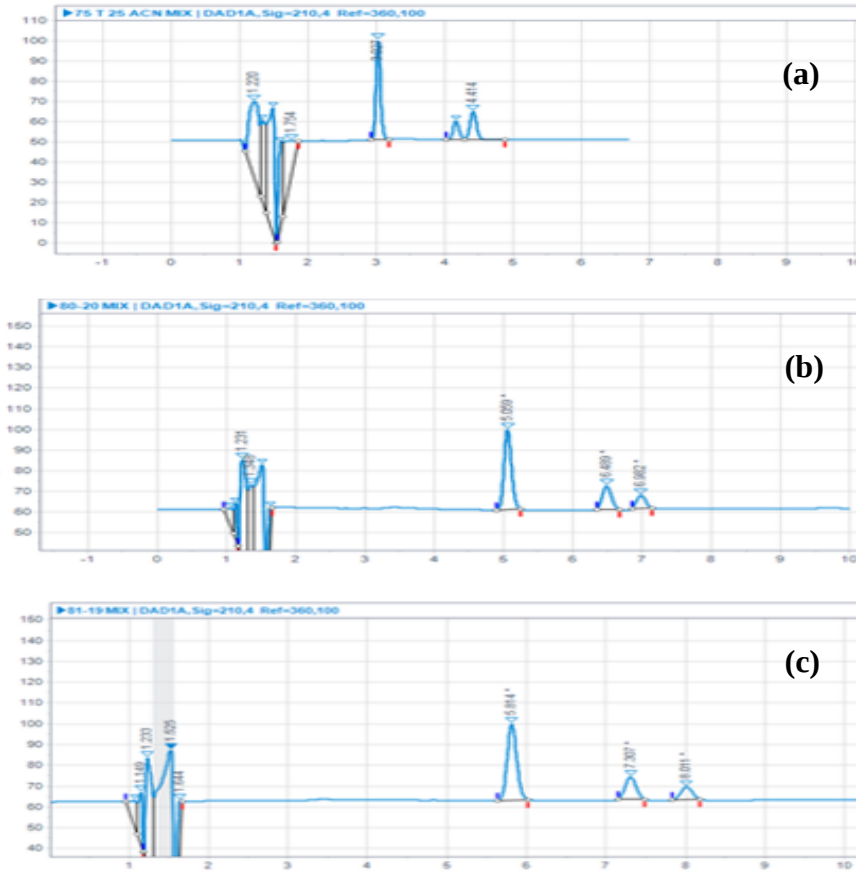
YPSK yönteminde optimizasyon çalışmaları kapsamında organik çözücü yüzdesi, hareketli fazdaki tampon derişimi, pH, akış hızı ve dalga boyu parametreleri incelenmiştir.

5.2.1.1. Organik çözücü yüzdesi

Hareketli fazdaki organik çözücü (asetonitril) oranına karar verebilmek için %15, %20 ve %18 oranlarında asetonitril içeren hareketli fazlar hazırlanmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dk'da sabit tutulmuştur. Bu analizlere ait kromatogramlar sırası ile Şekil 5.9'da gösterilmektedir.

Şekil 5.9

Hareketli fazdaki organik çözücü oranının incelenmesi



(a: %15, b: %20, c: %18)

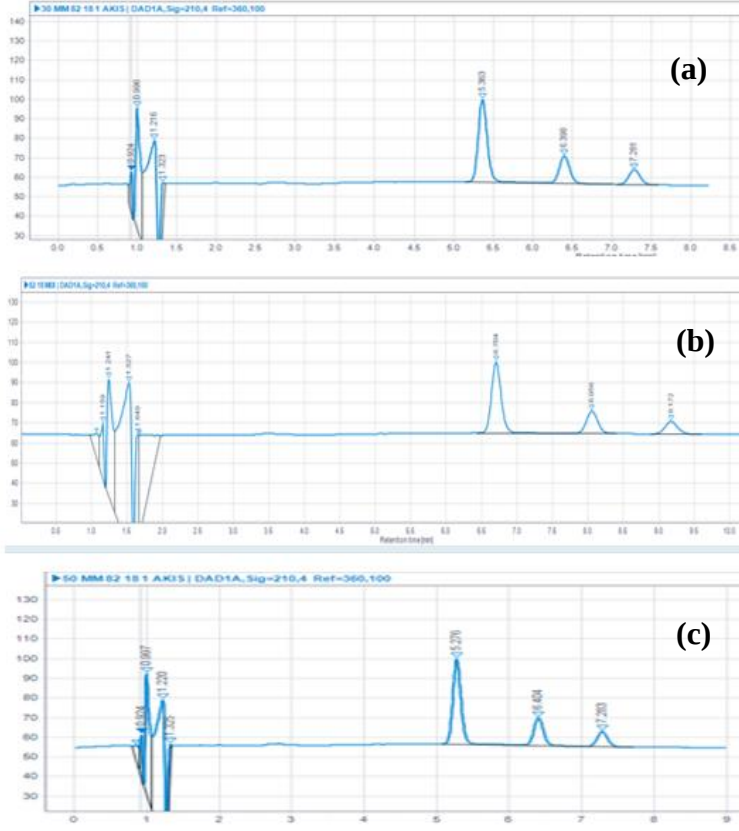
Elde edilen sonuçlar incelendiğinde organik çözücü oranının artmasının alıkonma zamanını arttırdığı ancak ayırımı iyileştirdiği gözlenmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu optimum organik çözücü oranının %18 olduğuna karar verilmiş ve çalışmalara bu oranda asetonitril ile devam edilmiştir.

5.2.1.2. Hareketli fazdaki tampon derişimi

Hareketli fazdaki tampon derişiminin belirlenmesi amacıyla %18 asetonitril ve %82 fosfat tamponu (pH 4,0) (30 mM, 40 mM ve 50 mM) içeren mobil faz hazırlanmış ve RFN, LMT ve ZNS bu koşullarda analiz edilmiştir. Akış hızı 1,0 mL/dk'da sabit tutulmuştur. Şekil 5.10'da bu analizler sonucu elde edilen kromatogramlar gösterilmektedir.

Şekil 5.10

Hareketli fazdaki tampon derişiminin incelenmesi



(a:30 mM, b:40 mM, c:50 mM)

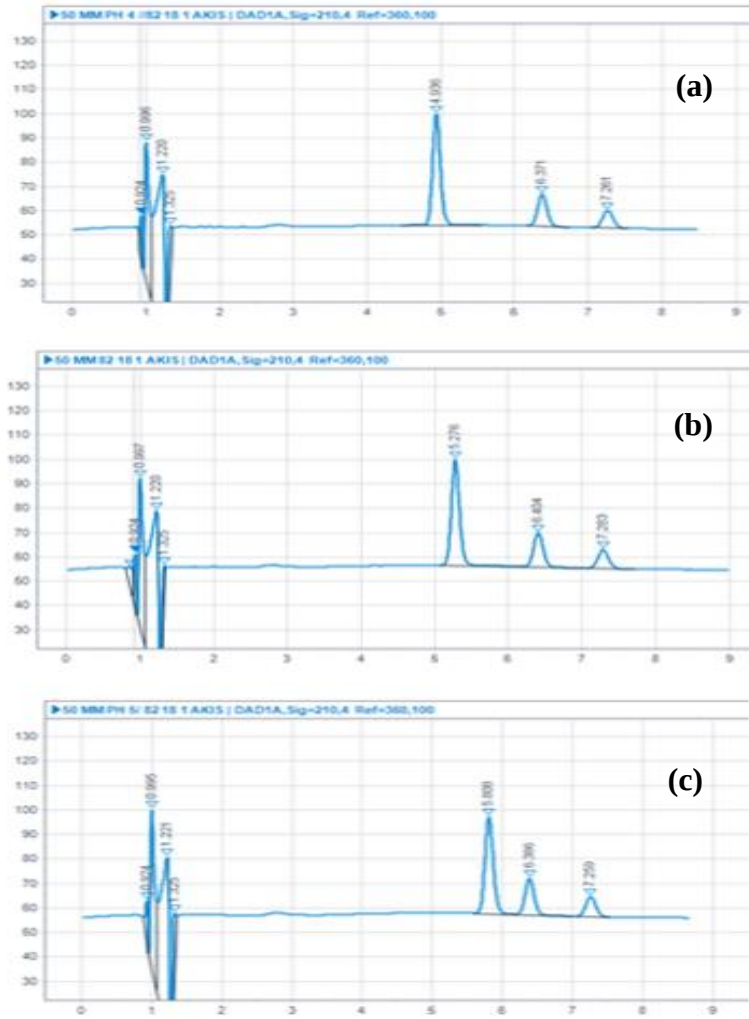
Tüm tampon derişimlerinin incelenmesi sonucunda düzgün pik morfolojileri ve uygun alıkonma zamanları elde edilmiştir. Hareketli fazdaki tampon derişimi arttıkça alıkonma zamanlarının bir miktar azaldığı gözlenmiştir. Tampon derişimini azaltmak ise pik morfolojisi veya ayırım üzerinde bir iyileşme sağlamamıştır. Bu nedenle, optimum derişim olarak en yüksek derişim olan 50 mM fosfat tamponu seçilmiştir.

5.2.1.3. pH

Tampon derişimi ve organik çözücü oranı belirlenen hareketli fazın pH'ının belirlenmesi amacıyla 50 mM fosfat tamponunun 4,0, 4,5 ve 5,0 pH düzeyinde 50 mM fosfat tamponu hazırlanmış ve analizler belirlenen bu pH'larda yapılmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dk'da sabit tutulmuştur. Bu analizlere ait kromatogramlar Şekil 5.11'de sunulmuştur.

Şekil 5.11

pH incelenmesi



(a:4,0, b:4:,5, c:5,0)

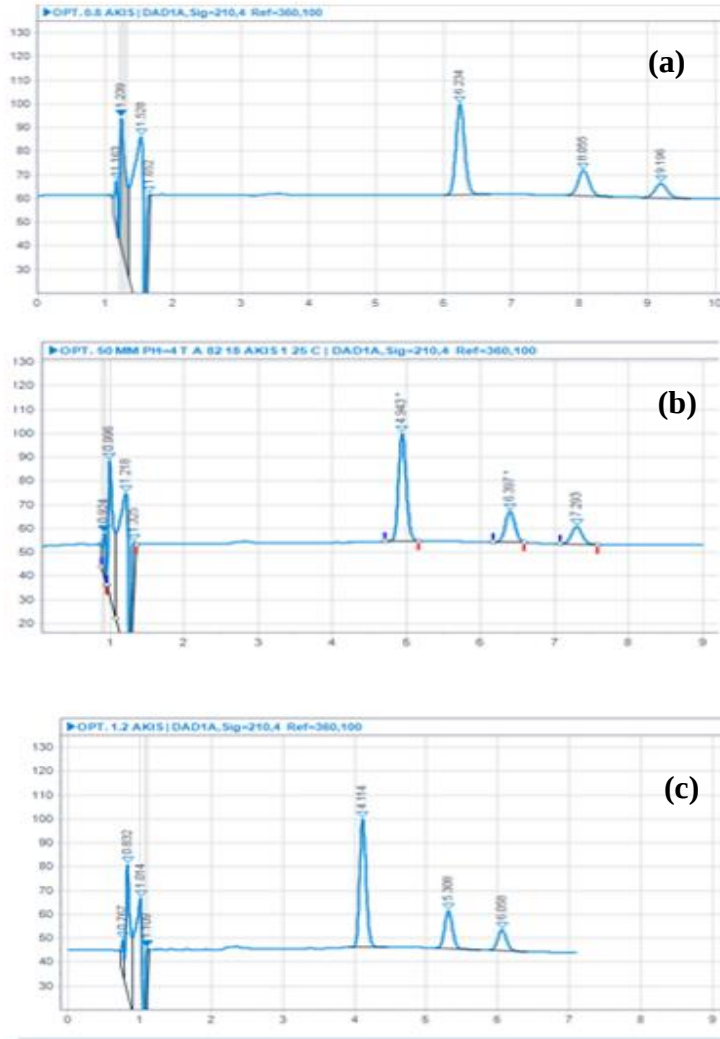
Analiz sonucu elde edilen veriler incelendiğinde pH artışının alıkonma zamanını önemli ölçüde etkilemediği gözlenmiştir. Ancak pH azaldıkça ayırimda iyileşme meydana geldiği gözlenmiştir. En iyi ayırımın gözlendiği pH olan pH 4,0 optimum pH olarak seçilmiştir.

5.2.1.4. Akış hızı

Hareketli fazın optimum akış hızını belirlemek için analizler 0,8, 1,0 ve 1,2 mL/dk akış hızlarında yapılmıştır. Bu analizlere ait kromatogramlar Şekil 5.12’de gösterilmektedir.

Şekil 5.12

Akış hızı incelenmesi



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

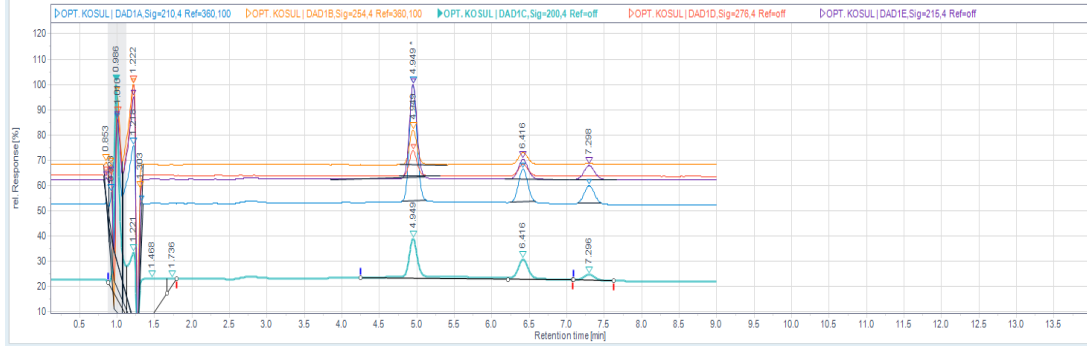
Tüm incelenen akış hızlarında RFN, LMT ve ZNS için uygun alıkonma zamanları ve düzgün pik morfolojilerinin elde edildiği görülmektedir. Toplam analiz süresi de dikkate alınarak, optimum akış hızı 1,0 mL/dk olarak seçilmiştir.

5.2.1.5. Dalga boyu

RFN, LMT ve ZNS'nin optimum uyarma ve yayma dalga boylarının belirlenmesi için farklı dalga boylarında analizler yapılmıştır. Çeşitli dalga boylarında gözlenen kromatogramlar Şekil 5.13'te verilmiştir.

Şekil 5.13

Dalga boyu incelenmesi

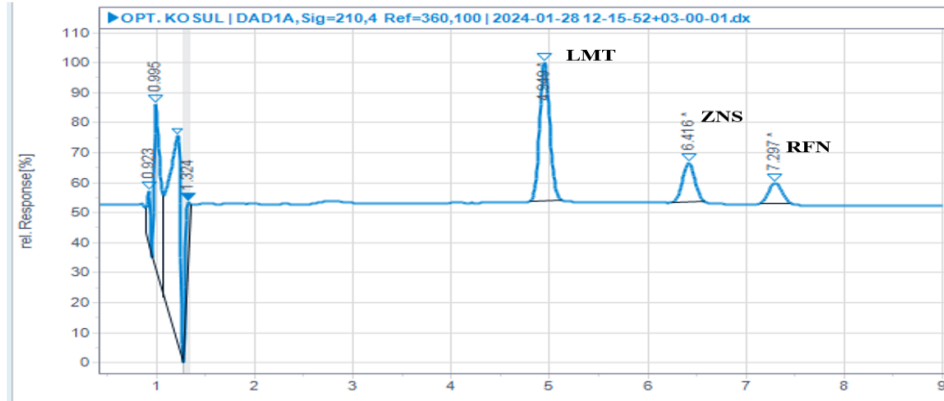


Üç maddenin de piklerinin görüldüğü, pik alanı ve pik morfolojisi bakımından optimum dalga boyu olarak 210 nm olarak seçilmiş ve çalışmada analizler bu dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Yapılan tüm analizler sonucu parametreler incelendiğinde YPSK yönteminin optimum çalışma koşulları; 210 nm dalga boyunda deteksiyon, %18 asetonitril ve %82 fosfat tamponu (50 mM; pH 4,0) içeren hareketli faz ve 1,0 mL/dk akış hızı olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda yapılan analiz sonucu elde edilen kromatogram Şekil 5.14'te sunulmaktadır.

Şekil 5.14

Optimum koşullar altında RFN, LMT ve ZNS'ye ait kromatogram



5.2.2. Validasyon

Optimum koşulların belirlenmesinin ardından geliştirilen yöntemin geçerli olduğunu göstermek için yöntemin doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık, spesifiklik

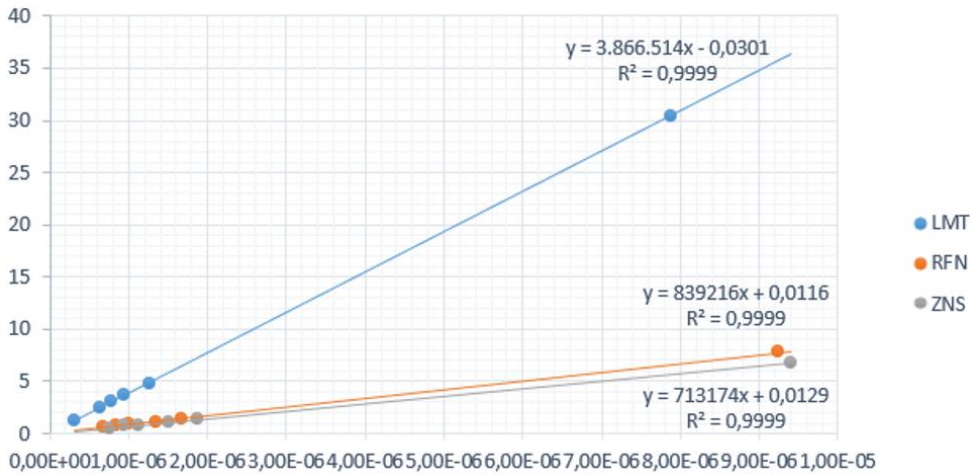
ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. Hesaplamalarda AO değerlerinden yararlanılmıştır. Ek olarak sistem uygunluk parametrelerinden tabaka sayısı (N), Rs ve asimetri faktörü (As) hesaplanmıştır.

5.2.2.1. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallık çalışmaları kapsamında; $2,05 \times 10^{-8}$ M- $4,2 \times 10^{-5}$ M aralığında 11 farklı RFN çözeltisi, $1,9 \times 10^{-8}$ - $1,95 \times 10^{-5}$ M aralığında 11 farklı LMT çözeltisi, $2,29 \times 10^{-8}$ - $2,35 \times 10^{-5}$ M aralığında 11 farklı ZNS çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; RFN için yöntemin doğrusal olduğu aralık $6,72 \times 10^{-7}$ - $3,36 \times 10^{-6}$ M olarak belirlenmiş ve yüksek korelasyon katsayısına sahip ($r=0,9999$) bir doğru ($y = 839216x + 0,0116$) elde edilmiştir. LMT için yöntemin doğrusal olduğu aralık $3,15 \times 10^{-7}$ - $7,88 \times 10^{-6}$ M olarak belirlenmiş ve yüksek korelasyon katsayısına sahip ($r=0,9999$) bir doğru ($y = 3866514x - 0,0301$) elde edilmiştir. ZNS için yöntemin doğrusal olduğu aralık $7,25 \times 10^{-7}$ - $9,40 \times 10^{-6}$ M olarak belirlenmiş ve yüksek korelasyon katsayısına sahip ($r=0,9999$) bir doğru ($y = 713174x - 0,0129$) elde edilmiştir. Şekil 5.15'te elde edilen bu doğrular sunulmuştur.

Şekil 5.15

YPSK yönteminde RFN, LMT ve ZNS'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi



Çalışılabilecek doğrusal aralığın belirlenmesinin ardından RFN'nin $6,72 \times 10^{-7}$ - $3,36 \times 10^{-6}$ M, LMT'nin $3,15 \times 10^{-7}$ - $1,58 \times 10^{-6}$ M ve ZNS'nin $7,25 \times 10^{-7}$ - $3,76 \times 10^{-6}$ M derişimleri arasında 6 farklı çözeltisi 3'er set olmak üzere hazırlanmış ve bu çözeltilerin gün içi ve

günler arası analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına ait istatistiksel değerlendirmeler Tablo 5.13, 5.14 ve 5.15'te sunulmuştur.

Tablo 5.13

RFN'nin YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	831385	833817	826894	830699
b	0,0296	0,0236	0,0325	0,0286
r	0,9999	0,9999	0,9997	0,9999

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Tablo 5.14

LMT'nin YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	3875650	3861422	3841067	3859380
b	-0,0355	-0,029	-0,0023	-0,0223
r	0,9999	0,9999	0,9994	0,9997

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Tablo 5.15

ZNS'nin YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	712724	710940	713270	712312
b	-0,0008	0,0012	-0,0034	-0,0010
r	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

İstatistiksel değerlendirmeler incelendiğinde gün içi ve günler arası yapılan çalışmalarda kesim noktalarının sıfıra oldukça yakın olduğu ve yüksek korelasyon katsayısına sahip doğrular elde edildiği görülmektedir.

5.2.2.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliğinin gösterilmesi için sırasıyla $2,1 \times 10^{-6}$ M ve $1,97 \times 10^{-6}$ M ve $2,35 \times 10^{-6}$ M derişimde RFN, LMT ve ZNS çözeltileri hazırlanmış, bu çözeltilerin gün içi ve günler arası olacak şekilde analizleri gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerin sonuçları Tablo 5.16, 5.17 ve 5.18’de sunulmuştur.

Tablo 5.16

RFN’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	2,18	2,175	2,177	2,178
ss	0,006	0,004	0,004	0,005
%BSS	0,262	0,177	0,202	0,219
GA (%95)	$\pm 0,028$	$\pm 0,019$	$\pm 0,022$	$\pm 0,035$

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Tablo 5.17

LMT’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	7,036	7,041	7,038	7,038
ss	0,002	0,007	0,004	0,005
%BSS	0,031	0,101	0,060	0,072
GA (%95)	$\pm 0,011$	$\pm 0,035$	$\pm 0,021$	$\pm 0,037$

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Tablo 5.18*ZNS'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	1,794	1,788	1,793	1,792
ss	0,006	0,003	0,007	0,006
%BSS	0,311	0,187	0,381	0,321
GA (%95)	±0,028	±0,017	±0,034	±0,042

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

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

5.2.2.3. Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluk çalışmaları için $1,89 \times 10^{-6}$, $2,31 \times 10^{-6}$, $2,73 \times 10^{-6}$ M derişim düzeylerinde RFN çözeltisi, $1,77 \times 10^{-6}$, $2,17 \times 10^{-6}$, $2,56 \times 10^{-6}$ M derişim düzeylerinde LMT çözeltisi ve $2,12 \times 10^{-6}$, $2,59 \times 10^{-6}$, $3,06 \times 10^{-6}$ M derişim düzeylerinde ZNS çözeltisinin gün içi ve günler arası 6'şar analizi gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerin sonuçları Tablo 5.19, 5.20 ve 5.21'de sunulmuştur.

Tablo 5.19*RFN'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri*

1. gün (n=6)	Eklenen (M)	$1,89 \times 10^{-6}$	$2,31 \times 10^{-6}$	$2,73 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$2,04 \times 10^{-6} \pm 2,71 \times 10^{-8}$	$2,44 \times 10^{-6} \pm 1,54 \times 10^{-9}$	$2,93 \times 10^{-6} \pm 8,48 \times 10^{-9}$
	% Geri Kazanım	107,71	105,57	107,19
	% BH	7,94	5,63	7,33
	% BSS	1,33	0,06	0,29

Tablo 5.19 (Devam) RFN'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri

II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$1,89 \times 10^{-6}$	$2,31 \times 10^{-6}$	$2,73 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$2,05 \times 10^{-6} \pm 2,09 \times 10^{-8}$	$2,44 \times 10^{-6} \pm 2,51 \times 10^{-9}$	$2,93 \times 10^{-6} \pm 8,37 \times 10^{-9}$
	% Geri Kazanım	108,6	105,69	107,22
	% BH	8,47	5,63	7,33
	% BSS	1,02	0,10	0,29
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$1,89 \times 10^{-6}$	$2,31 \times 10^{-6}$	$2,73 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$2,05 \times 10^{-6} \pm 1,6 \times 10^{-8}$	$2,44 \times 10^{-6} \pm 1,04 \times 10^{-9}$	$2,93 \times 10^{-6} \pm 6,01 \times 10^{-9}$
	% Geri Kazanım	108,23	105,71	107,18
	% BH	8,47	5,63	7,33
	% BSS	0,78	0,04	0,21
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$1,89 \times 10^{-6}$	$2,31 \times 10^{-6}$	$2,73 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$2,04 \times 10^{-7} \pm 2,17 \times 10^{-8}$	$2,44 \times 10^{-6} \pm 2,19 \times 10^{-9}$	$2,93 \times 10^{-6} \pm 7,25 \times 10^{-9}$
	% Geri Kazanım	108,18	105,66	107,20
	% BH	7,94	5,63	7,33
	% BSS	1,06	0,09	0,25
n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma				

Tablo 5.20*LMT'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri*

I. gün (n=6)	Eklenen (M)	$1,77 \times 10^{-6}$	$2,17 \times 10^{-6}$	$2,56 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$1,83 \times 10^{-6} \pm 8,71 \times 10^{-9}$	$2,31 \times 10^{-6} \pm 6,3 \times 10^{-9}$	$2,72 \times 10^{-6} \pm 2,36 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	103,43	106,51	106,38
	% BH	3,39	6,45	6,25
	% BSS	0,48	0,27	0,87

Tablo 5.20 (Devam) *LMT'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri*

II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$1,77 \times 10^{-6}$	$2,17 \times 10^{-6}$	$2,56 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$1,82 \times 10^{-6} \pm 1,52 \times 10^{-8}$	$2,31 \times 10^{-6} \pm 5,54 \times 10^{-9}$	$2,73 \times 10^{-6} \pm 3,31 \times 10^{-9}$
	% Geri Kazanım	102,75	105,69	106,62
	% BH	2,82	6,45	6,64
	% BSS	0,83	0,24	0,12
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$1,77 \times 10^{-6}$	$2,17 \times 10^{-6}$	$2,56 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$1,84 \times 10^{-6} \pm 5,42 \times 10^{-9}$	$2,31 \times 10^{-6} \pm 5,26 \times 10^{-9}$	$2,72 \times 10^{-6} \pm 2,31 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	103,64	106,53	106,16
	% BH	3,95	6,45	6,25
	% BSS	0,3	0,23	0,85
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$1,77 \times 10^{-6}$	$2,17 \times 10^{-6}$	$2,56 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$1,83 \times 10^{-6} \pm 1,21 \times 10^{-8}$	$2,31 \times 10^{-6} \pm 5,39 \times 10^{-9}$	$2,72 \times 10^{-6} \pm 1,87 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	103,27	106,51	106,38
	% BH	3,39	6,45	6,25
	% BSS	0,66	0,23	0,69
n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma				

Tablo 5.21*ZNS'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri*

I. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,12 \times 10^{-6}$	$2,59 \times 10^{-6}$	$3,06 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$2,3 \times 10^{-6} \pm 2,62 \times 10^{-8}$	$2,68 \times 10^{-6} \pm 4,33 \times 10^{-8}$	$3,3 \times 10^{-6} \pm 2,28 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	108,52	103,61	107,73
	% BH	4,72	3,47	7,84
	% BSS	1,14	1,61	0,69

Tablo 5.21 (Devam) ZNS'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri

II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,12 \times 10^{-6}$	$2,59 \times 10^{-6}$	$3,06 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$2,28 \times 10^{-6} \pm 2,83 \times 10^{-8}$	$2,68 \times 10^{-6} \pm 2,81 \times 10^{-8}$	$3,27 \times 10^{-6} \pm 1,09 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	108,00	103,36	106,96
	% BH	7,55	3,47	6,86
	% BSS	1,23	1,05	0,33
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,12 \times 10^{-6}$	$2,59 \times 10^{-6}$	$3,06 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$2,28 \times 10^{-6} \pm 2,44 \times 10^{-8}$	$2,67 \times 10^{-6} \pm 3,34 \times 10^{-8}$	$3,29 \times 10^{-6} \pm 1,18 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	107,81	102,94	107,57
	% BH	7,55	3,09	7,52
	% BSS	1,06	1,25	0,36
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$2,12 \times 10^{-6}$	$2,59 \times 10^{-6}$	$3,06 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort$\pm$ss)	$2,29 \times 10^{-6} \pm 2,56 \times 10^{-8}$	$2,68 \times 10^{-6} \pm 3,41 \times 10^{-8}$	$3,29 \times 10^{-6} \pm 1,84 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	108,11	103,3	107,42
	% BH	8,02	3,47	7,52
	% BSS	1,12	1,28	0,56
n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BH: Bağlı hata, BSS: Bağlı standart sapma				

İstatistiksel değerlendirmelerin sonuçları incelendiğinde üç maddenin tüm derişim düzeylerinde yapılan analizlerde %geri kazanım değerlerinin %102,75 ile %108,60 aralığında olduğu görülmüştür. Üç maddenin de tüm derişimleri için %BSS değerleri %2'nin altında hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda geliştirilen yöntemin yüksek doğruluk ve kesinliğe sahip olduğu görülmektedir.

5.2.2.4. Duyarlılık

Çalışmanın duyarlılık çalışmaları kapsamında yapılan hesaplamalarda S/N oranları kullanılmıştır. Yöntemin tayin sınırı (LOQ) değerleri RFN, LMT ve ZNS için sırasıyla $2,91 \times 10^{-8}$ M (0,007 µg/ml), $9,99 \times 10^{-9}$ M 0,003 µg/ml ve $4,83 \times 10^{-8}$ M (0,010 µg/ml) olarak bulunmuştur. LOD değerleri RFN için $9,69 \times 10^{-9}$ M (0,002 µg/ml), LMT için $3,33 \times 10^{-9}$ M (0,001 µg/ml) ve ZNS için $1,61 \times 10^{-8}$ M (0,003 µg/ml) olarak belirlenmiştir.

5.2.2.5. Kararlılık

Yöntemin kararlılık çalışmaları kapsamında RFN, LMT ve ZNS çözeltileri taze hazırlanmış, -18°C'de karanlıkta 1 ay bekletilmiş ve +4°C'de karanlıkta 24 saat

bekletilmiş şekilde analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarından elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve değerlendirme sonuçları Tablo 5.22’de verilmiştir.

Tablo 5.22

YPSK yönteminde RFN, LMT ve ZNS’nin kararlılık verileri

		Taze çözelti	24 saat	1 ay
RFN	Ort (n=3)	2,165	2,159	2,148
	ss	0,26	0,79	1,19
	% BSS	0,27	0,82	1,22
	% Geri kazanım	101,06	100,07	99,79
LMT	Ort (n=3)	7,049	7,025	7,002
	ss	0,73	1,47	0,43
	% BSS	0,68	1,52	0,51
	% Geri kazanım	100,17	101,87	99,89
ZNS	Ort (n=3)	1,722	1,718	1,702
	ss	0,59	1,37	0,62
	% BSS	0,63	1,47	0,63
	% Geri kazanım	100,37	101,89	99,89

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma

Hesaplanan %BSS ve %geri kazanım değerleri ile incelenen zaman aralığında RFN, LMT ve ZNS çözeltilerinin kararlı olduğu sonucuna varılmıştır.

5.2.2.6. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlık çalışmaları kapsamında optimum analiz koşullarında yapılan küçük değişikliklerin analiz sonuçlarını nasıl etkilendiği incelenmiştir. Optimum koşullarda küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilen analizlerin sonuçları optimum koşullar altında gerçekleştirilen analizlerin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlara ait istatistiksel değerlendirmeler Tablo 5.23’te sunulmuştur.

Tablo 5.23*YPSK yönteminin sağlamlık verileri*

	Tampon Derişimi (mM)	Organik Çözücü Oranı	Tampon pH'ı	RFN		LMT		ZNS	
				Ort (n=3)	%BSS	Ort (n=3)	%BSS	Ort (n=3)	%BSS
Optimum Koşullar	50	18	4,0	2,17	0,97	7,12	0,95	1,73	0,97
1. Koşul	51	18	4,0	2,14	1,23	7,13	1,27	1,73	0,36
2. Koşul	49	18	4,0	2,19	1,51	7,12	1,06	1,71	0,59
3. Koşul	50	17	4,0	2,13	0,93	7,16	0,37	1,75	1,21
4. Koşul	50	19	4,0	2,21	0,27	7,09	0,42	1,70	0,85
5. Koşul	50	18	3,9	2,18	0,45	7,11	0,71	1,72	1,07
6. Koşul	50	18	4,1	2,17	0,61	7,12	0,29	1,72	1,54

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma

Hesaplanan %BSS değerlerinin %2'nin altında olması yöntemde yapılan küçük değişikliklerin yöntemi etkilemediğini ve önerilen yöntemin sağlam bir yöntem olduğunu göstermektedir.

5.2.3. Sistem uygunluk testleri

Geliştirilen yöntemin sistem uygunluğu hesaplanan parametreler ve kabul sınırları ile Tablo 5.24'te verilmiştir.

Tablo 5.24*YPSK yönteminde RFN, LMT ve ZNS'nin sistem uygunluk verileri*

	N			Rs		As		
	RFN	LMT	ZNS			RFN	LMT	ZNS
Hesaplanan Değer	153428	247977	312856	6,89	3,6	1,06	1,04	1,04
Kabul Sınırı	>2000			>1,5		0,95<As<1,2		
N: Tabaka sayısı, Rs: Ayrım gücü, As: Asimetri faktörü								

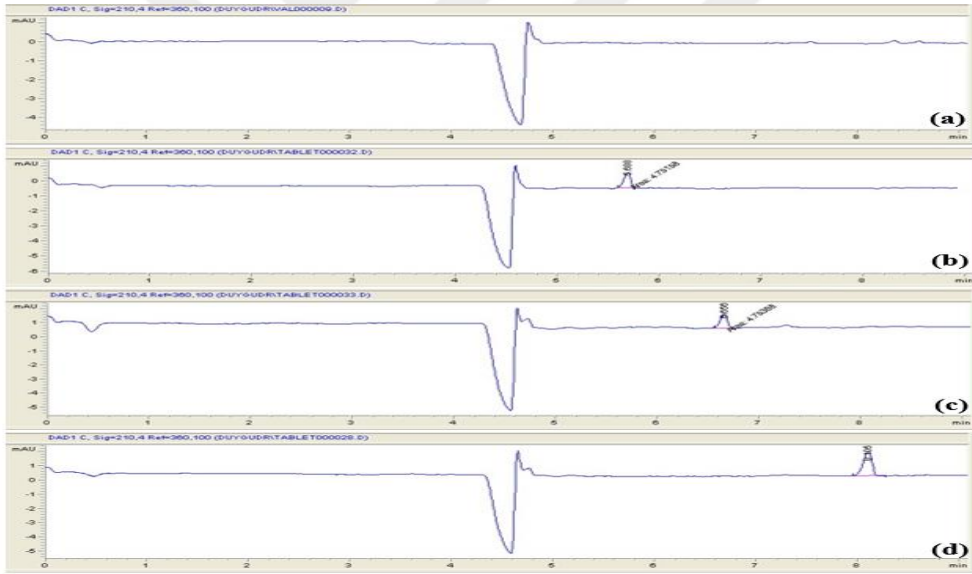
Sonuçlar değerlendirildiğinde geliştirilen yöntemin her üç madde için de kabul sınırları içinde yer aldığı ve sistem uygunluk testlerini geçtiği gösterilmektedir.

5.3. Yöntemlerin Uygulanması

RFN, LMT ve ZNS'nin farmasötik preparatlar içerisindeki tayini, sırasıyla 400 mg RFN içeren Inovelon® tabletleri, 25 mg LMT içeren Lamictal® tabletleri ve 100 mg ZNS içeren Epizonya® kapsülleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tabletlerden hazırlanan ve kalibrasyon aralığına uygun çözeltiler, optimum koşullarda altı kez analiz edilmiştir. Tabletlerin elektroferogramları ve kromatogramları sırasıyla Şekil 5.16 ve 5.17'de sunulmaktadır.

Şekil 5.16

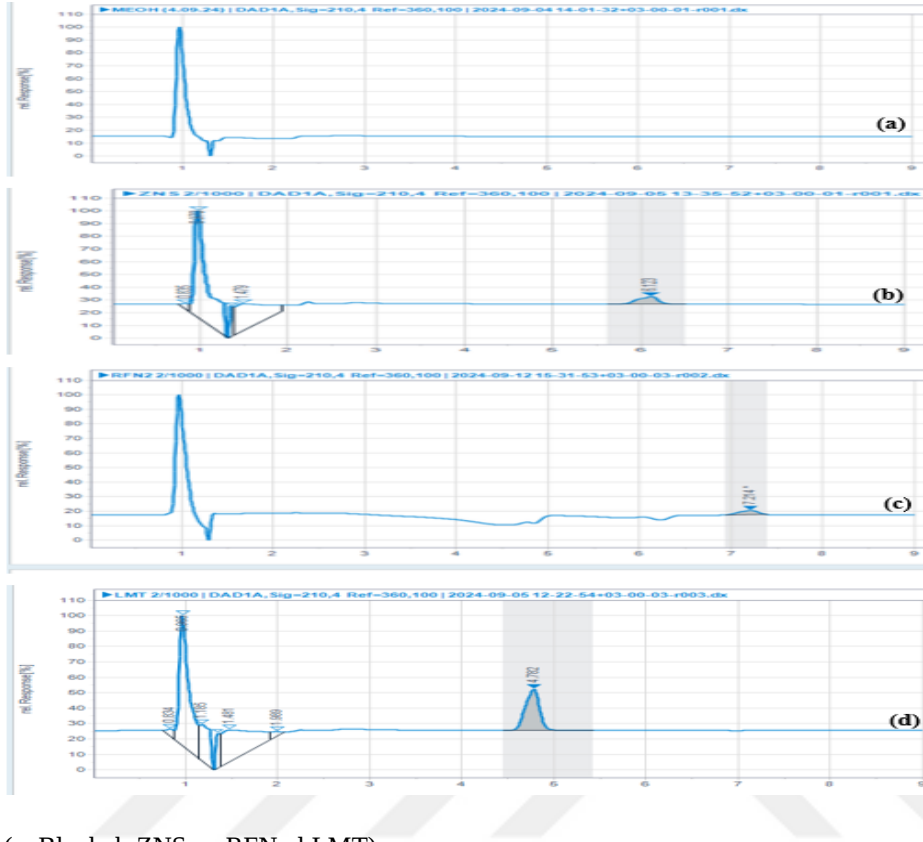
RFN, LMT, ZNS içeren farmasötik dozaj formlarına ait elektroferogram



(a: Blank, b:ZNS, c: RFN, d:LMT)

Şekil 5.17

RFN, LMT, ZNS içeren farmasötik dozaj formlarına ait kromatogram



(a: Blank, b:ZNS, c: RFN, d:LMT)

Tablet analizlerinde, geliştirilen yöntemlerde standart maddelerin pik özelliklerini gösteren elektroferogramlar ve kromatogramlar elde edilmiştir. RFN, LMT ve ZNS'nin tabletlerden kantitatif tayinine ilişkin her iki yöntemin istatistiksel değerlendirmeleri Tablo 5.25'te verilmiştir. Her iki yöntem için de tabletlerin konsantrasyon seviyelerine ait yüzdelik geri kazanım değerleri yaklaşık %100 olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemlerin RFN, LMT ve ZNS'nin tabletlerdeki kantitatif tayini için etkili bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Tablo 5.25

RFN, LMT, ZNS içeren farmasötik dozaj formlarının KE ve YPSK yöntemleri ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi

		KE	YPSK	F	p
RFN (400 mg)	Ort (n=6)	404,458 mg	405,268 mg	1,099 ($<5,05^a$)	0,920 ($>0,05$)
	ss	0,083	0,087		
	%BSS	0,083	0,086		
	% Geri kazanım	101,11%	101,32%		
LMT (25 mg)	Ort (n=6)	25,117 mg	25,144 mg	1,112 ($<5,05^a$)	0,910 ($>0,05$)
	ss	0,097	0,092		
	%BSS	0,089	0,082		
	% Geri kazanım	100,47%	100,58%		
ZNS (100 mg)	Ort (n=6)	101,824 mg	101,678 mg	1,111 ($<5,05^a$)	0,911 ($>0,05$)
	ss	0,037	0,039		
	%BSS	0,036	0,039		
	% Geri kazanım	101,82%	101,68%		

6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Bu çalışmada; RFN, LMT ve ZNS bileşiklerinin eş zamanlı miktar tayini amacıyla basit, hızlı ve duyarlı bir kapiler elektroforez (KE) yöntemi geliştirilmiştir. KE yönteminde, deteksiyon 210 nm dalga boyunda DAD ile gerçekleştirilmiş ve analiz, 75 µm iç çapa sahip 40 cm efektif (48,5 cm toplam) uzunluğundaki kapiler ile yapılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda, 35 mM sodyum dodesil sülfat (SDS), %5 izopropil alkol (IPA) içeren 6 mM borat ve 10 mM fosfat tamponu (pH 9,00) kullanılarak ve 15 kV potansiyel altında analiz edilmiştir. Yöntemde iç standart (IS) kullanılmamış olup, RFN, LMT ve ZNS'nin göç zamanları sırasıyla 6,77 dk, 8,46 dk ve 5,99 dk olarak elde edilmiştir. Yöntemin validasyonu, Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) tarafından belirlenen kriterlere uygun olarak doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık ve sağlamlık parametreleri ile gerçekleştirilmiştir. Sistem uygunluk parametreleri de hesaplanmıştır.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (YPSK) yönteminde, deteksiyon 210 nm dalga boyunda foto diyot dizisi detektörü ile sağlanmıştır. Ayrım için C18 kolon (4.6×100.0 mm, 3.5 µm iç çap) kullanılmış ve hareketli faz olarak 50 mM fosfat tamponu ile asetonitril (82:18, h/h) (pH 4.0) sistemi 1,0 mL/dk akış hızında uygulanmıştır. Bu yöntemde RFN, LMT ve ZNS'nin alıkonma zamanları sırasıyla 7,29 dk, 4,95 dk ve 6,41 dk olarak gözlenmiştir. Geliştirilen YPSK yönteminin geçerliliği de benzer parametreler ile incelenmiş ve sistem uygunluk parametreleri hesaplanmıştır.

Her iki yöntemin validasyon çalışmaları sonucunda RFN, LMT ve ZNS'nin uzun dönem boyunca kararlı oldukları bulunmuştur. Doğrusal aralıklar belirlendikten sonra yöntemlerin kesinlik ve doğrulukları ortaya konmuştur. Seçicilik açısından hem optimizasyon hem de validasyon aşamalarında DAD detektörünün farklı dalga boyları ile çalışabilme özelliğinden faydalanılmış ve girişim yapan herhangi bir sinyale rastlanmamıştır.

Sistem uygunluğunu göstermek amacıyla N, Rs, As gibi çeşitli parametreler belirlenmiş ve kabul edilen sınırlar içerisinde oldukları kanıtlanmıştır. RFN, LMT ve ZNS içeren farmasötik dozaj formları geliştirilen yöntemlerle analiz edilmiş olup, % geri kazanım değerleri yaklaşık %100 düzeyinde bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemlerin doğruluğu, farmasötik tabletler üzerinde başarılı bir şekilde uygulanarak gösterilmiş olup bu yöntemlerin karmaşık matrisler için uygun olduğu kanıtlanmıştır.

Her iki yöntemin de biyolojik örneklerle uygulanma potansiyelinin oldukça yüksek olduğu düşünülmektedir. Karmaşık biyolojik matrislerle ilgili zorlukların, bu yöntemlerin seçicilik ve duyarlılıklarından yararlanılarak etkili bir şekilde çözülebileceği öngörülmektedir. Gelecekteki çalışmalarda, geliştirilen yöntemlerin biyolojik sistemlerde kullanımını kolaylaştırmak için ek adaptasyonlar, optimizasyonlar ve biyoanalitik validasyon yapılacak; bu sayede farmakokinetik çalışmalar ve tedavi izleme gibi uygulamalara olanak sağlanacaktır.

Bu araştırmanın bulguları, farmasötik bilimlerde analitik tekniklerin geliştirilmesine katkı sağlamakla birlikte, biyolojik ve klinik alanlarda da kullanım olanaklarını genişletmek için bir temel oluşturmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abady, M. M., Jeong, J. S. ve Kwon, H. J. (2024). Simultaneous quantification of 11 antiepileptic drugs using limited isotope-labeled internal standards in LC-MS/MS: An accuracy assessment. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1240, 124143. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2024.124143>.
- Baker, D. R., ve Huang, X. (2020). Capillary Electrophoresis: Principles, Techniques, and Applications. *Springer Nature*.
- Baker, G. B. ve Furtado, M. (2008). Lamotrigine: Pharmacology, clinical efficacy, and adverse effects. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 3(6), 293-303. <https://doi.org/10.1177/2045125308093066>
- Baker, G. B. ve Furtado, M. (2008). Zonisamide: A review of its pharmacology and therapeutic applications. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 3(5), 267-278. <https://doi.org/10.1177/2045125308091688>
- Bialer, M., ve White, H. S. (2010). The importance of drug solubility in the management of epilepsy. *Epilepsia*, 51(5), 926-934. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02530.x>
- Britz-McKibbin, P. ve Chen, D. D. (2000). Capillary electrophoresis with variable pH for separation of complex mixtures. *Analytical Chemistry*, 72(6), 1242-1250.
- Brodie, M. J., ve Dichter, M. A. (1996). Antiepileptic drugs. *New England Journal of Medicine*, 334(3), 168-175. <https://doi.org/10.1056/NEJM199601183340307>
- Carcak, N., ve Ozkara, C. (2017). Seizures and Antiepileptic Drugs: From Pathophysiology to Clinical Practice. *Current pharmaceutical design*, 23(42), 6376–6388. <https://doi.org/10.2174/1381612823666171115101557>
- Contin, M., Mohamed, S., Candela, C., Albani, F., Riva, R. ve Baruzzi, A. Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2010, 878(3-4), 461–465. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.11.039>.
- European Medicines Agency (EMA). (2007). Rufinamide (Inovelon) assessment report.
- European Medicines Agency (EMA). (2009). *Lamotrigine (Lamictal) assessment report*.
- European Medicines Agency (EMA). (2010). *Zonisamide (Zonegran) assessment report*.
- Gaspar, V. P., Ibrahim, S., Zahedi, R. P., ve Borchers, C. H. (2021). Utility, promise, and limitations of liquid chromatography-mass spectrometry-based therapeutic drug monitoring in precision medicine. *Journal of Mass Spectrometry*, 56(11), e4788. <https://doi.org/10.1002/jms.4788>.
- Gerlach, A. C. ve Krajewski, J. L. (2010). Antiepileptic Drug Discovery and Development: What Have We Learned and Where Are We

- Going?. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 3(9), 2884–2899. <https://doi.org/10.3390/ph3092884>.
- Glauser, T. A. ve Pellock, J. M. (2009). Rufinamide for the adjunctive treatment of seizures associated with Lennox-Gastaut syndrome. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 5, 399-406. <https://doi.org/10.2147/NDT.S4436>
- Glauser, T., Ben-Menachem, E., Bourgeois, B., Cnaan, A., Chadwick, D., Guerreiro, C., ... ve Tomson, T. (2006). ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia*, 47(7), 1094-1120.
- Hirsch, L. J. ve French, J. A. (2007). Lamotrigine in the treatment of epilepsy: A review. *CNS Drugs*, 21(9), 723-738. <https://doi.org/10.2165/00023210-200721090-00001>
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2024). ICH Q2(R2): Validation of analytical procedures & ICH Q14: Analytical procedure development.
- Jorgenson, J. W. ve Lukacs, K. D. (1981). Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Analytical Chemistry*, 53(8), 1298-1302.
- Kang, J. H., ve Kim, Y. C. (2016). Zonisamide: Pharmacological properties and its role in the treatment of epilepsy. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 16(10), 1169-1180. <https://doi.org/10.1586/14737175.2016.1180345>
- Kearney, J. A., ve Rho, J. M. (2009). Rufinamide: A new antiepileptic drug for the treatment of epilepsy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 10(5), 825-835. <https://doi.org/10.1517/14656560802550837>
- Kovács, B., Széles, E. ve Káplár, R. (2021). *Capillary Electrophoresis and Its Application in Pharmaceutical Analysis*. Elsevier.
- Kuldvee, R. ve Thormann, W. (2001). Determination of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in human serum and plasma by micellar electrokinetic capillary chromatography in the absence of electroosmosis. *Electrophoresis*, 22(7), 1345–1355. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200105\)22:7](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200105)22:7)
- Kumar, V., Bharadwaj, R., Gupta, G. ve Kumar, S. (2015). An overview on HPLC method development, optimization and validation process for drug analysis. *The Pharmaceutical and Chemical Journal*, 2(2), 30-40.
- Kwan, P. ve Brodie, M. J. (2000). Early identification of refractory epilepsy. *New England Journal of Medicine*, 342(5), 314-319. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002033420501>
- Kwan, P., ve Brodie, M. J. (2001). Lamotrigine: A new antiepileptic drug. *CNS Drugs*, 15(1), 21-36. <https://doi.org/10.2165/00023210-200115010-00002>
- Landers, J. P. (2008). *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques* (3rd ed.). CRC Press.
- Landers, J. P. (2008). *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques* (3rd ed.). CRC Press.

- Lee, H., et al. (2021). "The Efficacy of Adding Zonisamide to Lamotrigine and Rufinamide Therapy in Epileptic Patients." *Neuropharmacology*, 178, 108257.
- Liu, X., Cao, X. ve Chen, L. (2019). Selection of buffer systems in capillary electrophoresis for complex sample analysis. *Electrophoresis*, 40(1), 3-12.
- Loscher, W., ve Schmidt, D. (2011). New avenues for anti-epileptic drug discovery: The importance of the target. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(11), 861-878. <https://doi.org/10.1038/nrd3457>
- Makino, K., Goto, Y., Sueyasu, M., Futagami, K., Kataoka, Y. ve Oishi, R. (1997). Micellar electrokinetic capillary chromatography for therapeutic drug monitoring of zonisamide. *Journal of Chromatography. B: Biomedical Sciences and Applications*, 695(2), 417–425. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(97\)00185-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(97)00185-0)
- McNamara, J. O. (2006). Pharmacotherapy of the epilepsies. B. G. Katzung, S. B. Masters ve A. J. Trevor (Ed.), *Basic and clinical pharmacology* içinde (10th ed., pp. 403-417). McGraw-Hill.
- Perucca, E. (2005). An introduction to antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 46(s4), 31-37. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00310.x>
- Perucca, E. ve Franco, V. (2010). Rufinamide: Clinical pharmacological properties and clinical efficacy in the treatment of epilepsy. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 10(6), 981-989. <https://doi.org/10.1586/ern.10.73>
- Rajan, H. V. (2015). Development and validation of HPLC method-A Review. *International. Journal of current research in pharmacy*, 1(2), 55-68.
- Rao, B. V., Sowjanya, G. N., Ajitha, A., ve Rao, V. U. M. (2015). A review on stability indicating HPLC method development. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(8), 405-423.
- Reijenga, J., van der Wal, S., van den Berg, R. ve Somsen, G. (2007). Recent developments in capillary electrophoresis for pharmaceutical analysis. *Analytica Chimica Acta*, 1(585), 268–278.
- Riekkola, M. L. ve Kenndler, E. (2013). *Micellar Electrokinetic Chromatography: Applications and Principles*. Springer Science & Business Media.
- Rogawski, M. A., ve Löscher, W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(7), 553-564. <https://doi.org/10.1038/nrn1430>
- Rx-Media, 2024
- Sabir, A. M., Moloy, M. ve Bhasin, P. S. (2013). HPLC method development and validation: A review. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(4), 39-46.
- 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.
- Theurillat, R., Kuhn, M. Ve Thormann, W. (2002). Therapeutic drug monitoring of lamotrigine using capillary electrophoresis: Evaluation of assay performance and quality assurance over a 4-year period in the routine arena. *Journal of*

Chromatography. A, 979(1-2), 353–368. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)01257-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)01257-8)

United States Pharmacopeial Convention. (2024). United States Pharmacopeia 47 - National Formulary 42 (USP 47 - NF 42). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.

Vahle, J. L., et al. (2008). The use of zonisamide in the treatment of epilepsy. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 8(6), 941-951. <https://doi.org/10.1586/14737175.8.6.941>

Wang, L., et al. (2019). "Combination Therapy with Rufinamide and Lamotrigine for Refractory Epilepsy." *Seizure*, 68, 44-50.

Zaccara, G. ve Morano, A. (2009). Lamotrigine in the treatment of epilepsy: A review of the clinical evidence. *Current Medical Research and Opinion*, 25(7), 1713-1727. <https://doi.org/10.1185/03007990903041677>



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Selen Duygu ÇEÇEN

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim ve Mesleki Geçmişi

- 2012, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi (Lisans)
- 2017, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)
- 2020, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı (Doktora)
- 2019, Balıkesir İl Sağlık Müdürlüğü, Eczacı
- 2021, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Eczacılık Fakültesi/ Analitik Kimya Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi
- 2023, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Eczacılık Fakültesi/ Analitik Kimya Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi