

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

**LEFLUNOMİD'İN FARMASÖTİK PREPARATLARDAN ANALİZİ İÇİN KAPİLER
ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

Kim. Tuba REÇBER

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2013**

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

**LEFLUNOMİD'İN FARMASÖTİK PREPARATLARDAN ANALİZİ İÇİN KAPİLER
ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

Kim. Tuba REÇBER

Analitik Kimya Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Sedef KIR

ANKARA

2013

Anabilim Dalı: Analitik Kimya Anabilim Dalı

Program: Analitik Kimya Yüksek Lisans Programı

Tez Başlığı: Leflunomid'in Farmasötik Preparatlardan Analizi İçin Kapiler Elektroforez Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu

Öğrenci Adı-Soyadı: Tuba REÇBER

Savunma Sınavı Tarihi: 05.09.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nilgün Günden GÖĞER
Gazi Üniversitesi



Tez danışmanı: Prof. Dr. Sedef KIR
Hacettepe Üniversitesi



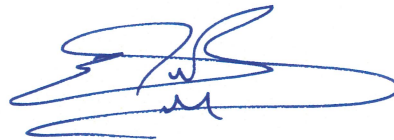
Üye: Prof. Dr. Sacide ALTINÖZ
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Ceren YARDIMCI
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Yrd. Doç. Dr. Erol ŞENER
Anadolu Üniversitesi



ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca her konuda bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösterdiği, destek olduğu ve emeğini hiçbir zaman esirgemediği için değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sedef KIR'a,

Öğrettikleri değerli bilgiler ve gösterdikleri samimiyet için Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma,

Tez çalışmam süresince yardımları ve manevi destekleriyle ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya, Dr. Mustafa ÇELEBİER'e ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Bu günlere gelmemi sağladıkları için sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Reçber T., Leflunomid'in Farmasötik Preparatlardan Analizi İçin Kapiler Elektroforez Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2013. Bu çalışmada farmasötik preparatlardan Leflunomid analizi için yeni bir miseller elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC) yöntemi geliştirilmiştir. MEKC yönteminde en iyi sonuçlar çalışma tamponu olarak 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM borat tamponu kullanıldığında elde edilmiştir. Analizler, eritilmiş silika kapilerde (50 µm iç çap, 48.5 cm toplam uzunluk, 40.0 cm etkin uzunluk) 20°C 'de, 50 mbar basınçla 5 s hidrodinamik enjeksiyon ve 25 kV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak Kafein kullanılmıştır. Ölçümler 260 nm dalga boyunda dizi-diyot dedektör ile gerçekleştirilmiştir. Belirlenen şartlarda, Leflunomid ve Kafein için göç zamanları sırasıyla 3.20 ve 6.81 dk'dır. Geliştirilen MEKC yöntemi, validasyon çalışması bulgularına göre doğru, kesin, özgün, duyarlı, tutarlı ve sağlamdır. Ayrıca yöntemde doğrusallık aralığı 5-150 µg/mL ve gözlenebilme sınırı 2 µg/mL olarak bulunmuştur. Leflunomid içeren farmasötik preparatlar geliştirilen ve valide edilen MEKC yöntemi ile analiz edilmiştir. Aynı preparatlar, farmakopede bulunan sıvı kromatografisi yöntemi ile de analiz edilmiş, sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve analiz sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Leflunomid, miseller elektrokinetik kapiler kromatografi, optimizasyon, validasyon, farmasötik preparat, miktar tayini

Destekleyen Kurumlar: H.Ü. B.A.B. Destek Projesi (013D02301001)

ABSTRACT

Reçber T., Development and Validation of Capillary Electrophoresis Method for Determination of Leflunomide from Pharmaceutical Preparation, Hacettepe University Health Sciences Institute, Ms Thesis in Analytical Chemistry, Ankara, 2013. In this study, a new micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) method was developed to analysis of Leflunomide in pharmaceutical preparations. Best results in the MEKC method were obtained by the use of pH 9.5 25 mM borate buffer containing 70 mM sodiumdodecylsulphate as the background electrolyte. Analysis were performed using a fused silica capillary (50 µm internal diameter, 48.5 cm total length, 40.0 cm effective length) at 20°C with the application of 5 seconds of hydrodynamic injection at 50 mbar pressure and a potential of 25 kV. Caffeine was used as internal standard. Detection was performed with a diode array detector at 260 nm. In specified conditions, the migration time for Leflunomide and Caffeine were 3.20 and 6.81 min, respectively. Developed MEKC method were accurate, precise, specific, sensitive, rugged and robust according to the validation study results. Also the linearity range was 5-150 µg/mL and the detection limit was found to be 2 µg/mL in method. The pharmaceutical preparations which containing Leflunomid were analyzed by the developed and validated MEKC method. Same preparations were also analyzed by a chromatographic method reported in the pharmacope, the results were compared statistically and no significant differences were found between the analysis results.

Keywords: Leflunomide, micellar electrokinetic capillary chromatography, optimization, validation , pharmaceutical preparation, quantitation.

Supported by: H.Ü. B.A.B. Support Project (013D02301001)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Romatoid Artrit ve Tedavisinde Kullanılan İlaç Grupları	2
2.2. Leflunomid'in Kimyasal, Fiziksel ve Farmakolojik Özellikleri	6
2.2.1. Leflunomid'in Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	6
2.2.2. Leflunomid'in Farmakolojik Özellikleri	6
2.3. Leflunomid'in Analiz Yöntemleri	9
2.4. Kapiler Elektroforez	12
2.4.1. Kapiler Elektroforezde Ayırım	13
2.4.2. Kapiler Elektroforezde Ayırma Yöntemleri	20
2.4.2.1. Kapiler Zon Elektroforez (CZE)	20
2.4.2.2. Miseller Elektrokinetik Kapiler Kromatografi (MEKC)	21
2.4.3. Kapiler Elektroforezde Ayırım Parametreleri	24
2.4.4. Kapiler Elektroforez Sistemi	26
2.4.4.1. Numune Enjeksiyonu	26
2.4.4.2. Kapiler	27
2.4.4.3. Kapiler Termostat	29
2.4.4.4. Dedektör	29
2.4.4.5. Güç Kaynağı	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Kullanılan Cihazlar	31
3.2. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler	32

3.2.1.	Kullanılan Cam Malzemelerin Temizliği	32
3.3.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.4.	Çalışılan Farmasötik Preparatlar	33
3.5.	Çözeltilerin Hazırlanması	34
3.6.	Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması	34
3.7.	Analiz Çalışmaları	35
3.7.1.	Kapilerin Şartlandırılması	35
3.7.2.	Elektroforetik Koşullar	35
3.7.3.	Uygulanacak Kapiler Elektroforez Yönteminin Seçilmesi	36
3.7.4.	Uygulanacak MEKC Yönteminin Optimizasyonu	36
3.7.5.	Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	37
3.8.	Validasyon Çalışmaları	37
3.9.	Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	39
3.9.1.	Kalibrasyon Yöntemi	39
3.9.2.	Standart Ekleme Yöntemi	39
3.10.	Karşılaştırma Yöntemi	40
4.	BULGULAR	41
4.1.	Saflık Kontrolü	41
4.2.	Leflunomid'in ve Kafein (İ.S.)'in Dalga Boyu Taraması	41
4.3.	Optimum Yöntem Parametrelerinin Belirlenmesi	42
4.3.1.	İç Standart Seçimi	42
4.3.2.	Çalışma Elektrolitine Ait Parametreler	42
4.3.3.	Cihaza Ait Parametreler	45
4.4.	MEKC Yönteminin Validasyonu	48
4.5.	Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları	58
4.6.	Standart Ekleme Yöntemi	59
5.	TARTIşMA	60
5.1.	Analiz Yönteminin Seçimi	60
5.2.	Yöntem Geliştirme	61
5.3.	Geliştirilen MEKC Yönteminin Validasyonu	65
5.	CZE Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	69
6.	SONUÇ	70

KAYNAKLAR	71
Ek 1	78
Ek 2	79
ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

\bar{x}	Aritmetik ortalama
% BH	% Bağıl Hata
μA	Mikroamper
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
BSS	Bağıl standart sapma
CE	Kapiler elektroforez
cm	Santimetre
COX	Siklooksijenaz
CZE	Kapiler zon elektroforez
dk	Dakika
DHODH	Dihidroorotat dehidrogenaz
DMARD	Hastalığı modifiye eden ilaçlar
EOF	Elektroosmotik akış
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
İS	İç standart
CMC	Kritik misel konsantrasyonu
kg	Kilogram
kV	Kilovolt
L	Litre
LOD	Gözlenebilirlik sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
m	Metre
M	Molar
MEKC	Miseller elektrokinetik kapiler kromatografi
mL	Mililitre
mM	Milimolar
N	Etkinlik (Teorik tabaka sayısı);
NSAİİ	Non steroid antiinflamatuvar ilaçlar

nL	Nanolitre
nm	Nanometre
PN	Pik normalizasyonu
r	Korelasyon katsayısı
R^2, r^2	Tanımlayıcılık katsayısı
s	Saniye
SDS	Sodyumdodesilsülfat
SH	Standart hata
SS	Standart sapma
t_{enj}	Enjeksiyon süresi
TNF	Tümör nekroz faktörü
P_{enj}	Enjeksiyon basıncı
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultraviyole (Morötesi)
UV/GB	Ultraviyole – Görünür Bölge
V	Volt

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Leflunomid'in kimyasal yapısı.	6
Şekil 2.2. Leflunomid'in aktif metaboliti Teriflunomid'e dönüşüm tepkimesi.	7
Şekil 2.3. Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi.	12
Şekil 2.4. Kapiler zon elektroforezde numune zonlarının ayırımı.	13
Şekil 2.5. Kapiler içinde elektroosmotik akışın gösterimi.	14
Şekil 2.6. Voltaja karşı akım (Ohm yasası) grafiği.	16
Şekil 2.7. Elektroforetik ve elektroosmotik hızların göç zamanı üzerine etkisi [EOF: Elektroosmotik akış, μ_{EP} : Elektroforetik hareketlilik, $\mu_{göz}$: Gözlenen hareketlilik, t: Zaman].	19
Şekil 2.8. Kapiler zon elektroforezde ayırım.	21
Şekil 2.9. SDS molekül yapısı.	23
Şekil 2.10. Anyonik bir yüzey aktif madde için MEKC mekanizması.	23
Şekil 2.11. MEKC' de misel ve numune moleküllerinin kapilerden çıkış sırası.	24
Şekil 2.12. Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri a, b, c) Hidrodinamik enjeksiyon, d) Elektrokinetik enjeksiyon.	27
Şekil 2.13. Eritilmiş silika kapilerin boyuna kesiti.	28
Şekil 4.1. Leflunomid ve Kafein'in UV spektrumları.	41
Şekil 4.2. Çalışma tamponu derişiminin elektroforetik hız üzerine etkisi [Koşullar : 75 mM SDS içeren pH 9.5 Borat tamponu. t_{enj} = 5 s, P_{enj} = 50 mbar, V = 25 kV, T = 20°C, λ = 260 nm, Leflunomid derişimi: 50 μ g/mL, Kafein derişimi: 100 μ g/mL].	43
Şekil 4.3. Çalışma tamponu pH'sının elektroforetik hız üzerine etkisi [Koşullar : 75 mM SDS içeren 25 mM Borat tamponu. t_{enj} = 5 s, P_{enj} = 50 mbar, V = 25 kV, T =20°C, λ = 260 nm, Leflunomid derişimi: 50 μ g/mL, Kafein derişimi: 100 μ g/mL].	43
Şekil 4.4. Çalışma tamponuna eklenen SDS derişiminin elektroforetik hız üzerine etkisi [Koşullar : pH 9.5 25 mM Borat tamponu. t_{enj} = 5 s, P_{enj} = 50 mbar, V = 25 kV, T = 20°C, λ = 260 nm, Leflunomid derişimi: 50 μ g/mL, Kafein derişimi: 100 μ g/mL].	44

	Sayfa
Şekil 4.5. Çalışma tamponuna uygulanan voltaja karşı akım ilişkisi.	45
Şekil 4.6. Çalışma voltajının elektroforetik hız üzerine etkisi [Koşullar: 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM Borat tamponu. $t_{enj}= 5$ s, $P_{enj}= 50$ mbar, $T = 20^{\circ}C$, $\lambda= 260$ nm, Leflunomid derişimi: 50 $\mu g/mL$, Kafein derişimi: 100 $\mu g/mL$].	45
Şekil 4.7. Çalışma sıcaklığının elektroforetik hız üzerine etkisi [Koşullar : 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM Borat tamponu. $t_{enj}= 5$ s, $P_{enj}= 50$ mbar, $V = 25$ kV, $\lambda= 260$ nm, Leflunomid derişimi: 50 $\mu g/mL$, Kafein derişimi: 100 $\mu g/mL$].	46
Şekil 4.8. Enjeksiyon süresinin pik yüksekliği üzerine etkisi [Koşullar: 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM Borat tamponu. $t_{enj}= 5$ s, $P_{enj}= 50$ mbar, $V = 25$ kV, $T = 20^{\circ}C$, $\lambda= 260$ nm, Leflunomid derişimi: 50 $\mu g/mL$, Kafein derişimi: 100 $\mu g/mL$].	46
Şekil 4.9. Optimum koşullarda yapılan analiz sonucu elde edilen elektroferogram [Leflunomid derişimi: 50 $\mu g/mL$, Kafein derişimi: 100 $\mu g/mL$].	47
Şekil 4.10. Leflunomid'in MEKC yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi	49
Şekil 4.11. Leflunomid'in; MEKC yöntemine ait yöntem doğrusallığının kontrol grafiği (n=6).	50
Şekil 4.12. MEKC yöntemi ile standart, plasebo, sentetik tablet ve tablet çözeltilerinden elde edilen elektroferogramlar [Koşullar : 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM Borat tamponu. $t_{enj}= 5$ s, $P_{enj}= 50$ mbar, $V = 25$ kV, $T = 20^{\circ}C$, $\lambda= 260$ nm].	55

TABLolar

	Sayfa
Tablo 2.1. MEKC’de kullanılan yüzey aktif maddeler.	22
Tablo 4.1. Leflunomid ve Kafein pikleri ile ilgili bilgiler (n=10).	48
Tablo 4.2. Leflunomid’ in MEKC yöntemi ile elde edilen kararlılık bulguları (n=3).	48
Tablo 4.3. MEKC yöntemine ait kalibrasyon doğrusunun özellikleri (n=10).	49
Tablo 4.4. MEKC yöntemine ait gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları (n=6).	51
Tablo 4.5. MEKC yöntemine ait geri kazanım değerleri.	52
Tablo 4.6. MEKC yöntemine ait enjeksiyon tekrarlanabilirliği verileri.	53
Tablo 4.7. MEKC yöntemine ait sistem tekrarlanabilirliği verileri.	54
Tablo 4.8. MEKC yöntemine ait sağlamlık bulguları (n=3).	56
Tablo 4.9. MEKC yöntemine ait tutarlılık bulguları.	57
Tablo 4.10. MEKC yöntemi ile elde edilen farmasötik preparat analiz sonuçları.	58
Tablo 4.11. Farmasötik preparat analiz sonuçlarının karşılaştırılması (n=6).	58

4. GİRİŞ ve AMAÇ

Romatoit artrit; kalıcı sinovitler, küçük eklemlerde oluşan simetrik iltihaplanmalar (özellikle el ve ayaklarda), büyük eklemlerde meydana gelen ilerleyici tutulmalar, eklem ve eklem dışı doku tahribatı gibi semptomlar ile karakterize edilen yetişkin nüfusun % 1'ini etkileyen kronik, iltihaplı, otoimmün bir hastalıktır (1).

Leflunomid romatoit artrit tedavisinde kullanılan, hastalığı modifiye edici bir ilaçtır. Leflunomid, eklemlerin tahribatına neden olan eklem iltihaplanmasını immün hücrelerinin aktivitesini baskılayarak azaltmaktadır (2).

Kaynaklarda Leflunomid'in farmasötik preparatlardan analizi için UV spektrofotometrisi (3-7), UV dedektörlü akış enjeksiyon sistemi (8), yüksek performanslı sıvı kromatografisi-UV dedektör sistemi (9-12) ve ultra performanslı sıvı kromatografisi-dizi-diyot dedektör sistemi (13) bildirilmiştir.

Kapiler elektroforez, ilaç analizlerinde sıkça uygulanan bir yöntem olup son yıllarda özellikle kalite kontrol amacıyla kullanılan bir analiz yöntemi haline gelmiştir (14-17). Kapiler elektroforez, kromatografik yöntemlere göre düşük maliyetli, ayırım etkinliği daha yüksek, hızlı, doğru ve kolay uygulanabilen bir analiz yöntemidir.

Leflunomid'in kaynaklarda elektroforetik bir yöntemle tayinine rastlanmamıştır. Bu çalışmada Leflunomid'in elektroforetik davranışları incelenerek kapiler elektroforez yöntemi için gerekli parametrelerin optimize edilmesi; geliştirilen kapiler elektroforez yönteminin tüm validasyon parametrelerinin değerlendirilmesi ve Leflunomid'in farmasötik preparatlardan analizine uygulanabilirliğinin kanıtlanması amaçlanmıştır. Ayrıca elde edilen verilerin USP 32'de yer alan sıvı kromatografisi yöntemi (18) ile karşılaştırılarak sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Romatoid Artrit ve Tedavisinde Kullanılan İlaç Grupları

Romatoid artrit, oluşum nedeni kesin olarak bilinmemekle beraber, otoimmün hastalıklar grubunda ele alınan, çevresel, kalıtsal ve hormonal faktörlerin etkisi ile gelişen bir hastalıktır (10).

Romatoid artrit temel olarak büyük ve küçük eklemleri etkilemekle kalmayıp aynı zamanda sistemik etkiler de meydana getiren, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Toplumda görülme sıklığı % 1 oranındadır (1). Hastalık sadece morbiditeyi değil aynı zamanda mortaliteyi de artırmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar; hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamış ve tedavide radikal değişikliklere neden olmuştur (19).

Romatoid artrit tedavisinde temel amaç, ağrı ve inflamasyonun giderilmesine ek olarak eklem fonksiyonlarının da korunmasıdır. Romatoid artrit'in geçmişte kullanılan ve günümüzde de az da olsa hala uygulanmakta olan 'piramit modeli' olarak adlandırılan tedavi yönteminde, hastalar uzunca bir süre sadece non steroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) veya düşük doz steroid ile tedavi edilmekte ve özellikle radyolojik hasar ortaya çıktıktan sonra remisyon sağlayıcı ilaçlar tedaviye eklenmektedir (20).

Günümüzde romatoid artrit tedavisinde NSAİİ, anti malaryal ilaçlar, kortikosteroidler ve hastalığı modifiye eden ilaçlar (DMARD) kullanılmaktadır (21).

a) Non steroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ):

NSAİİ'lerin temel etki mekanizması siklooksijenaz (COX) yolunu inhibe ederek dokulardaki araşidonik asitten prostaglandinlerin (PG) ve diğer bazı eikozanoidlerin oluşmasını engellemektir. Böylece inflamasyonu önleyip analjezik etki gösterirler. Kimyasal olarak uyarılan siniri baskırlar. Ayrıca ateş düşürücü etkileri vardır. Aspirin COX'u tersinmez olarak asetilleyerek inhibe ederken diğer NSAİİ'ler doza bağımlı olarak tersinir olarak inhibe ederler. COX enzimi değişik dokulardan farklı miktarda elde edilebildiğinden her dokunun NSAİİ'lere duyarlılığı

farklıdır. Dolayısıyla her hastanın farklı ilaca yanıtı farklı olacağından istenen etki alınıncaya kadar birkaç farklı NSAİİ denenebilir. NSAİİ'ler genelde her romatoid artrit hastasında uzun süreli olarak kullanılmasına karşın hastalığın seyrini değiştirmezler (22,23).

b) Anti malaryal ilaçlar:

Anti malaryal ilaçların etkileri tam olarak bilinmemekle beraber nötrofil kemotaksisini ve fagositozunu engelleme, fosfolipaz A2'yi baskılama ve immün kompleks oluşumunu engelleme gibi etkileri olduğu düşünölmektedir. Bu gruptaki ilaçlar oral yolla alındıktan sonra hızlı bir şekilde emilir, dokulara geçer, büyük bir kısmı karaciğerde metabolize edilir ve yaklaşık % 30'u idrarla atılır. Bu grup ilaçlar romatoid artritte klinik ve laboratuvar olarak etkilidirler, ancak radyolojik olarak erozyonları önleyemedikleri görölmüştür (24,25).

c) Kortikosteroidler:

Kortikosteroidler; antiinflamatuvar, antialerjik ve immünsupresif etkileri nedeniyle romatoid artrit tedavisinde oldukça sık kullanılırlar. Hücre içine giren steroid-reseptör kompleksi DNA'ya bağlanıp bazı genlerin transkripsiyonunu uyarır. Aktif romatoid artritli hastalarda düşük doz kortikosteroid tedavisi inflamasyona bağlı semptom ve bulguların baskılanmasını sağlar. Aktif romatoid artritte doz arttırılması ya da gerekirse pulse steroid tedavisine gidilebilir (26).

d) Hastalęı modifiye edici ilaçlar

Hastalęı modifiye edici antiromatizmal ilaçlar yapısal eklem hasarının ilerlemesini geciktirici etki gösterirler.

1) Metotreksat:

Metotreksat, immünsupresif bir ilaç olup folik asit antagonistidir. Folik asidin dihidrofolat redüktaz ile reaksiyonunu önleyerek DNA yapımını baskılar, granüositlerin çeşitli fonksiyonlarını inhibe eder ve antiinflamatuvar etki gösterir. Romatoid artritte inflamasyon ve erozyonları yavaşlattığı, bazı durumlarda

durdurduğu gösterilmiştir. Hücre gelişimini durdurmaya yardımcı olan bazı etkileri vardır. Oral, IM, IV, subkutan kullanım şekilleri mevcuttur. Düşük dozun oral yolla emilimi oldukça iyidir (% 60). Karaciğerde metabolize olur. Kendisi ve metabolitleri % 80 idrarla atıldığından böbrek yetersizliğinde etkisi artar. Diğer ilaçlarla etkileşime girmez (27).

2) Sulfosalazin:

Sulfosalazin romatizma tedavisinde kullanılmak amacıyla sulfapiridin ve bir salisilik asidin birleştirilmesi ile oluşturulmuştur. Etkisi tam olarak bilinmemektedir. Romatoid artritte kullanıldığında klinik ve laboratuvar iyileşmenin yanı sıra erozyon oluşumunu da yavaşlattığı görülmüştür (28).

3) Leflunomid

Leflunomid piyasaya ilk çıktığı 1998 yılından beri romatoid artrit tedavisinde kullanılan en önemli ilaçlardan biridir. Romatoid artrit hastalığında radyolojik belirtilerin ilerleme hızını yavaşlatma bakımından en az sulfasalazin ve metotsekrat kadar etkili olduğu görülmüştür.

Leflunomid, romatoid artrit tedavisi için geliştirilmiş, pirimidin sentez inhibitörü olarak etki gösteren immünomodülatör bir ilaçtır. Etkisini pirimidin sentezinde rol oynayan dihidroorotat dehidrogenaz enzimini inhibe ederek gösterir. Bu yolla romatoid artrit patogenezinde temel rol oynayan T hücrelerinin proliferasyonunu önler. Leflunomid oral alımından sonra enterohepatik sirkülasyonla aktif metaboliti Teriflunomide dönüşür (29).

e) Diğer ilaçlar:

Romatoid artrit tedavisinde kullanılan başka ilaçlar da vardır. Bunların bir kısmı hastane ortamında kontrollü verilen ilaçlardır, diğer kısmında ise yeterli klinik deneyim yoktur.

1- Azotiyopirin: Pürin analogu olan bir ön ilaçtır. DNA sentezini engeller ve lenfosit artışı baskılar. İmmunosupresif etki ile birlikte antiinflamatuvar etki de

gösterir. Karaciğerde aktif metaboliti olan 6-merkaptopürine dönüşür. Romatoid artritte diğer uzun etkili ilaçlar kadar etkilidir (30).

2-Altın preparatları: Romatoid artritli hastalarda, hastalığın sulfasalazin ve metotreksat gibi modifiye edici ilaçlar ile tedavi edilemediği ya da bu ilaçların yan etkileri nedeniyle kullanılmadığı durumlarda altın preparatları kullanılmaktadır. Bu ilaçların antimikrobiyal, iltihap azaltıcı ve enzim inhibisyonu gibi etkileri vardır; klinik ve laboratuvar iyileşme ile birlikte radyolojik iyileşme de sağlarlar (31).

3-Etanercept: Tümör nekroz faktörü (TNF) alfa genine bağlanarak onların reseptörlerine bağlanmasını önleyen bir TNF reseptör füzyon proteinidir. Aktif romatoid artrit tedavisinde kullanılır (32).

4-İnfliksımab: Romatolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan, kimerik tümör nekroz faktörü (TNF) ajandır. Monoklonal TNF alfa antikoru. TNF alfa'yı güçlü bir şekilde bağlar (33).

5-Anakinra: Amerika Birleşik Devletleri'nde "Food and Drug Administration" (FDA) tarafından DMARD'lara cevap vermeyen ve ağır bir seyir gösteren hastalar için onaylanmış rekombinant IL-1 reseptör antagonistidir. Tek başına veya Metotreksat ile kombine kullanılabilir (34).

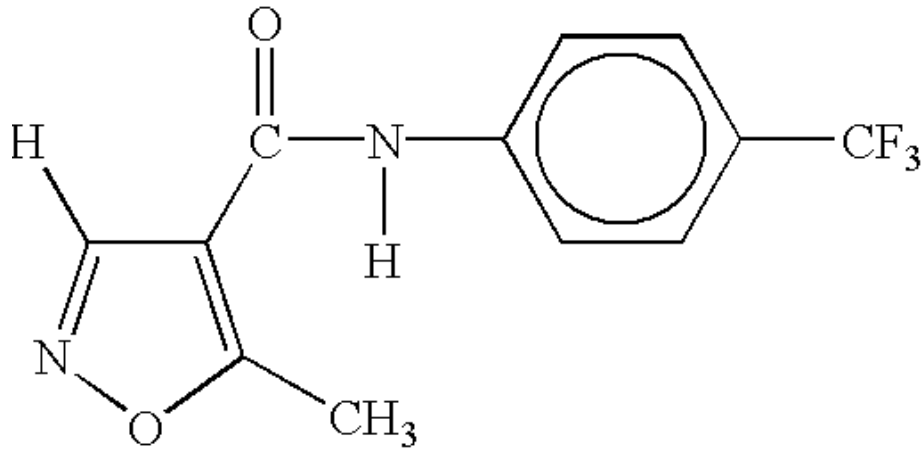
6-Siklosporin: "Tolypocladium Inflatum Gams" adlı fungusun elde edilen bir polipeptididir. İmmünespresif bir ilaçtır. DNA sentezini bozarak T lenfositlerini seçici olarak inhibe eder. Romatoid artritte diğer ilaçlara cevap vermeyen hastalarda kullanılır (35).

7-Biyolojik ajanlar: Romatoid artrit tedavisinde kullanılabilen biyolojik ajanlar; hücresel işlevlerin baskılanması, sitokin/reseptör işlevlerinin baskılanması, immün cevabın değiştirilmesi ile ilgili tedavilerdir (36).

2.2. Leflunomid'in Kimyasal, Fiziksel ve Farmakolojik Özellikleri

2.2.1. Leflunomid'in Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Leflunomid'in kimyasal adı ([N-(4-triflorometilfenil)-5-metil-izoksazol-4-karboksamid])'tir. Kapalı formülü $C_{12}H_9F_3N_2O_2$ olan Leflunomid'in kimyasal yapısı Şekil 2.1'de verilmektedir.

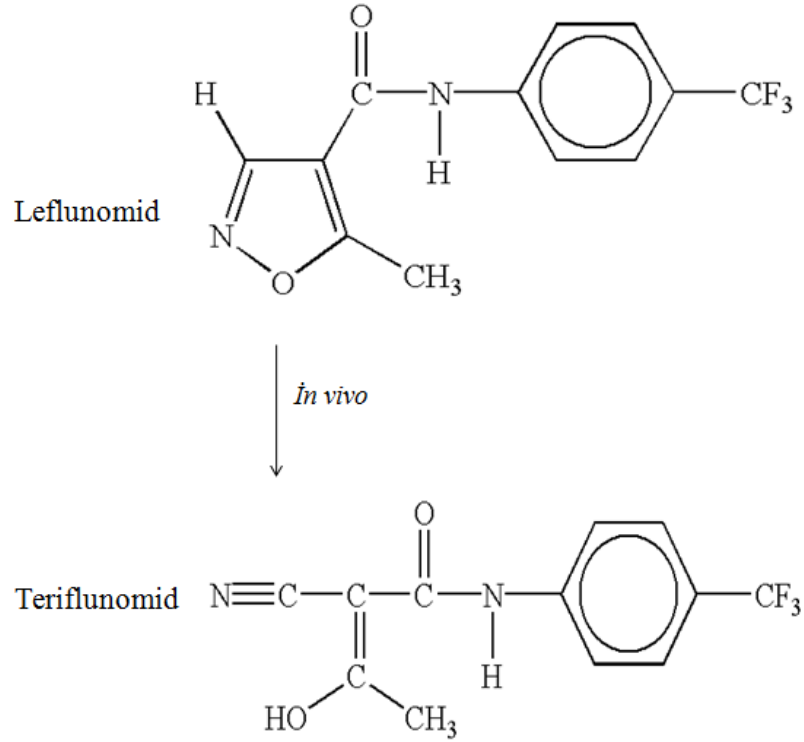


Şekil 2.1. Leflunomid'in kimyasal yapısı.

Molekül ağırlığı 210.21 g/mol olan Leflunomid, beyaz toz halde bulunur. Erime noktası 164-168 °C (18) arasındadır. Leflunomid, pratikte suda ve sulu tampon sistemlerinde çözünmez; metanol, etanol, izopropanol, etil asetat, propilen karbonat, aseton ve asetonitril içerisinde kolayca çözünür. pKa'sı 10.8'dir (37).

2.2.2. Leflunomid'in Farmakolojik Özellikleri

Leflunomid, barsak duvarında ve karaciğerde halka açılma reaksiyonu ile aktif metabolitine (Teriflunomid) dönüşür (Şekil 2.2). Leflunomid'in bütün in vivo aktivitesi bu metabolit tarafından gerçekleştirilir. Teriflunomid, insan dihidroorotat dehidrogenaz (DHODH) enzimini inhibe eder ve hücre çoğalmasını önler (37).



Şekil 2.2. Leflunomid'in aktif metaboliti Teriflunomid'e dönüşüm tepkimesi.

Absorpsiyon

Absorpsiyon derecesi açlık ve tokluk durumlarından etkilenmediği için yemeklerle birlikte alınabilir.

Tek doz oral uygulanması sonrasında Teriflunomid maksimum plazma derişimine 1-24 saat arasında ulaşır. Dozun yaklaşık olarak % 82-95'i absorbe edilir (37).

Dağılma

Leflunomid'in aktif metaboliti olan Teriflunomid düşük bir dağılım hacmine ($V_{ss} = 0.13$ L/kg) sahiptir ve sağlıklı deneklerde yüksek oranda (>99.3%) albümine bağlanır. Protein bağlanması terapötik derişimlerde 537 mg/L'ye kadar doğrusaldır. Teriflunomid'in görünürdeki dağılım hacmi yüksek protein bağlanması sebebiyle daha düşüktür (yaklaşık 11 L) (37).

Metabolizma

Leflunomid, bağırsak duvarında ve karaciğerde, majör ve aktif metaboliti olan Teriflunomid ile birlikte birçok minör metabolit oluşturacak şekilde metabolize olur. Bu minör metabolitler bazı hastaların plazmalarında çok düşük düzeylerde bulunurlar. Bu metabolitlerden sadece 4-trifluorometilanilin plazmada ölçülebilecek düzeydedir. Ana bileşik plazmada nadiren saptanmaktadır (19).

Teriflunomid, DHODH enzimini inhibe ederek novo pirimidin sentezini inhibe eder. İmmünmodülatör özelliklerinin yanı sıra TNF- α , IL-1 gibi proinflamatuvar sitokin seviyelerini azalttığı da bildirilmiştir (29).

Eliminasyon

Leflunomidin aktif metaboliti plazmadan yavaş yavaş elimine olur. Plazma kleransı yaklaşık 31 mL/saat'dir. Hastalardaki eliminasyon yarı ömrü 2 haftadır.

Klinik Kullanımı ve Dozu

Leflunomid romatoid artritli hastaların tedavisinde; hastalığın diğer hastalık modifiye edici ilaçlar ile kontrol altına alınamadığı durumlarda kullanılır.

Leflunomid tedavisine 3 gün boyunca günde bir kez alınan 100 mg'lık bir yükleme dozu ile başlanır. Devamında önerilen kullanım dozu günde bir kez 10 mg ila 20 mg'dır.

Terapötik etki genel olarak 4 ila 6 hafta sonra başlar ve 4-6 aylık bir süreye kadar daha da artabilir. Hafif böbrek yetmezliği olan hastalarda önerilen bir doz ayarlaması yoktur (19).

2.3. Leflunomid'in Analiz Yöntemleri

Pal ve arkadaşları, tablet formülasyonundan Leflunomid'in analizini spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirmişlerdir. Standartlar etanol-su (1:4 h/h) karışımında hazırlandıktan sonra çözeltiler yine aynı karışımla uygun derişimlere seyreltilmiş ve Leflunomid'in maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunda (260 nm) ölçüm yapılmıştır. Doğrusallık aralığı 8-30 µg/mL, gözlenebilme sınırı 0.28 µg/mL olarak bulunmuştur (4).

Babu ve arkadaşları, spektrofotometrik yöntemle Leflunomid'in farmasötik formülasyondan tayinini yapmışlardır. Standart çözeltiler metanolde hazırlanmış ve seyreltmeler distile su ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 261 nm'de yapılmış ve kalibrasyon verilerinin 2-30 µg/mL derişim aralığında doğrusallık gösterdiği belirtilmiştir (38).

Abbas ve arkadaşları, bozunma ürünleri varlığında Leflunomid'in analizini spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirmişlerdir. Ölçümler 253.4 nm'de yapılmış ve doğrusallık aralığı 2-16 µg/mL olarak bulunmuştur (6).

Prabu ve arkadaşları, tablettten Leflunomid analizi için fark spektrofotometrisi yöntemi geliştirmişlerdir. Referans hücresinde 0.1 N HCl ve örnek hücresinde 0.1 N NaOH ortamlarında bulunan Leflunomid'in absorbans değerleri 293.5 ve 261.5 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Doğrusallık aralığı 2-12 µg/mL olarak belirlenmiştir (7).

Srinivas ve arkadaşları, deneysel tasarım kullanarak tablettten Leflunomid'in analizi için bir sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Yöntemde hareketli faz olarak asetonitril-fosfat tamponu (60:40, h/h) karışımı kullanılmış ve akış hızı 0.8 mL/dk olarak alınmıştır. UV dedektör ile 260 nm'de ölçüm yapılmıştır. Doğrusallık aralığı 1-40 µg/mL, gözlenebilme sınırı 0.5 µg/mL olarak belirlenmiştir (39).

Yeniceli ve arkadaşları, Leflunomid'in tablet formülasyonundan analizini UV dedektör kullanarak akış enjeksiyonla gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntemde hareketli faz olarak % 25 etanol içeren etanol-su karışımı kullanılmış, en iyi akış hızı 0.8

mL/dk olarak bulunmuş ve ölçümler UV dedektör ile 260 nm'de gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık aralığı 0.74 – 29.72 µg/mL, gözlenebilme sınırı 0.07 µg/mL bulunmuş ve bu yöntem 20 mg Leflunomid içeren farmasötik preparata (Arava®) uygulanmıştır (8).

Yeniceli ve arkadaşları, Leflunomid'in farmasötik preparattan analizini HPLC yöntemi ile de yapmışlardır. Hareketli faz olarak % 60 metanol içeren metanol-su karışımı kullanılmış, C18 kolon ile 0.5 mL/dk akış hızında analiz gerçekleştirilmiştir. Dizi-diyot dedektör ile çalışılmış ve gözlenebilme sınırı 0.07 µg/mL, doğrusallık aralığı 0.57– 11.56 µg/mL olarak bulunmuştur (11).

Kher ve arkadaşları, Leflunomid'in tabletlerde analizini yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirmişlerdir. HPLC yönteminde, dizi-diyot dedektör, C18 kolon ve hareketli faz olarak % 60 asetonitril içeren 0.02 M amonyum asetat tamponu kullanılmıştır. Bu koşullarda doğrusallık aralığını 8-32 µg/mL, gözlenebilme sınırını 8 ng/mL bulunmuş ve tabletlerde içerik tekdüzeliği çalışmaları gerçekleştirilmiştir (9).

Miron ve arkadaşları tarafından tabletten Leflunomid analizi dizi-diyot dedektörlü HPLC ile gerçekleştirilmiştir. En iyi kromatografik performans C18 kolonda, hareketli faz olarak % 50 asetonitril içeren asetonitril-su karışımı kullanıldığında elde edilmiş ve gözlenebilme sınırı 0.1 µg/mL, doğrusallık aralığı 10-100 µg/mL olarak saptanmıştır (10).

Sultana ve arkadaşları, Leflunomid'i farmasötik preparattan ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi (RP-HPLC) ile analiz etmişlerdir. Hareketli faz olarak 1.2 mL/dk akış hızında metanol:su (80:20, h/h) karışımı kullanılmış ve ölçümler 248 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık aralığı 0.5-20 µg/mL, gözlenebilme sınırı 0.05 µg/mL olarak belirlenmiştir (12).

Kher ve arkadaşları, Leflunomid'in tablet formülasyonundan analizini ters faz-ultra performanslı sıvı kromatografisi (RP-UPLC) ile gerçekleştirmişlerdir. Hareketli faz olarak % 60 asetonitril içeren 0.02 M amonyum asetat tamponu, C18 kolon ve 0.4 mL/dk akış hızında, dizi-diyot dedektör ile analiz sağlanmıştır. Doğrusallık aralığı 10-30 µg/mL olarak bulunmuştur (13).

Schmidt ve arkadaşları, Leflunomid'i ve aktif metabolitini (Teriflunomid) plazmadan yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile analiz etmişlerdir. Hareketli faz olarak asetonitril-su-formik asit (40:59,8:0.2) karışımı kullanılmıştır. C18 kolon ile 0.5 mL/dk akış hızında 261 nm'de ölçüm yapılmıştır. Leflunomid ve Teriflunomid için doğrusallık aralığı sırasıyla 0.05-100 µg/mL ve 0.1-100 µg/ mL bulunmuştur. Alt tayin sınırı Leflunomid için 0.05 µg/mL ve Teriflunomid için 0.1µg/mL olarak belirlenmiştir (3).

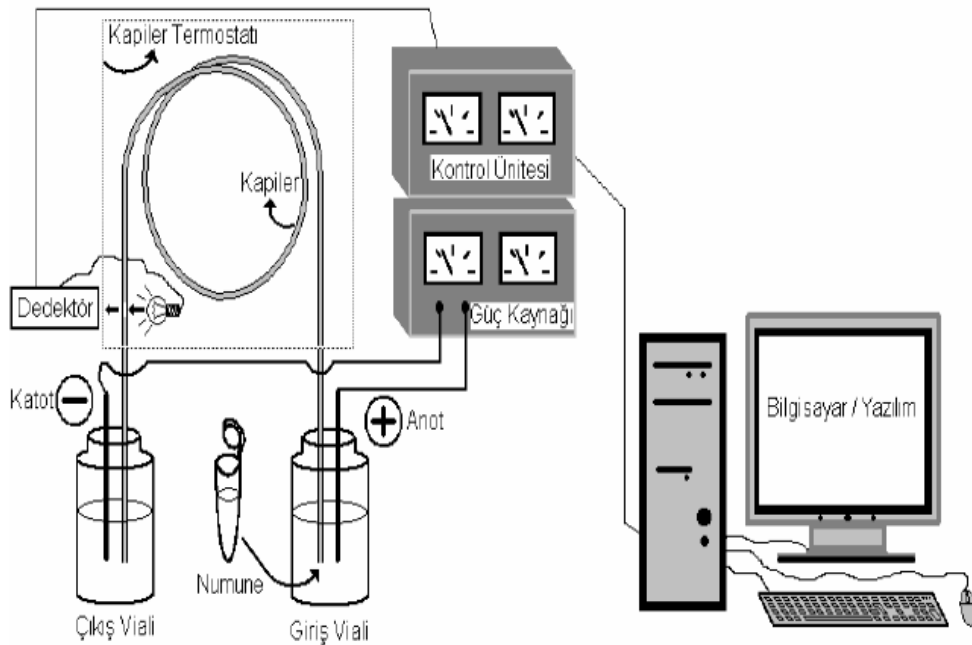
Quangang ve arkadaşları, Leflunomid ve aktif metaboliti olan Teriflunomid'in analizini ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi (RP-HPLC) ile gerçekleştirmişlerdir. Asetonitril-asetat tamponu karışımı hareketli faz olarak kullanılarak 1.4 mL/dk akış hızında, 260 ve 290 nm dalga boylarında çalışılmıştır. Doğrusallık aralığı Leflunomid için 0.79-31.60 µg/mL ve Teriflunomid için 0.35-4.00 µg/mL olarak bulunmuştur (40).

Kaynaklarda Leflunomid'in aktif metaboliti olan Teriflunomid'in biyolojik materyalden analizlerine ilişkin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve sıvı kromatografisi-tandem kütle spektroskopisi yöntemleri (LC-MS/MS) de bulunmaktadır (2,3,41-47).

2.4. Kapiler Elektroferez

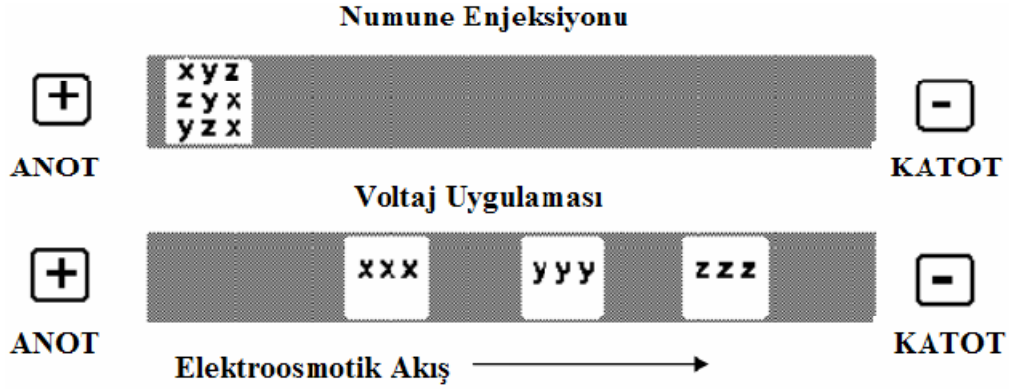
Kapiler elektroferez, 1980'li yıllardan beri uygulanan ve hızla gelişen bir ayırma tekniğidir. Elektroferezde ayırma, çözünen maddelerin bir elektrik alan uygulandığında farklı hızlarda göç etmesi ile sağlanmaktadır (48).

Elektroferez işlemi, tampon çözelti ile doldurulmuş 25-100 µm iç çapına sahip kapiler içerisinde gerçekleşmektedir. Kapilerin uçları aynı tampon çözeltiyi içeren giriş ve çıkış viallerine daldırılmıştır. Bu tampon çözeltiye çalışma tamponu denir. Her iki vial'e daldırılan elektrotlar ise dış güç kaynağına bağlıdır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kapiler elektroferez cihazının şematik gösterimi.

Tampon ile dolu kapilere numune enjekte edilip voltaj uygulanırsa bileşenler kapiler boyunca zonlar halinde göç ederler (Şekil 2.4) ve dedektörden geçerken elde edilen veriler bilgisayara gönderilir. Veriler, dedektör cevabının zamana karşı grafiği olan elektroferogramlar şeklinde elde edilir.



Şekil 2.4. Kapiler zon elektroforezde numune zonlarının ayırımı.

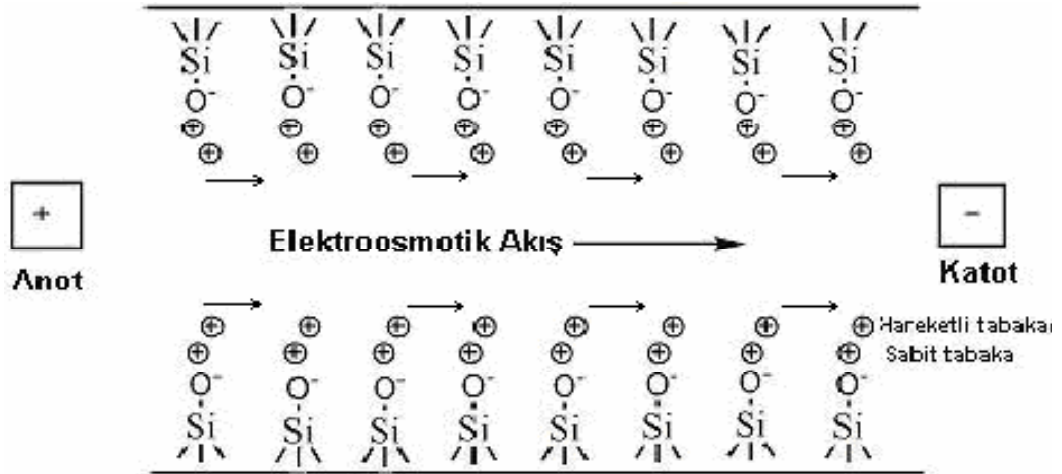
2.4.1. Kapiler Elektroforezde Ayırım (49,50)

Kapiler elektroforezde ayırma elektroosmotik hız ve elektroforetik hız olmak üzere iki kuvvet etki eder.

2.4.1.a. Elektroosmotik Hız

Kapiler elektroforezde, çalışma tamponu elektriksel alan etkisi altında kapiler boyunca hareket eder. Bu olay birbirleri ile temasta bulunan iki madde sınırında elektriksel çift tabaka oluşumundan kaynaklanır ve sonuçta tampon çözeltisi elektriksel alanın etkisi ile elektrotlardan birine doğru göç eder ve elektroosmotik akış oluşur.

Eritilmiş silika kapilerin iç yüzeyi silanol grupları (SiOH) ile kaplıdır ve pH 3.0'ün üzerinde bu gruplar SiO⁻'ya iyonize olurlar. Bu iyonizasyon, kapilerin NaOH veya KOH ile muamele edilmesi ile sağlanır. Çalışma tamponundaki pozitif yüklü iyonlar kapiler çeperindeki negatif yüklü SiO⁻ grubuna yaklaşır, kapiler çeperine tutulur ve sabit tabaka oluştururlar. Ancak çeperden uzaklaştıkça, çeperle pozitif yüklü iyonlar arasındaki elektrostatik çekim zayıflar, kapilere uygulanan elektriksel alanın iyonlar üzerindeki kuvveti baskın gelir ve çeper yüzeyindeki pozitif yüklü iyonlar topluca negatif yüklü elektroda (katoda) doğru göç ederler. Bu toplu göç, kapiler içindeki tamponun katoda doğru akmasına neden olur. Bu akışa elektroosmotik akış (EOF) denir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Kapiler içinde elektroosmotik akışın gösterimi.

Kapiler çeperine yakın olan sabit tabaka ile merkeze yakın olan hareketli tabakanın meydana getirdiği çift tabaka arasında oluşan potansiyele zeta potansiyel (ξ) adı verilir ve Formül 2.1 ile gösterilir. Çalışma elektrolitinin dielektrik sabiti arttıkça zeta potansiyeli düşer. Zeta potansiyeli arttıkça, çalışma elektrolitinin elektroosmotik hareketliliği artar.

$$\xi = 4 \pi \delta e / \varepsilon \quad (2.1)$$

δ = Difüzyon tabakasının kalınlığı

e = Yüzey alana düşen yük

ε = Tamponun dielektrik sabiti

Elektroosmotik akış hızının sabit olması önemlidir. Eğer akış hızı değişken olursa maddelerin göç zamanında değişim meydana gelir, bu da yanlış pik tanımlamasına neden olabilir.

Elektroosmotik akış hızı (v_{EOF}) Formül 2.2'ye göre hesaplanır.

$$v_{EOF} = E \mu_{EOF} \quad (2.2)$$

E = Elektriksel alan (volt / cm)

μ_{EOF} = Elektroosmotik hareketlilik

Tamponun elektroosmotik hareketliliği (μ_{EOF}) ise Formül 2.3'te verilmiştir

$$\mu_{EOF} = \varepsilon \xi E / 4 \pi \eta \quad (2.3)$$

η = Tamponun viskozitesi

Elektriksel alan (voltaj/uzunluk) voltaja bağlı olduğundan, EOF voltajla kolayca kontrol edilebilir (Formül 2.2). Artan voltaj ile EOF artar ve göç zamanı azalır. Ayrıca voltajın artması yüksek etkinliği de sağlar. Ancak yüksek voltaj ve bunun sonucu olan yüksek akım kapilerin ısınmasına (Joule ısınması) da neden olur (Formül 2.4).

$$P = I V \quad (2.4)$$

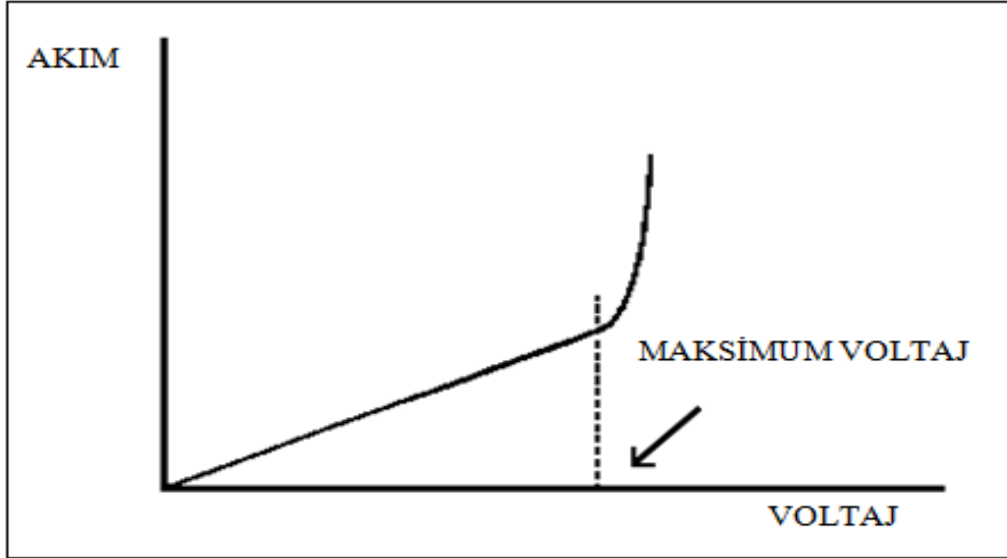
P = Güç

V = Voltaj

I = Akım

Kapiler kullanımı joule ısınması gibi bozucu bir etki oluşturabilmesine rağmen birçok avantaja sahiptir. Kapilerin elektriksel anlamda dayanıklı olması, az miktarda ısı üretimi ile çok yüksek elektriksel alanda çalışma olanağı sunmaktadır. Yüksek elektriksel alan uygulanması ile kısa analiz süreleri, yüksek verim ve ayırıcılık sağlanır (51). Kapiler içerisinde oluşan joule ısınması çabuk soğutulamazsa, kapiler sıcaklığı artar. Kapiler sıcaklığındaki artış çalışma tamponunun viskozitesini ve elektroosmotik hareketliliğini değiştirir. Bu da pik genişlemesine, değişken göç zamanına, numunenin bozunmasına veya tamponun kaynaması sonucu elektrik iletkenliğinin kesilip deneyin başarısız olmasına neden olabilir. Bu nedenle çalışma yaparken kısa analiz süresinde dar ve keskin pikler elde etmek için maksimum voltaj seçilmelidir. Uygulanabilecek maksimum voltaj deneysel olarak bulunur. Voltaja karşı akım grafiği (Ohm yasası grafiği) çizilerek doğrusallığın korunduğu en yüksek voltaj seçilmelidir (Şekil 2.6). Bu grafikte voltaj

yerine elektriksel alan da kullanılabilir (48). Maksimum voltaj çalışma tamponunun pH'sına, bileşimine ve derişimine, ayrıca kapiler iç çapı ve uzunluğuna bağlıdır.



Şekil 2.6. Voltaja karşı akım (Ohm yasası) grafiği.

Çalışma tamponunun pH'sı elektroosmotik akış üzerinde etkili bir parametredir. pH'nın artması ile zeta potansiyeli artar (Formül 2.1). Çünkü pH arttıkça kapiler iç duvarındaki SiOH moleküllerinin SiO⁻ moleküllerine iyonlaşma miktarı artar. Dolayısıyla pH'nın yükselmesi, daha fazla yüklü SiO⁻ grubunun varlığına, bu da yüksek zeta potansiyeline ve sonuçta da elektroosmotik akış hızının artmasına neden olur (Formül 2.2).

Çalışma tamponuna organik çözücüler ekleyerek viskozite, dielektrik sabiti ve zeta potansiyeli değerleri değiştirilebilmektedir. Eklenen organik çözücünün etkisi, çözücünün türüne ve miktarına göre değişir. Elektrolite metanol eklenmesi pik simetrisini ve ayırıcılığı iyileştirirken, asetonitril eklenmesi analiz süresini kısaltmaktadır.

Kapiler sıcaklığı sabitlenip, tamponun iyonik kuvveti veya derişimi artırıldığında ise; zeta potansiyelinde düşme meydana gelir. Buna bağlı olarak daha düşük elektroosmotik akış elde edilir. Eğer sıcaklık kontrol edilmezse iyonik gücün ya da derişimin artması, akımın dolayısıyla da sıcaklığın artmasına neden olabilir.

Artan sıcaklık ise tampon viskozitesinin azalmasına ve kısa analiz süresi elde edilmesine yol açar (52).

Tampon derişiminin düşük olduğu durumlarda analiz daha kısa sürer. Derişiminin çok düşük olması ise istenmeyen bir durumdur. Çünkü bu durumda geniş ve simetrik olmayan pikler elde edilir. Eğer tampon derişimi numune derişiminden düşükse numune ve tampon arasında elektriksel alanda bozukluğa neden olan hareketlilik farklılıkları olabilir. Bu durum pik genişlemesine ya da pik kuyruklanmasına neden olur. Bu nedenle tampon çözeltisinin derişimi numune derişiminin en az 100 katı olmalıdır (53).

Elektroosmotik akışı belirlemek için, çalışma tamponu pH'sında nötr olan, bu tampon çözeltisi içinde çözünebilen, kullanılan dedektörle tanımlanabilen, saf, kapiler duvarı ile etkileşmeyen bir bileşimin (metanol, mesitil oksit, formamid, fenol gibi) sisteme enjekte edilmesi gerekir (51).

2.4.1.b. Elektroforetik Hız

Elektriksel alan altında çalışma tamponu içindeki yüklü numune molekülleri elektroforetik hızla hareket ederler. Yani (+) yüklü moleküller katoda, (-) yüklü moleküller ise anoda doğru göç ederler.

Elektroforetik hız (v_{EP}) Formül 2.5'e göre hesaplanır.

$$v_{EP} = E \mu_{EP} \quad (2.5)$$

μ_{EP} = Elektroforetik hareketlilik

Elektroforetik hız sayesinde numune molekülleri kapiler içerisinde farklı hızlarda göç ederler ve böylece ayırım gerçekleşir. Elektroforetik hareketlilik Formül 2.6'ya göre hesaplanır.

$$\mu_{EP} = q / 6 \pi \eta d \quad (2.6)$$

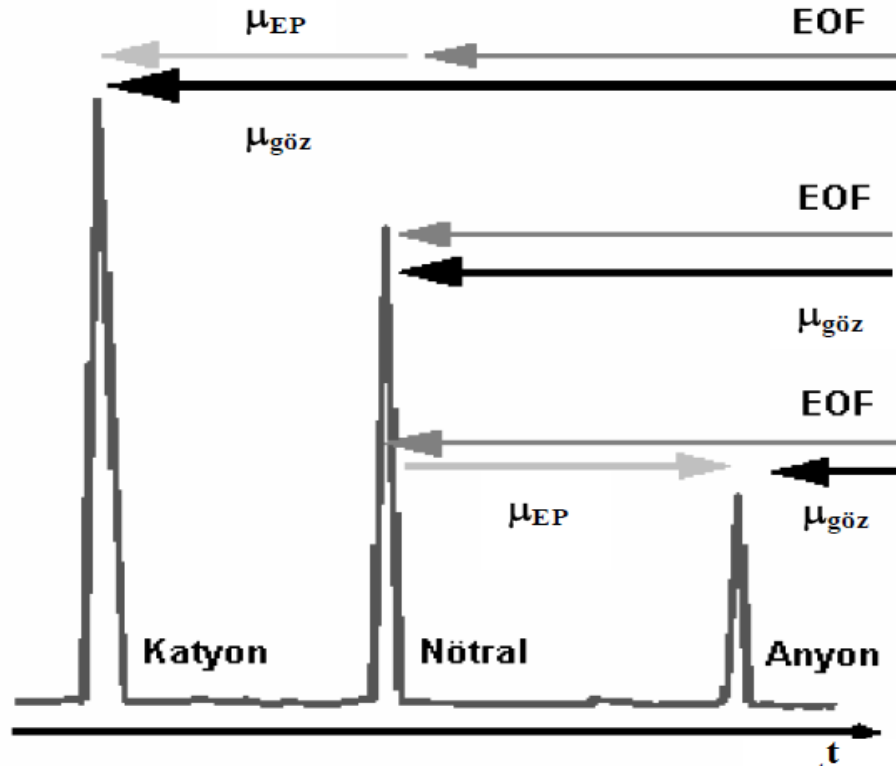
q = İyonize numunenin yükü

d = Numune yarıçapı

Numunelerin hızı elektroforetik hız ve elektroosmotik akış hızına bağlıdır. Gözlenen hız ($v_{göz}$) Formül 2.7'ye göre verilir.

$$v_{göz} = v_{EP} + v_{EOF} \quad (2.7.)$$

Anyonların gözlenen hızları, anyonlar EOF'nin ters yönünde elektroforetik hareketliliğe sahip olduklarından elektroosmotik hızdan düşüktür ($v_{göz} \text{ anyon} < v_{EOF}$). Katyonlarda ise gözlenen hız elektroosmotik hızdan büyüktür ($v_{göz} \text{ katyon} > v_{EOF}$). Çünkü EOF ile aynı yönde hareketliliğe sahiptirler. Nötraller ise kapiler içinde yalnızca EOF ile hareket ederler ve bundan dolayı gözlenen hız EOF'ye eşittir ($v_{göz} \text{ nötral} = v_{EOF}$) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Elektroforetik ve elektroosmotik hızların göç zamanı üzerine etkisi
 [EOF: Elektroosmotik akış, μ_{EP} : Elektroforetik hareketlilik, $\mu_{göz}$:
 Gözlenen hareketlilik, t: Zaman].

Gözlenen hız ($v_{göz}$) Formül 2.8'e göre hesaplanır.

$$v_{göz} = l / t_m \quad (2.8)$$

l = Etkin kapiler uzunluğu

t_m = Göç zamanı

2.4.2.Kapiler Elektroforezde Ayırma Yöntemleri

Kapiler elektroforez yöntemlerini farklı ayırma mekanizmalarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırabiliriz.

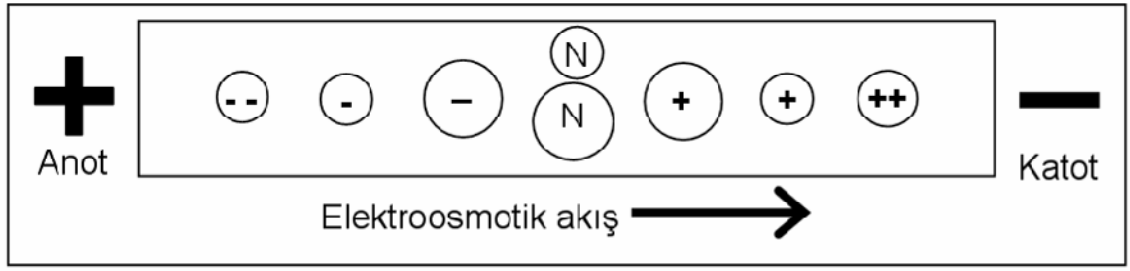
- 1) Kapiler zon elektroforez (CZE)
- 2) Miseller elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC)
- 3) Kapiler jel elektroforez (CGE)
- 4) Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF)
- 5) Kapiler izotakofrez (CITP)

Bu tez kapsamında analiz için CZE ve MEKC yöntemleri kullanıldığından bu yöntemler ayrıntılı olarak incelenecektir.

2.4.2.1.Kapiler Zon Elektroforez (CZE) (51)

CZE, kapiler elektroforezin ilk uygulanmış türüdür. CZE’de, kapiler içindeki iyonların hızları elektroforetik kuvvet ve elektroosmotik akışın etkisi ile belirlenir. Elektrik alan, pozitif yüklü iyonlar (katyonlar) üzerinde negatif yüklü elektrot (katot) yönüne doğru bir kuvvet oluştururken, negatif yüklü iyonlar (anyonlar) üzerinde de pozitif yüklü elektrot (anot) yönünde bir kuvvet oluşturur. Çözeltideki nötral moleküller elektrik alandan etkilenmez. Elektrik alanın oluşturduğu kuvvet, iyonlarda elektroforetik hareketliliğe neden olur. İyonların elektroforetik göç hızları, yük/çap oranlarına bağlıdır. Yük/çap oranı büyük olan iyonlar daha hızlı göç ederken, bu oranı küçük olan iyonlar daha yavaş göç eder.

Elektroosmotik ve elektroforetik etkiler sonucunda CZE’de elüsyon sırası katyon, nötral ve anyon şeklinde oluşur. Çapı aynı olan iyonlardan yükü büyük olan iyonun; yükü aynı olan iyonlardan ise çapı küçük olan iyonun elektroforetik hareketliliği daha fazladır. Sonuç olarak Şekil 2.8’de gösterildiği gibi iyonların yük/çap oranlarına göre ayırımı olurken nötral bileşikler birbirlerinden ayrılamazlar.



Şekil 2.8. Kapiler zon elektroforezde ayırım.

CZE, bir tamponda çözünebilen hemen hemen her iyonize bileşiğin ayırımında kullanılabilir. Küçük inorganik anyonlar ve katyonlar, büyük biyomoleküller, ayrıca suda çözünmeyen bileşikler de susuz tamponlar kullanılarak CZE ile ayrılabilirler.

2.4.2.2. Miseller Elektrokinetik Kapiler Kromatografi (MEKC) (53-55)

Miseller elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC), elektroforez ve kromatografi yöntemlerinin birleştirilmesi ile oluşturulmuş bir yöntemdir. 1984 yılında Terabe tarafından geliştirilen MEKC, en yaygın kullanılan kapiler elektroforez türlerinden biridir.

Kapiler zon elektroforez yöntemi ile nötral moleküllerin ayırımı mümkün değildir. Çünkü nötral moleküller elektrik alanda EOF ile aynı hızda göç ederler ve birbirlerinden ayrılmadan elüe olurlar. Bu durumda çalışma tamponu içerisine misel oluşturan bazı yüzey aktif maddelerin eklenmesi ile moleküllerin kapiler boyunca taşınması sağlanır.

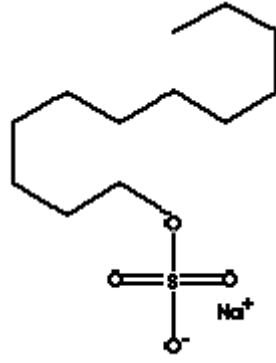
Miseller, bir hidrofilik başa ve bir hidrofobik kuyruğa sahip amfilik monomerlerin agregatlarıdır. Hidrofobik kuyruk kısmı, düz veya zincirli bir hidrokarbondan oluşurken hidrofilik baş kısmı anyonik, katyonik, zwitter iyonik veya noniyonik olabilir. Misel oluşumu için gerekli en düşük yüzey aktif madde derişimine kritik misel derişimi (CMC) denir. Çalışma tamponu içerisine kritik misel derişiminin üzerinde yüzey aktif madde eklendiğinde misel oluşmaya başlar.

Genellikle miseller, agregasyon sayısı olarak adlandırılan 40-100 yüzey etken monomerden oluşmaktadır. Sulu çözeltilerde küresel miseller, hidrofobik kuyruk kısımları içe dönük, hidrofilik baş kısımları ise dışa dönük bakacak şekilde oluşurlar. Oluşan bu miseller tampon çözelti içerisinde farklı bir faz oluşturur. Nötral moleküller sulu faz ile oluşan misel içerisindeki hidrokarbon fazı arasında dağılırlar. Miseller, kapiler içerisinde sulu fazdan daha yavaş ilerleyeceği için polaritesi farklı olan numune bileşenleri birbirlerinden ayrılmış olurlar. Tablo 2.1’de MEKC’de kullanılan yüzey aktif maddeler ve özellikleri verilmiştir.

Tablo 2.1. MEKC’de kullanılan yüzey aktif maddeler.

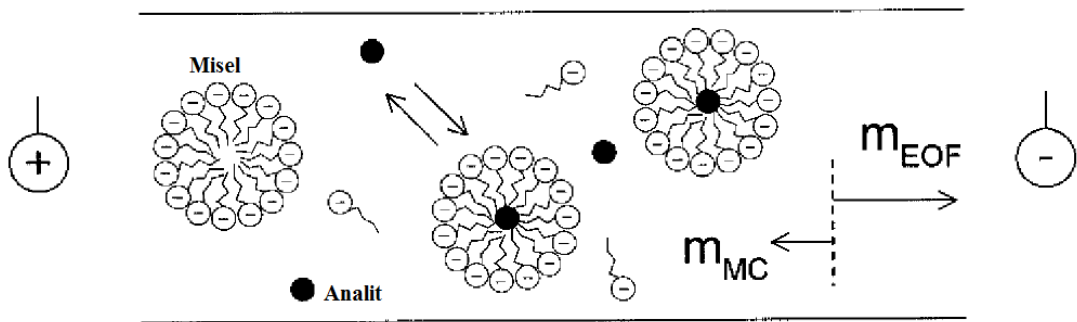
Yüzey aktif madde	Kısaltma	Kritik misel derişimi (CMC)(mM)	Agregasyon sayısı (n)
<i>Anyonik</i>			
Sodyum dodesilsülfat	SDS	8.1	62
Sodyum dodesilsülfonat	SDSo	9.8	54
<i>Katyonik</i>			
Dodesiltrimetilamonyum bromid	DTAB	15.0	50
Setiltrimetilamonyum bromid	CTAB	0.9	61
<i>Non-iyonik</i>			
Polioksietilen-23-lauril eter	Brij 35	0.1	40
<i>Amfoterik</i>			
Sodyum kolat	SC	12.5	3
Sodyum deoksikolat	SDC	6.4	14

Yüzey aktif maddeler, dolayısıyla miseller genellikle yüklü moleküllerdir. Taşıdıkları yüklere göre EOF ile birlikte ya da EOF’ye ters yönde göç ederler. Sodyum dodesilsülfat (SDS), MEKC yönteminde en yaygın kullanılan yüzey aktif maddedir. Kapalı formülü $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ olan, açık formülü Şekil 2.9’da gösterilen SDS anyonik bir yüzey aktif maddedir.



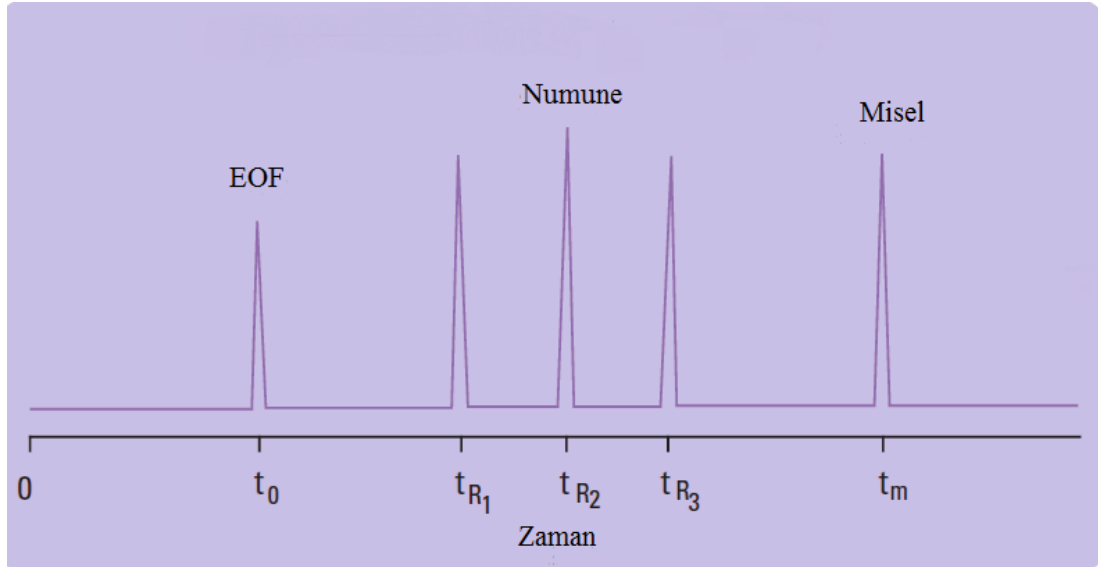
Şekil 2.9. SDS molekül yapısı.

SDS gibi anyonik yüzey aktif maddeler için MEKC mekanizması Şekil 2.10'da gösterilmiştir. SDS gibi maddeler, negatif yüklü olmaları sebebiyle EOF ile ters yönde, anoda doğru göç etme eğilimindedirler. Çalışma tampon çözeltisi ise elektroosmotik akış etkisi ile misellerden daha hızlı bir şekilde katoda doğru hareket eder. Tamponun akış hızı ile misellerin akış hızı arasında oluşan denge sonucu miseller, EOF yönünde, ancak çalışma tamponundan daha yavaş bir şekilde katoda doğru sürüklenirler. Bu nedenle çalışma elektrolitinde iki farklı faz oluşur. Misellerin iç kısmındaki hidrofobik faza "yalancı sabit faz" denir. Tampon çözeltisi ise daha hızlı aktığı için hareketli faz görevi görür. Numune bileşenleri sulu fazdan oluşan tampon çözelti ile yalancı sabit faz arasında dağılır. Polar maddelerin sulu fazda, apolar maddelerin ise hidrofobik misel fazında dağılımı daha fazladır.



Şekil 2.10. Anyonik bir yüzey aktif madde için MEKC mekanizması.

MEKC yönteminde ortamdaki moleküllerin kapilerden çıkış sıralaması Şekil 2.11’de gösterilmiştir. Sadece EOF ile sürüklenen maddelerin çıkışı t_0 zamanında; miselin kapilerden çıkışı t_m zamanında olur. Hidrofobisitetlerine göre numune bileşenleri t_0 ve t_m arasında kapilerden çıkarlar. Bu zaman aralığına “alikonma penceresi” denir.



Şekil 2.11. MEKC’de misel ve numune moleküllerinin kapilerden çıkış sırası.

2.4.3. Kapiler Elektroforezde Ayırım Parametreleri (48,51,56)

Elektroforetik ayırım parametreleri göç zamanı, kapasite faktörü, etkinlik, seçicilik ve ayırıcılıktır.

Göç zamanı ve Kapasite Faktörü

Analizin tamamlanması için tüm numune bileşenlerinin dedektöre ulaşması gerektiğinden, bileşenlerin göç zamanlarının kısa olması önemlidir. Formül 2.9’a göre yüksek voltaj, kısa kapiler ve yüksek EOF ile kısa analiz süresi elde edilebilir.

$$t_m = l L / (\mu_{EP} + \mu_{EOF}) \quad (2.9)$$

Kapasite faktörü (k') Formül 2.10'da verilmiştir. İyi bir ayırım için kapasite faktörünün 1-10 arasında olması beklenir.

$$k' = (t_m - t_0) / t_0 \quad (2.10)$$

t_m = Göç zamanı

t_0 = Sadece elektroosmotik akış ile sürüklenen maddenin göç zamanı

Etkinlik

Kapiler elektroforezde etkinlik, teorik tabaka sayısı (N) ile belirlenir. Teorik tabaka sayısı göç zamanı ve pik genişliğine bağlıdır (Formül 2.11).

$$N = 16 (t_m / w)^2 \quad (2.11)$$

w = Pik genişliği

Seçicilik

Seçicilik (α) komşu iki pikin dedektörden geçerken birbirlerine olan uzaklıklarını gösterir (Formül 2.12).

$$\alpha = (t_2 - t_0) / (t_1 - t_0) \quad (2.12)$$

t_1 = Göç zamanı kısa olanın göç zamanı

t_2 = Göç zamanı uzun olanın göç zamanı

t_0 = Sadece elektroosmotik akış ile sürüklenen maddenin göç zamanı

Çalışma elektrolitinin pH'sındaki değişim ve organik çözücüler seçiciliği etkiler.

Ayırıcılık

Ayırıcılık (R), piklerin birbirinden ne kadar ayrıldığını gösteren en önemli parametredir.

Ayırıcılık, elektroferogramlardan hesaplanabilir (Formül 2.13).

$$R = 2 (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2) \quad (2.13)$$

w_1 ve w_2 = Komşu piklerin taban pik genişliği

Ayırıcılık, uygulanan voltajı artırarak, elektrolit çözeltisinin pH'sını ve bileşimini değiştirerek, kapiler uzunluğunu artırılarak ve elektroosmotik akış optimize edilerek artırılabilir.

2.4.4. Kapiler Elektroforez Sistemi

Bir kapiler elektroforez sistemi kapiler, giriş-çıkış vialeri, dedektör, yüksek voltaj güç kaynağı, termostat ve bilgisayardan oluşur (Şekil 2.3).

2.4.4.1. Numune Enjeksiyonu

Kapiler içerisine numune verilmesi bir enjeksiyon işlemi olmamasına rağmen numune enjeksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Numune enjeksiyonu, hidrodinamik (hidrostatik) ve elektrokinetik (elektrogöç) olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilir.

A) Hidrodinamik enjeksiyon

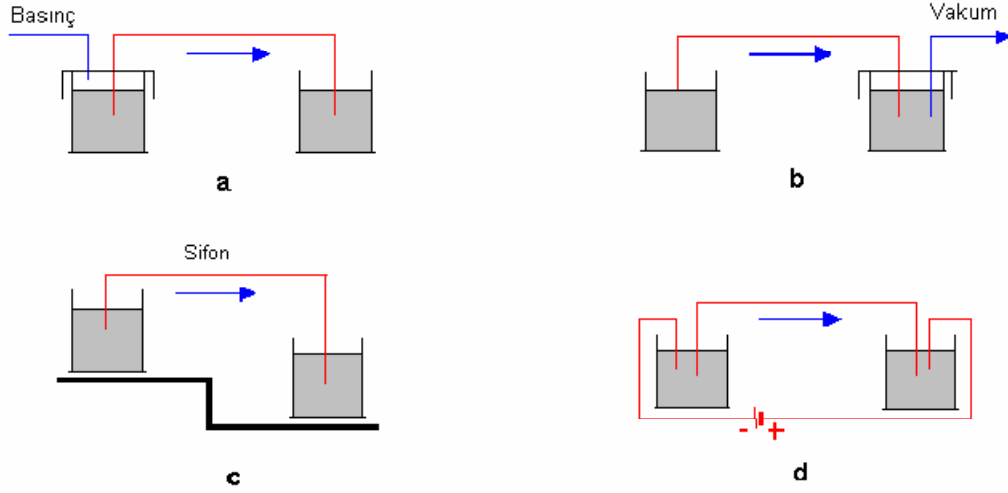
Hidrodinamik numune enjeksiyonu en yaygın kullanılan enjeksiyon yöntemidir.

Hidrodinamik enjeksiyon üç şekilde gerçekleştirilir. Bunlardan ilki, kapilerin giriş tarafına konulan numune vialine basınç uygulanmasıdır. Genelde 50 mbar civarında 1-5 s arası basınç uygulanır. Ardından numune viali çıkarılıp çalışma tamponu viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir.

Hidrodinamik enjeksiyonun ikinci yolu, numune viali kapilerin giriş kısmındayken, çıkış kısmındaki tampon vialine vakum uygulanmasıdır. Uygulanan vakumla istenen miktardaki numune kapilere girince vakum kesilir, numune viali çıkarılıp çalışma tamponu viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir.

Üçüncü hidrodinamik enjeksiyonda ise, sifon etkisinden yararlanılır. Kapilerin giriş kısmına takılan numune viali, çıkıştaki tampon vialinden daha yükseğe yerleştirilir. Yerçekiminin etkisiyle, numune kapilerin içine girer. Ardından

numune vialı çıkarılıp çalışma tamponu vialı takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir (Şekil 2.12. a,b,c) .



Şekil 2.12. Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri a, b, c) Hidrodinamik enjeksiyon, d) Elektrokinetik enjeksiyon.

B) Elektrokinetik enjeksiyon

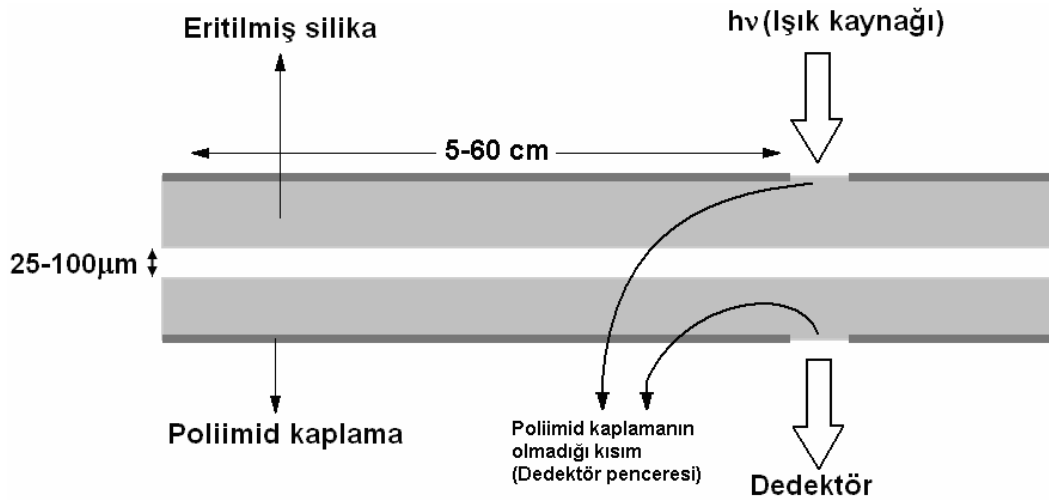
Elektrokinetik enjeksiyonda kapilerin giriş kısmına numune viali yerleştirildikten sonra, numune vialiyile çıkış kısmındaki çalışma elektrolit viali arasında voltaj uygulanır. Oluşan elektrik alanın etkisiyle numunedeki iyonlar kapiler içine göç etmeye başlar. Numune vialindeki anot (+), çıkış vialindeki katot (-) olduğundan, ilk önce numunedeki anyonlar kapilere göç eder; ardından nötral bileşikler oluşan akış nedeniyle kapilere girer ve en son katyonlar girer. Bu voltajın uygulanmasından sonra numune vialı çıkarılıp tampon vialı takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir (Şekil 2.12.d).

2.4.4.2. Kapiler

Kapiler elektroforezde kullanılacak kapilerin türü ve boyutları uygulanacak yöntem, analiz edilecek numune, istenen ayırıcılık ve uygun analiz süresine göre seçilir. İdeal kapiler materyali; elektriksel ve kimyasal olarak inert olmalı, ultraviyole/görünür bölgede geçirgen olmalı ve kırılmaya karşı dayanıklı olmalıdır.

Günümüzde en yaygın kullanılan kapiler materyali eritilmiş silikadır. Pyreks kapiler, eritilmiş silika kapilere göre daha sağlam olması ve dedektör penceresi açmaya ihtiyaç göstermemesine rağmen 280 nm'nin altında çalışılmama dezavantajına sahiptir. Teflon kapilerde ise homojen iç çap elde edilemez ve ısı iletim özelliğinin düşük olmasından dolayı yüksek voltaj uygulanamaz. Bu nedenlerden dolayı eritilmiş silika, pyreks ve teflona göre daha fazla kullanım alanı bulmaktadır.

Eritilmiş silika kolay kırıldığı için dış kısmı poliimid ile kaplanıp sağlamlaştırılmıştır. UV dedektör kullanılacak ise, ışık yolunu kapatmaması için poliimid kaplama bu bölgeden kaldırılır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Eritilmiş silika kapilerin boyuna kesiti.

Genelde iç çapı 25-100 µm olan eritilmiş silika kapiler kullanılır. Büyük çaplı kapilerde yüksek ısı açığa çıkar ve kapilerin iç duvarıyla merkezi arasındaki ısı farkı çok büyük olur. Küçük çaplı kapiler kullanılması ile UV/GB absorpsiyon veya floresans gibi dedektörlerde ışık yolunun küçülmesinden dolayı absorpsiyon düşer ve pik yüksekliği azalır. Ayrıca çok küçük çaplı kapilerin partiküllerle tıkanma olasılığı yüksektir.

Kapiler elektroforezde tekrarlanabilirlik elde etmek için en önemli parametre kapilerin şartlandırılmasıdır. Kapilerin şartlandırılmasındaki amaç, kapiler iç

çeperindeki silanol gruplarının iyonlaşma oranının, dolayısıyla EOF'nin, her analizde aynı olmasını sağlamaktır. Eğer kapiler ilk kez kullanılacak ise sırasıyla 1 N NaOH, 0.1 N NaOH, su ve çalışma elektroliti ile yıkanarak şartlandırılır. Ayrıca her analizden önce 0.1 N NaOH, su ve çalışma elektroliti ile kapiler yıkanarak kapilerin mümkün olduğunca aynı şartlanması sağlanır. Çalışma bitiminde su ile yıkama yapılmalıdır. Eğer birkaç gün çalışma yapılmayacak ise kapiler içinde mikroorganizma üreyeceği göz önüne alınarak kapilere hava çekilerek bırakılması yararlı olur. Ayrıca kapiler kuvvetli asit veya organik çözücüler ile yıkanarak da şartlandırılabilir (51).

2.4.4.3. Kapiler Termostat

Kapiler elektroforezde kapiler sıcaklığının kontrolü önemlidir. Sıcaklığın değişmesi etkinlik, göç zamanı, enjeksiyon hacmi ve dedektör cevabı üzerinde etkilidir. Ayrıca numune bozunmasına da neden olabilir. Kapiler sıcaklığının değişmemesi termostat kontrolü ile sağlanır.

2.4.4.4. Dedektör

Kapiler elektroforezin birçok tipinde ayrılan analitlerin hepsi ortak bir noktadan geçtikleri için dedektörlerin tasarımı ve fonksiyonları HPLC'de kullanılanlara benzer. Kapiler elektroforezde UV/GB absorpsiyon, floresans, kütle spektrometrisi, iletkenlik, amperometrik, radyometrik ve kırılma indisi dedektörleri kullanılmaktadır.

UV/GB absorpsiyon için dizi diyot dedektör kullanımı, pikin saflığı hakkında bilgi verir. Bu amaçla pikin çıkan, tepe ve inen kısımlarında olmak üzere alınan üç spektrum birbirleriyle karşılaştırılarak pik saflık indisi bulunur. Bu değer 1 ve 1'e yakın ise pikin tek bileşenden oluştuğu anlaşılır.

Absorpsiyon dedektörlerinde kapilerin kendisi dedektör hücresi olarak görev yapar. Bunun için erimiş silika kapilerin dış kısmındaki poliimid koruyucu kaplamanın bir kısmı yakma, çözme ve kazıma ile uzaklaştırılır. Ancak, bu durumda ışın yolunun uzunluğu kapiler iç çapından (50 ile 100 µm) fazla olamaz ve bu da derişim cinsinden gözlenebilme sınırını kısıtlar. Işın yolunun arttırılması için "z"

veya baloncuk şeklinde dedektör hücrelerine sahip kapillerler kullanılarak duyarlılık artırılabilir.

2.4.4.5. Güç Kaynağı

Kapiller üzerinde elektriksel alan elde etmek ve elektroforezi gerçekleştirmek için yüksek voltajlı güç kaynakları kullanmak gerekir. Sabit voltaj, sabit akım veya sabit güçle kontrol edilir. 40 kV üstündeki voltajlar normal koşullarda uygulanmaz, çünkü kıvılcımlarla elektrik boşalması ve kapillerin kırılması söz konusudur. Voltaj 30 kV'a kadar, akım 300 μ A'e kadar ve güç 6 W'a kadar uygulanabilir. Ayrıca gerektiği durumlarda ters faz polarite (giriş vial katot, çıkış vial anot) uygulayabilir

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Erime noktası tayin cihazı Büchi 535
- Kapiler elektroforez HP 3D-CE, UV dizi diyot dedektörlü, Bilgisayar kontrollü, 3D CE Chem Station A.08.03 (847) yazılımı yüklü
- Spektrofotometre Agilent 8453
- Santrifüj Hettich EBA 20
- Otomatik mikropipet Eppendorf 10-100 mL, 100–1000 mL
- pH metre Mettler–Toledo (0.01 pH hassasiyetli)
- Ultrasonik banyo Bandelin, Snorex Super RK 154 BH
- Hassas terazi Mettler H10 (0.1 mg hassasiyetli)
- Manyetik karıştırıcı Biosan MS 3000
- Vorteks karıştırıcı IDL RS 2
- Saf su sistemi Milli-Q Water
- Membran filtre Titan 0.45 mm
- Derin donduruculu buzdolabı Bosch

3.2. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler

- Eritilmiş silika kapiler Agilent (40.0 cm etkin uzunluk, 48.5 cm toplam uzunluk; 50 µm iç çap)
- Cam pipet (1-10 mL'lik, pyreks[®])
- Balon joje (5-1000 mL'lik, pyreks[®])
- Beher (Çeşitli hacimlerde)
- Havan (Cam)
- Vial (Cam)
- Spatül Farklı boyutlarda, metal
- Şırınga filtresi Millex[™] Millipore 0.22 µm (Selüloz)
- Otomatik pipet ucu Polipropilen, 100 – 1000 µL'lik
- Eppendorf tüp Polipropilen, 1.5 mL

3.2.1. Kullanılan Cam Malzemelerin Temizliği

Kullanılan cam malzemeler çeşme suyu, deterjanlı su ile yıkandıktan sonra çeşme suyu ile çalkalanmıştır. Daha sonra 2 M HNO₃ çözeltisi içinde en az bir gece bekletilmiş ve tekrar distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Leflunomid Sigma
- Kafein Sigma
- Sodyum dodesil sülfat Sigma, CE grade
- Borik asit Sigma, CE grade
- Metanol Merck
- Asetonitril Sigma
- Sodyum hidroksit Merck

Saflık kontrolü amacıyla, Leflunomid'in erime noktası tayini yapılmıştır.

3.4. Çalışılan Farmasötik Preparatlar

Bu çalışmada Sanofi-Aventis İlaçları Ltd. Şti.'ye ait olan Arava[®] (10, 20 ve 100 mg) tabletler kullanılmıştır. Tabletler Ankara'daki serbest eczanelerden temin edilmiştir.

3.5. Çözeltilerin Hazırlanması

Stok Leflunomid çözeltisi (1000 µg/mL): 10.0 mg standart Leflunomid tartılıp az miktar metanol ile çözüldükten sonra metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

Stok Kafein çözeltisi (1000 µg/mL) (İç Standart): 10.0 mg standart Kafein tartılıp az miktar metanol ile çözüldükten sonra metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

100 mM Borat tamponu: 0.6183 g borik asit tartılıp bir miktar suda çözüldükten sonra su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

0.1 M Sodyum hidroksit çözeltisi: 4.0 g NaOH tartılarak su ile çözüldükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır.

2 M Nitrik asit çözeltisi: Balon joje içine bir miktar su konulduktan sonra üzerine 138.9 mL derişik HNO₃ çözeltisi eklenmiş ve su ile bir litreye tamamlanmıştır.

Çalışma elektroliti (70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM borat tamponu çözeltisi): 154.6 mg borik asit ve 2.0 g SDS tartılıp 100 mL'lik balon jöjeye alınarak 50 mL su eklenmiştir. Ultrasonik banyoda çözüldürüldükten sonra bir miktar daha su eklenip pH 9.5'a 0.1 M NaOH ile ayarlandıktan sonra 100 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

Kapiler elektroforezde yönteminde kullanılacak bütün çözeltiler 0.45 µm'lık membran filtreden süzöldükten ve ultrasonik banyoda 3 dk bekletilerek çözülmüş gazlar uzaklaştırıldıktan sonra kullanılmıştır.

3.6. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

a) 10 mg ve 20 mg tablet çözeltileri: 10 adet tablet tartılıp bir havanda toz haline getirilmiştir. Bir tablete eşdeğer miktarda tartılan toz, 100 mL'lik balon jöjeye alınarak 50 mL metanol eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletilerek çözünməsi sağlandıktan sonra hacim su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

b) *100 mg tablet çözeltisi*: 1 adet tablet tartılıp bir havanda toz haline getirilmiş, 100 mL'lik balon jöjeye alınarak 50 mL metanol eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletilerek çözünmesi sağlandıktan sonra hacim su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

c) *Plasebo çözeltisi*: 65.0 mg Laktoz monohidrat, 21.0 mg mısır nişastası, 28.0 mg polividon, 17.0 mg krospovidon ve 3.0 mg magnezyum stearat karıştırılarak oluşturulan karışım 100 mL'lik balon jöjeye alınarak 50 mL metanol eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletilerek çözünmesi sağlandıktan sonra hacim su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

d) *Sentetik tablet çözeltisi*: Sentetik tabletler plasebo karışımı içerisine ticari preparatlardaki Leflunomid içeriğine uygun olarak standart Leflunomid (10.0, 20.0 ve 100.0 mg) eklenerek oluşturulmuş ve diğer tablet çözeltilerinde olduğu gibi hazırlanmıştır.

3.7. Analiz Çalışmaları

3.7.1. Kapilerin Şartlandırılması

Kapiler ilk kullanılmaya başlanırken 5 dk su ile yıkanmış ve ardından 30 dk 1 M NaOH ile şartlandırılmıştır. Kapiler, kullanılacağı her günün başlangıcında 5 dk su geçirilerek yıkanmış ardından 20 dk 0.1 M NaOH geçirilerek şartlandırılmıştır.

Her numune enjeksiyonu öncesinde sırası ile 0.1 M NaOH, distile su ve çalışma elektroliti ile 3'er dk yıkanarak kapiler yüzeyi şartlandırılmıştır. Cihaz kapatılmadan önce kapiler en az 20 dk distile su ile yıkanmış ve kapiler içi distile su ile dolu olarak bırakılmıştır.

3.7.2. Elektroforetik Koşullar

Analizi yapılacak her numuneye iç standart olarak 100 µL Kafein stok çözeltisi (1000 µg/mL) konulmuştur. Numuneler, kapiler elektroforez cihazının viallerine konulmadan önce 0.45 µm filtreden geçirilerek kapileri tıkama olasılığı bulunan partiküllerden arındırılmıştır. Ardından vialler cihaza yerleştirilmiştir. Şartlandırılması tamamlanmış olan kapilere 5 s süreyle 50 mbar basınçla

hidrodinamik olarak numune enjeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra, kapiler uçları çalışma elektrolitine daldırılmış, 20°C'de 25 kV potansiyel uygulanıp elektroforez başlatılmıştır. Analizler, HP 3D-CE marka CE sisteminde 50 µm iç çaplı eritilmiş silika kapiler kullanılarak yapılmıştır. Kapilerin toplam uzunluğu 48.5 cm, etkin uzunluğu 40.0 cm'dir. Dizi diyot dedektör kullanılarak 260 nm dalga boyunda elektroferogram elde edilmiştir.

Optimizasyon ve validasyon süreçlerinde ve farmasötik preparatların miktar tayini çalışmaları sırasında her numuneden iki kez analiz gerçekleştirilmiş ve bu analiz sonuçlarının ortalaması alınarak elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

3.7.3. Uygulanacak Kapiler Elektroforez Yönteminin Seçilmesi

Leflunomid ve Kafein'i, sırasıyla 50 µg/mL ve 100 µg/mL derişimde içeren standart çözelti ile analiz denemeleri ilk önce CZE yöntemi ile yapılmış, ayırım gerçekleşmediğinden MEKC yöntemi seçilmiştir.

3.7.4. Uygulanacak MEKC Yönteminin Optimizasyonu

Optimizasyon deneylerinde, tampon içeriği, derişimi ve pH'sı sistematik olarak değiştirilerek en uygun çalışma tamponu belirlenmiştir. Yüzey aktif madde olarak SDS kullanılmış ve optimizasyon deneyleri sırasında değişik SDS derişimleri denenerek en uygun SDS derişimi seçilmiştir.

Cihaza ait parametrelerin (kapiler kaset sıcaklığı, voltaj, enjeksiyon süresi, dalga boyu) sistematik olarak değiştirilmesi ile ayırıcılık ve özgünlük açısından en uygun şartlar belirlenmiştir. Bu çalışmalar sırasında Leflunomid derişimi 50 µg/mL ve iç standart olarak seçilen Kafein derişimi 100 µg/mL olarak sabit tutulmuştur.

3.7.5. Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

5, 10, 25, 50, 100, 125 ve 150 µg/mL Leflunomid içeren standart çözeltiler; Leflunomid'in stok çözeltisinden (1000 µg/mL) gerekli miktarlar alınıp, her bir çözeltinin içine 100 µL Kafein stok çözeltisinden (1000 µg/mL) eklendikten sonra distile su ile hacim 1000 µL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Artan derişimlerdeki bu standart çözeltiler analiz edilmiş ve elektroferogramları kaydedilmiştir. Elektroferogramlardan elde edilen pik alanı ve göç zamanı verileri Microsoft Excel® programına aktararak Leflunomid ve Kafein için pik normalizasyon (PN) değerleri hesaplanmış ve Leflunomid PN değerlerinin Kafein PN değerlerine bölünmesiyle hesaplanan PN oranları Leflunomid derişimine karşı grafiğe geçirilmiş, oluşan doğrunun denklemi, korelasyon (r), tanımlayıcılık (R^2 veya r^2) katsayıları ve diğer istatistiksel hesaplamalar (ortalama, standart sapma, standart hata, bağıl standart sapma, bağıl hata) Microsoft Excel® programı kullanılarak yapılmıştır.

3.8. Validasyon Çalışmaları

Yöntemin validasyonu için kararlılık (stabilite), doğrusallık, duyarlılık (gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı), doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve tutarlılık çalışmaları yapılmıştır (57).

Leflunomid'in kısa dönem kararlılığını belirlemek için; Leflunomid'in metanolde hazırlanmış stok (1000 µg/mL) çözeltisi oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda bu stok çözelti 50 µg/mL'ye distile su ile seyreltilip MEKC yöntemi ile üç kez analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar pik alanlarındaki değişiklikler izlenerek karşılaştırılmıştır.

Uzun dönem kararlılık çalışmalarında ise; Leflunomid'in metanolde hazırlanmış stok (1000 µg/mL) çözeltisi 4 °C'de 2 ay süreyle bekletilmiş bu sürenin başında ve sonunda bu stok çözeltiler 50 µg/mL'ye distile su ile seyreltilip MEKC yöntemi ile analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Doğrusallık aralığını belirlemek için artan Leflunomid derişimlerine karşı PN oranları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Kalibrasyon çözeltileri

günlük hazırlanmış ve analizler sırasında 6 kez ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Yöntemin doğrusallığı; kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel olarak (ANOVA testi) değerlendirilmesi ile kontrol edilmiştir. ANOVA testi ile korelasyon katsayısının önemi ve regresyon katsayılarının sıfırdan farklı olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Ayrıca olması gereken derişimlere karşı, kalibrasyon verileri kullanılarak bulunan derişimlerin grafiğe geçirilerek bir doğru elde edilip edilmemesi ile de yöntem doğrusallığı değerlendirilmiştir.

Gözlenebilme sınırı (LOD) sinyal/gürültü oranının 3; alt tayin sınırı (LOQ) ise sinyal/gürültü oranının 10 olduğu derişim saptanarak bulunmuştur.

Kesinlik ve doğruluk çalışmaları; gün içi ve günler arası olmak üzere ayrı ayrı çalışılmıştır. Bu amaçla doğrusallık aralığına giren üç derişim seviyesinde (10, 50, 125 µg/mL) tekrarlı analizler yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda; üç derişim seviyesinde ve her derişim için altı ayrı çözelti hazırlanmış, hazırlanan bu çözeltiler aynı gün içinde analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda; ard arda gelen altı ayrı günde ve üç derişimde yeni hazırlanan çözeltiler kullanılarak analizler yapılmıştır.

Tekrarlanabilirlik çalışmaları için enjeksiyon tekrarlanabilirliği ve sistem tekrarlanabilirliği incelenmiştir. Kapiler elektroforez cihazının enjeksiyon tekrarlanabilirliği için, 50 µg/mL derişimdeki standart çözelti, 10 kez enjekte edilerek elde edilen elektroferogramlarda pik alanları değerlendirilmiştir. Yöntem tekrarlanabilirliği için, 50 µg/mL derişimdeki standart çözeltilerden 10 kez hazırlanmış ve geliştirilen yöntemle analiz edilmiştir.

Yöntemin geri kazanımı; sentetik tablet çözeltilerinin tekrarlı analizleri (n=6) yapılarak belirlenmiştir. Bu amaçla bölüm 3.6.'da hazırlanışı anlatılan 20 mg Leflunomid içeren sentetik tablet çözeltilerinin analizi bölüm 3.10.1'de kapiler elektroforez yöntemi için anlatılan farmasötik preparat analizleri gibi gerçekleştirilmiştir. Bulunan miktarlardan % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Ek 1).

Özgünlük, matriks bileşenlerinin varlığında Leflunomid'in analiz sonuçlarının incelenmesi ile gösterilmiştir. Bunun için farmasötik preparat analizinde

standart, plasebo, sentetik preparat ve tablet çözeltilerinin elektroferogramları karşılaştırılarak özgünlük araştırılmıştır. Ayrıca yöntemin özgünlüğünü göstermek amacıyla standart ekleme tekniği de yapılmıştır (Bölüm 3.9.2). Standart ekleme tekniği sonucunda hesaplanan PN oranı değerleri derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu elde edilmiş, bu doğrunun regresyon denklemi çıkarılmış ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Standart ekleme tekniği ile elde edilen doğrunun eğimi, kalibrasyon doğrusunun eğimi ile karşılaştırılmıştır.

Yöntemin sağlamlık (robustness) çalışması için, yöntem parametrelerindeki (borat tamponu derişimi, SDS derişimi, pH, sıcaklık, voltaj ve dalga boyu) küçük değişimlerin (artı ve eksi yönde) analiz sonuçlarını ne kadar etkilediği araştırılmıştır.

Yöntemin tutarlılık (ruggedness) çalışması farklı bir analizci tarafından, geliştirilen MEKC yönteminde doğrusallık aralığında yer alan 50 µg/mL Leflunomid derişim seviyesinde 5 ayrı çözeltili hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde analizleri yapılmıştır. İki analizci tarafından elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek aralarında fark olup olmadığı Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile araştırılmıştır (Ek 2).

3.9. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

3.9.1. Kalibrasyon Yöntemi

Yöntem, Türkiye ilaç pazarında yer alan farmasötik preparatlardan Arava® (10, 20 ve 100 mg) tabletlere uygulanmıştır. Her bir dozaj formu için doğrusallık sınırı içerisinde olacak şekilde 6 ayrı tablet numunesi Bölüm 3.6.'da belirtildiği gibi hazırlanmış, Bölüm 3.7.2'deki gibi analizleri gerçekleştirilmiş ve analizler sonucunda elde edilen elektroferogramlardan PN oranı değerleri bulunmuş ve Bölüm 3.7.5'de belirtilen kalibrasyon doğrusuna ait doğru denklemeden yararlanarak tablet içeriğinde bulunan Leflunomid derişimi hesaplanmıştır.

3.9.2. Standart Ekleme Yöntemi

Hazırlanmış Leflunomid tablet çözeltilerinden (200 µg/mL) 250 µL' lik kısımlar 4 farklı vialde alınmıştır. İlk vialde standart Leflunomid eklenmemiş,

diğerlerine Leflunomid standart stok çözeltilisinden (1000 µg/mL) artan hacimlerde (25, 50, 75 µL) eklenmiştir. Her dört vialde Kafein (1000 µg/mL) stok çözeltilisinden 100 µL eklenmiş ve distile su ile hacim 1000 µL'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan çözeltiler geliştirilen MEKC yöntemi ile analiz edilmiştir. Hesaplanan PN oranları çözeltilerdeki standart madde derişimine (0, 25, 50, 75 µg/mL) karşı grafiğe geçirilmiştir. Grafikte elde edilen doğru, x eksenini negatif yönde kesmiştir. Bu noktanın mutlak değeri numunedeki madde derişimini vermiştir.

Ayrıca standart ekleme ve kalibrasyon ile elde edilen doğrularının eğimleri karşılaştırılmıştır.

3.10. Karşılaştırma Yöntemi

Leflunomid'in farmasötik preparatlardan analizinde karşılaştırma yöntemi olarak Amerikan Farmakopesi'nde (USP 32) bulunan HPLC yöntemi kullanılmıştır (18). Bu yöntemde hareketli faz olarak asetonitril:su (50:50 h/h) karışımı; kolon olarak Zorbax XDB C18 (150 x 4.6 mm i.ç., 5 µm) kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk ve dedektör dalga boyu 260 nm'dir. Enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. İç standart olarak kafein kullanılmıştır. Leflunomid (1000 µg/mL), kafein (1000 µg/mL) standart stok çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrisi için 25-150 µg/mL Leflunomid ve 30 µg/mL kafein içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Farmasötik preparat analizinde, 10 adet tablet tartılarak havanda toz haline getirilmiştir. Bir tablete eşdeğer miktarda tartılan toz 100 mL'lik balon jøjeye aktarılarak üzerine yaklaşık 50 mL metanol eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra hacim metanol ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden bir miktar santrifüj tüpüne aktarılarak 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Uygun hacimdeki berrak santrifügat vialde aktarılmış, üzerine 20 µL stok iç standart çözeltilisinden eklenerek hareketli faz ile 1000 µL'ye tamamlanmıştır. Kalibrasyon eğrileri, derişime karşı pik alan oranları (pik alanı Leflunomid/pik alanı Kafein) grafiğe geçirilerek oluşturulmuştur.

Geliştirilen MEKC yöntemi ile karşılaştırma yönteminin (HPLC yöntemi) (10, 20 ve 100 mg) farmasötik preparatlara uygulanması sonucu elde edilen değerler arasında fark olup olmadığı istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Ek 2).

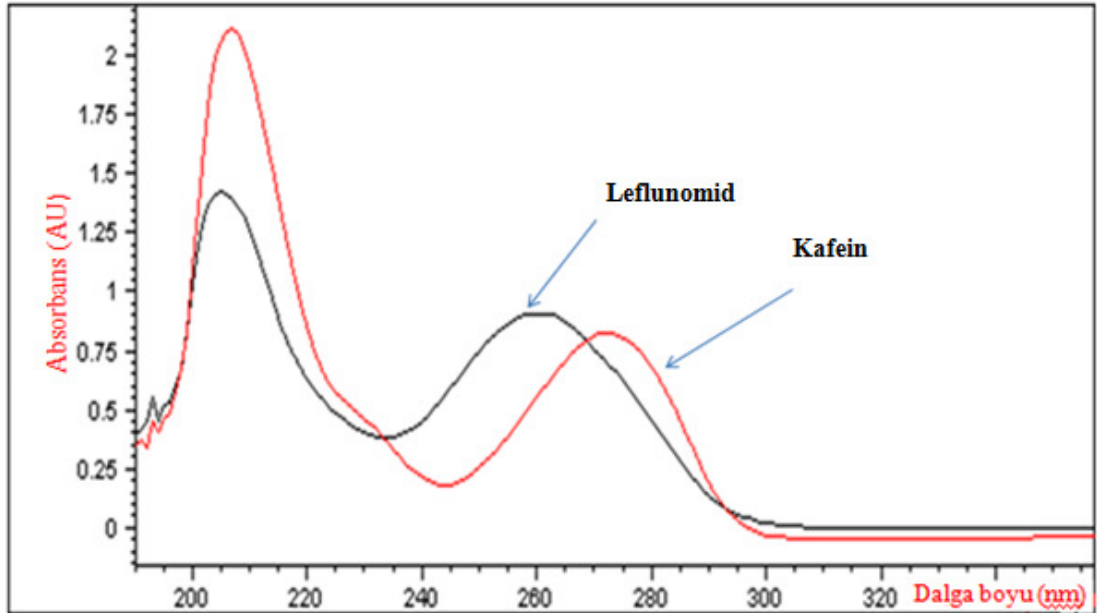
4. BULGULAR

4.1. Saflık Kontrolü

Leflunomid'in erime noktası 165.8 °C olarak tayin edilmiştir. Bu değer literatürdeki bilgilerle uyşmaktadır (18).

4.2. Leflunomid'in ve Kafein'in Dalga Boyu Taraması

Leflunomid'in ve Kafein'in 1000 µg/mL'lik stok çözeltilerinden 10 µg/mL'lik çözeltiler metanolde hazırlanarak 200-400 nm arasında UV spektrumları alınmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Leflunomid ve Kafein'in UV spektrumları.

4.3. Optimum Yöntem Parametrelerinin Belirlenmesi

4.3.1. İç Standart Seçimi

Leflunomid'in MEKC yöntemi ile tabletlerden miktar tayini için öncelikle iç standart seçimi yapılmıştır. Bu amaçla Kafein, Parasetamol, Diflusinal ve Meloksikam denenmiş, bunlardan Kafein kısa göç zamanı ve düzgün pik şekli açısından uygun iç standart özelliği göstermiş ve Kafein'in iç standart olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3.2. Çalışma Elektrolitine Ait Parametreler

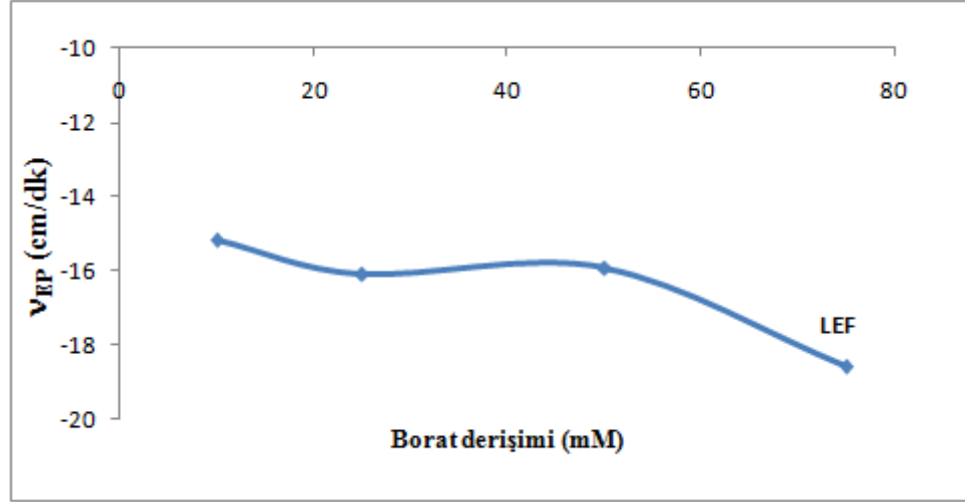
Leflunomid'in kapiler elektroforez yöntemi ile analizinde çalışma tamponuna ve cihaza ait parametreler denenerek en uygun koşullar araştırılmıştır. Bu çalışmalar sırasında, Leflunomid'in ve iç standart olarak seçilen Kafein'in derişimi sırası ile 50 µg/mL ve 100 µg/mL olarak alınmıştır.

Öncelikle kapiler zon elektroforez (CZE) yöntemi ile farklı tampon çözeltiler (pH: 4.0 sitrat, pH: 7.0 fosfat ve pH: 9.5 borat tampon çözeltileri) kullanılarak asidik, nötral ve bazik pH' larda analiz denemeleri yapılmıştır. Ancak Leflunomid'e ait herhangi bir pik gözlenmemiştir.

Bu nedenle analiz yöntemi olarak MEKC yönteminin denenmesine karar verilmiştir.

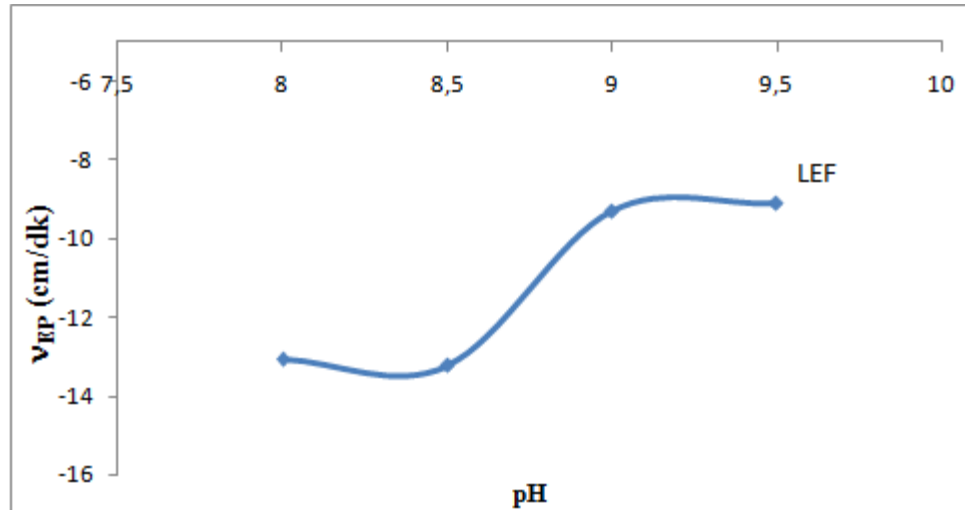
Çeşitli tampon çözeltiler (pH: 4.0 sitrat, pH: 7.0 fosfat ve pH: 9.5 borat tampon çözeltileri) denenerek en iyi ayırımın borat tamponunda elde edildiği görülmüştür.

Borat tamponu derişiminin Leflunomid'in analizi üzerindeki etkisi 10-75 mM aralığında denenmiş ve uygun borat tamponu derişimi 25 mM olarak seçilmiştir (Şekil 4.2).



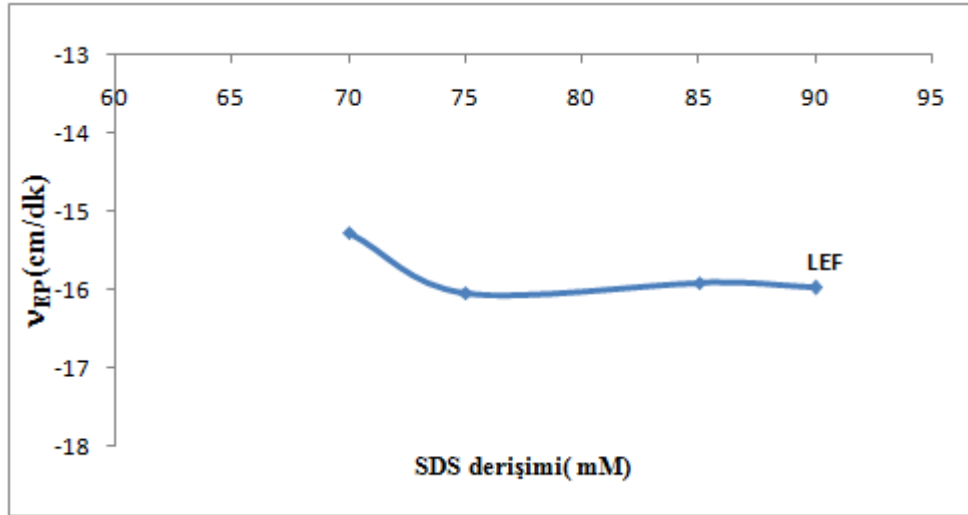
Şekil 4.2. Çalışma tamponu derişiminin elektroforetik hız üzerine etkisi [Koşullar : 75 mM SDS içeren pH 9.5 borat tamponu. t_{enj} = 5 s, P_{enj} = 50 mbar, V = 25 kV, T = 20°C, λ = 260 nm, Leflunomid derişimi: 50 μ g/mL, Kafein derişimi: 100 μ g/mL].

Leflunomid analizinde pH'nın etkisi 25 mM borat çözeltisinin pH'sı 7-11 aralığında (Şekil 4.3) değiştirilerek incelenmiştir. pH 7, 7.5, 10 ve 11'deki veriler değerlendirilememiştir. Yapılan deney sonuçlarına göre en iyi pik şekli pH 9.5 25 mM borat tamponunda gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Çalışma tamponu pH'sının elektroforetik hız üzerine etkisi [Koşullar : 75 mM SDS içeren 25 mM borat tamponu. t_{enj} = 5 s, P_{enj} = 50 mbar, V = 25 kV, T =20°C, λ = 260 nm, Leflunomid derişimi: 50 μ g/mL, Kafein derişimi: 100 μ g/mL].

Uygun SDS derişiminin belirlenmesinde 25-90 mM aralığında SDS içeren pH 9.5 25 mM borat tamponu ile yapılan deneyler sonucunda optimum SDS derişiminin 70 mM bulunmuştur (Şekil 4.4).

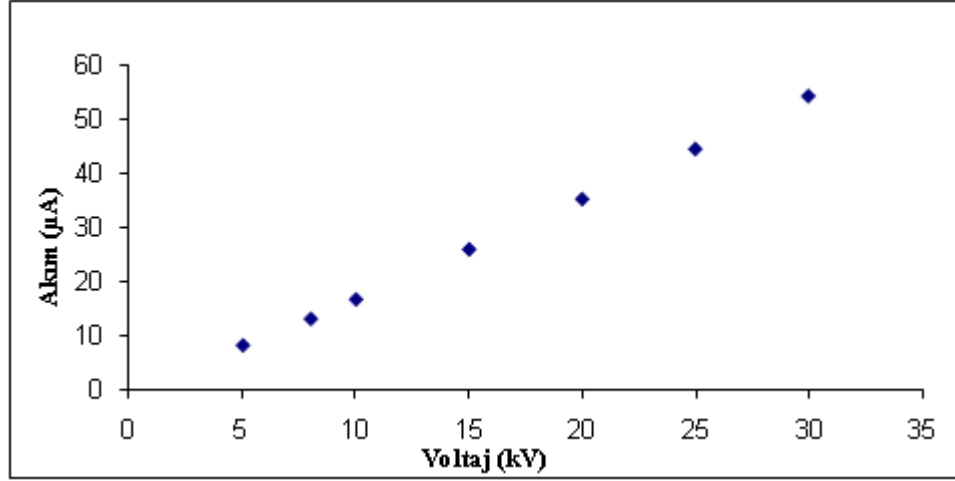


Şekil 4.4. Çalışma tamponuna eklenen SDS derişiminin elektroforetik hız üzerine etkisi [Koşullar : pH 9.5 25 mM borat tamponu. $t_{enij} = 5$ s, $P_{enij} = 50$ mbar, $V = 25$ kV, $T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 260$ nm, Leflunomid derişimi: 50 $\mu\text{g/mL}$, Kafein derişimi: 100 $\mu\text{g/mL}$].

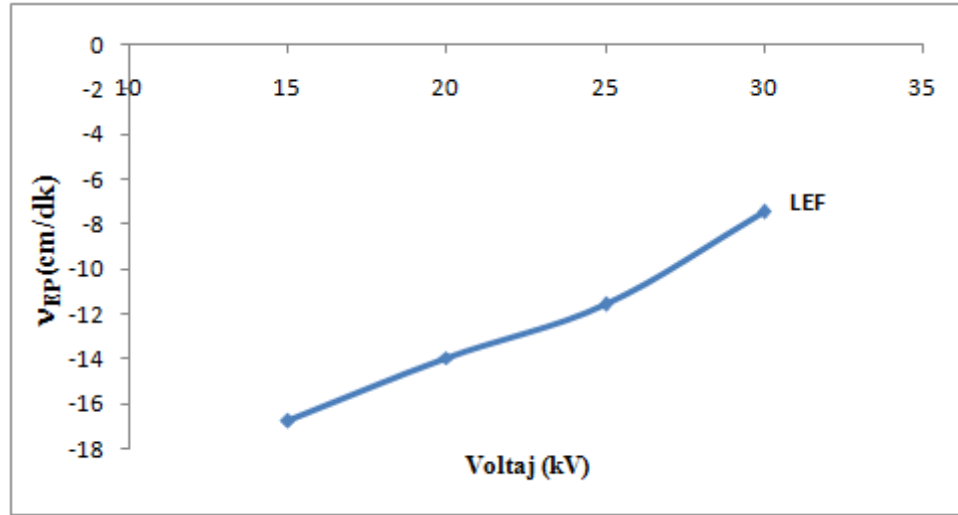
70 mM SDS içeren 25 mM pH 9.5 borat tamponuna sırasıyla % 5, 10 ve 15 oranlarında eklenen organik çözücülerin (asetonitril ve metanol) analiz üzerine etkileri incelenmiştir. Eklenen organik çözücüler göç zamanı ve pik şekli üzerine olumlu etki yapmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle çalışma tamponuna organik çözücü eklenmemesine karar verilmiştir.

4.3.3. Cihaza Ait Parametreler

Çalışmalarda uygulanacak maksimum voltajı belirlemek için voltaja karşı akım (Şekil 4.5) ve elektroforetik hız (Şekil 4.6) grafikleri çizilmiş ve uygulanacak voltaj 25 kV olarak seçilmiştir.

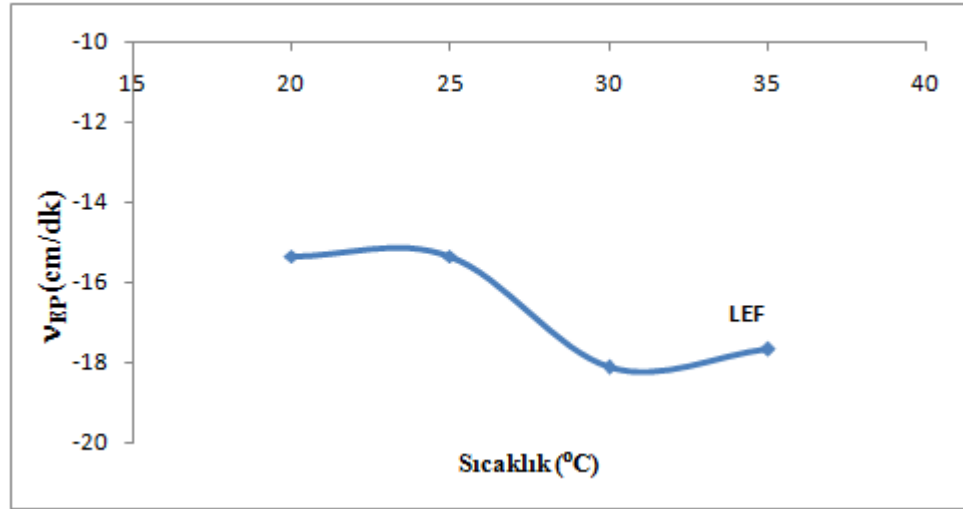


Şekil 4.5. Çalışma tamponuna uygulanan voltaja karşı akım ilişkisi.



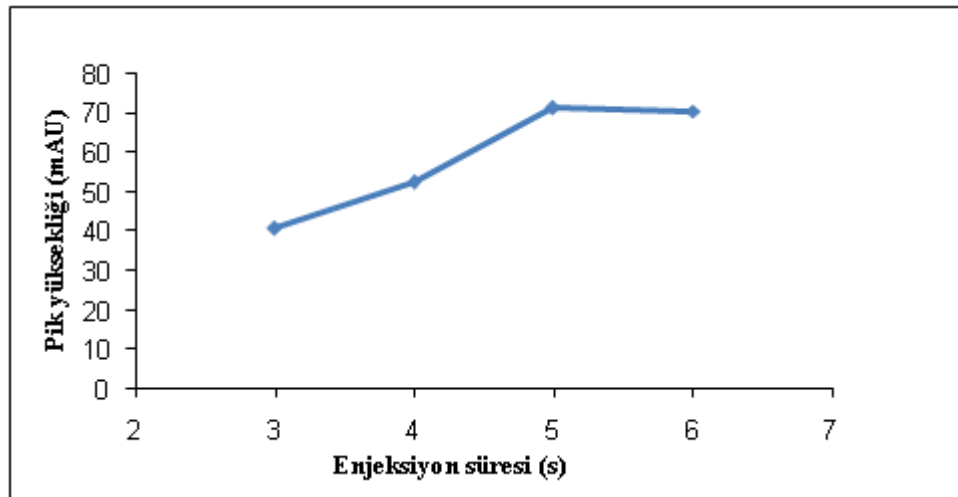
Şekil 4.6. Çalışma voltajının elektroforetik hız üzerine etkisi [Koşullar: 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM borat tamponu. $t_{enj}= 5$ s, $P_{enj}= 50$ mbar, $T = 20^{\circ}C$, $\lambda= 260$ nm, Leflunomid derişimi: 50 µg/mL, Kafein derişimi: 100 µg/mL].

Kapilerin çalışma sıcaklığı olarak 20°C, 25 °C, 30°C ve 35°C denenerek en uygun sıcaklık olarak 20°C olarak seçilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Çalışma sıcaklığının elektroforetik hız üzerine etkisi [Koşullar : 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM borat tamponu. t_{enj} = 5 s, P_{enj} = 50 mbar, V = 25 kV, λ = 260 nm, Leflunomid derişimi: 50 μ g/mL, Kafein derişimi: 100 μ g/mL].

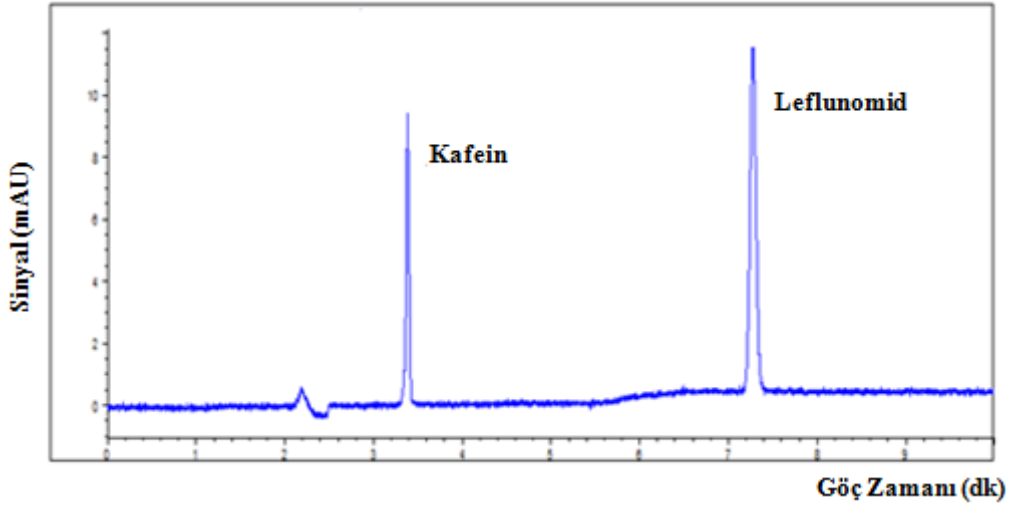
Enjeksiyon süresini belirlemek amacıyla, hidrodinamik enjeksiyonla 50 mbar sabit basınç uygulanarak farklı enjeksiyon süreleri denenmiş ve en uygun enjeksiyon süresinin 5 s olduğuna karar verilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Enjeksiyon süresinin pik yüksekliği üzerine etkisi [Koşullar: 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM borat tamponu. t_{enj} = 5 s, P_{enj} = 50 mbar, V = 25 kV, T = 20°C, λ = 260 nm, Leflunomid derişimi: 50 μ g/mL, Kafein derişimi: 100 μ g/mL].

Dizi diyot dedektör kullanılarak aynı analiz 205 ve 260 nm dalga boylarında gerçekleştirilmiş kesinlik, doğruluk ve duyarlılık açısından en uygun dalga boyunun 260 nm olduğu görülmüştür.

Çalışma tamponu ve cihaz parametreleri için optimum koşullar; 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM borat tamponu çalışma elektroliti, 50 mbar 5 s enjeksiyon süresi, 25 kV voltaj uygulaması, 20 °C çalışma sıcaklığı ve 260 nm (bant genişliği ± 10 nm) dalga boyu olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda Leflunomid'in 7.25 ± 0.01 dk, Kafein'in 3.45 ± 0.01 dk ve EOF'yi gösteren metanolün 2.21 ± 0.03 dk göç zamanına sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Optimum koşullarda yapılan analiz sonucu elde edilen elektroferogram
[Leflunomid derişimi: 50 μ g/mL, Kafein derişimi: 100 μ g/mL].

Standart Leflunomid ve Kafein çözeltilerinin tekrarlı analizleri sonucu elde edilen verilerin değerlendirilmesine ait sonuçlar Tablo 4.1'de yer almaktadır.

Tablo 4.1. Leflunomid ve Kafein pikleri ile ilgili bilgiler (n=10).

	Leflunomid (50 µg/mL)	Kafein (100 µg/mL)
Göç zamanı (dk)	7.25 ± 0.01	3.45 ± 0.01
Pik alanı	36.11±0.20	17.39±0.08
Kapasite faktörü (k')	2.78	0.78
Pik genişliği (dk)	0.09	0.05
Pik yüksekliği (mAU)	7.83±0.03	6.60±0.03
Pik simetrisi	0.97±0.02	0.98±0.05
Pik saflık indisi	1.00±0.02	1.00±0.01
Seçicilik (α)	3.92 ± 0.04	
Ayırıcılık (R)*	50.81 ± 1.09	
Teorik tabaka sayısı (N)	30783.40±1356.28	23067.50±3228.28

Sonuçlar ortalaması±standart hata şeklinde verilmiştir. *Ayırıcılık Leflunomid ve Kafein pikleri arasındaki değerdir.

4.4. MEKC Yönteminin Validasyonu

A. Analit Çözeltilerinin Kararlılığı

Leflunomid'in çözelti kararlılığı Bölüm 3.8'de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve elde edilen kararlılık sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir.

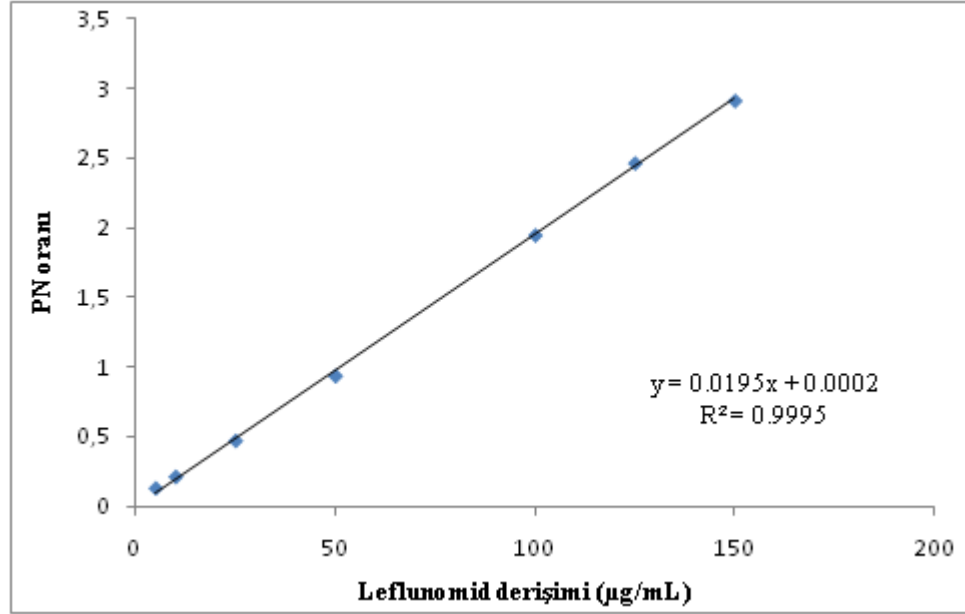
Tablo 4.2. Leflunomid' in MEKC yöntemi ile elde edilen kararlılık bulguları (n=3).

	Kısa dönem kararlılık (24 saat, 25°C)		Uzun dönem kararlılık (2 ay, 4°C)	
	% Kalan	BSS (%)	% Kalan	BSS (%)
Leflunomid	99.79±0.58	1.01	100.52±0.65	1.12

% Kalan= (Belirtilen süre sonunda çözeltideki Leflunomid pik alanı/Başlangıçtaki çözeltinin Leflunomid pik alanı) x 100 (Leflunomid derişimi: 50 µg/mL)

B. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı

Leflunomid derişimine karşı PN oranı (Leflunomid PN'nun Kafein PN'na oranı) grafiğe geçirildiğinde 5-150 µg/mL aralığında kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğu bulunmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Leflunomid'in MEKC yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Elde edilen kalibrasyon doğrusunun özellikleri ve ANOVA analiz sonuçları Tablo 4.3'de verilmiştir.

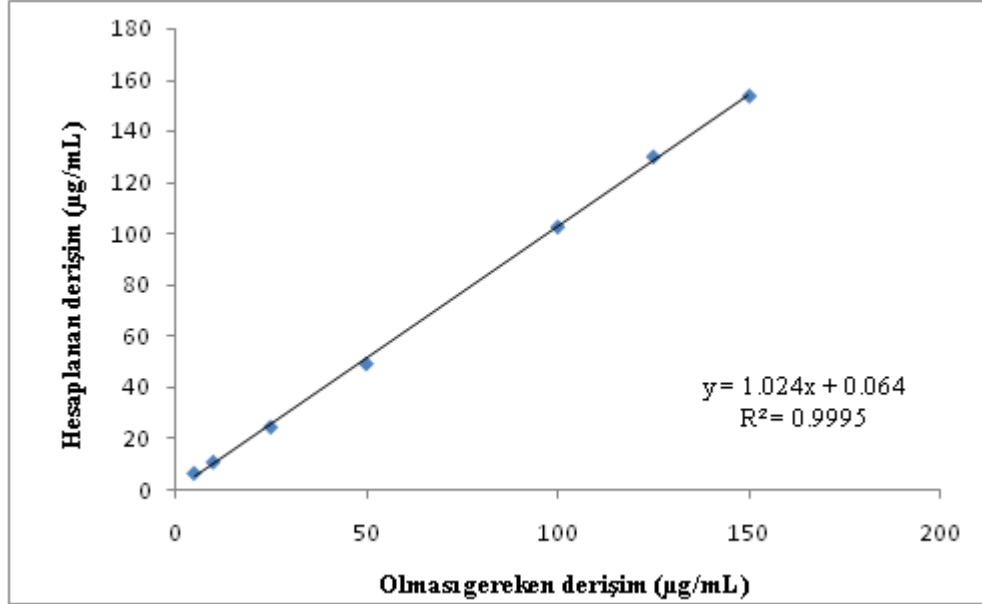
Tablo 4.3. MEKC yöntemine ait kalibrasyon doğrusunun özellikleri (n=10).

Kalibrasyon Denklemi*	$y = 0.0195x + 0.0002$
Tanımlayıcılık katsayısı (R^2)	0.9995
Korelasyon katsayısı (r)	0.9997
Eğimin standart hatası	0.0017
Kesişimin standart hatası	0.0002
Doğrusallık aralığı (µg/mL)	5-150
Gözlenebilme sınırı (LOD) (µg/mL)	2
Alt tayin sınırı (LOQ) (µg/mL)	5
P**	0.9902 > 0.05
F***	$F_{hesap} = 9864.85 > F_{tablo} = 2.53$

* $y = ax + b$ (y PN oranı, x : Leflunomid derişimi (µg/L), a Eğim, b : Kesişim)

** Kesişimin p değeri, *** Korelasyon katsayısının F değeri

Yöntemin doğrusallığının kontrolü amacıyla, kalibrasyon eğrisinin oluşturulduğu derişimlerdeki standart çözeltilerin analizleri yapıp kalibrasyon eğrisi denklemi ile sonuçlar hesaplanıp olması gereken derişimlere karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Leflunomid'in; MEKC yöntemine ait yöntem doğrusallığının kontrol grafiği (n=6).

C. Duyarlılık

Leflunomid'in MEKC yöntemi ile tayininde sinyal/gürültü: 3 ve sinyal/gürültü: 10 olduğu gözlenebilir sınırlar (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) için derişim değerleri sırasıyla 2 µg/mL ve 5 µg/mL olarak bulunmuştur (Tablo 4.3).

D. Doğruluk

Leflunomid'in MEKC yöntemi ile tayini için 10, 50 ve 125 µg/mL derişimlerinde yapılan doğruluk çalışmasına ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Tablo 4.4' de verilmiştir.

Doğruluk için geliştirilen MEKC yöntemine ait geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bunun için 20 mg Leflunomid içeren sentetik tablet çözeltilerinden Leflunomid miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen geri kazanım değerleri Tablo 4.5' de verilmiştir.

Tablo 4.4. MEKC yöntemine ait gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları (n=6).

Leflunomid miktarı (µg/mL)	Gün içi*		Günler arası**	
	Bulunan miktar (µg/mL)	% Bağlı hata	Bulunan miktar (µg/mL)	% Bağlı hata
10.00	9.88	1.20	9.84	1.61
	10.13	-1.34	9.92	0.82
	9.80	2.00	10.13	-1.34
	9.86	1.35	9.88	1.20
	9.84	1.61	10.13	-1.34
	9.92	0.82	9.88	1.20
	$\bar{x} \pm SH = 9.91 \pm 0.05$ SS = 0.12 BSS = % 1.19		$\bar{x} \pm SH = 9.96 \pm 0.05$ SS = 0.13 BSS = % 1.34	
50.00	50.07	-0.14	49.18	1.65
	49.80	0.40	50.07	-0.14
	50.14	-0.27	49.79	0.42
	49.81	0.37	49.61	0.78
	50.10	-0.19	48.56	0.89
	50.06	-0.12	50.14	-0.27
	$\bar{x} \pm SH = 50.00 \pm 0.06$ SS = 0.15 BSS = % 0.29		$\bar{x} \pm SH = 49.56 \pm 0.24$ SS = 0.6 BSS = % 1.21	
125.00	125.47	-0.38	125.22	-0.18
	124.95	0.04	124.95	0.04
	125.03	-0.02	125.03	-0.02
	124.73	0.21	125.08	-0.06
	125.08	-0.06	124.91	0.07
	124.91	0.07	124.73	0.21
	$\bar{x} \pm SH = 125.03 \pm 0.10$ SS = 0.25 BSS = % 0.19		$\bar{x} \pm SH = 124.99 \pm 0.07$ SS = 0.17 BSS = % 0.13	

*Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

**Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

Tablo 4.5. MEKC yöntemine ait geri kazanım değerleri.

Eklenen Leflunomid miktarı (mg/tablet)	Bulunan Leflunomid miktarı (mg/tablet)	Geri Kazanım (%)
20	19.68	98.40
	19.85	99.85
	20.03	100.15
	19.79	98.95
	20.38	101.90
	19.97	99.85
	$\bar{x} \pm SH = 19.95 \pm 0.10$ SS = 0.25 BSS = % 1.23	$\bar{x} \pm SH = 99.75 \pm 0.50$ SS = 1.23 BSS = % 1.23

E.Kesinlik

Leflunomid'in MEKC yöntemi ile tayini için 10, 50 ve 125 µg/mL derişimlerinde yapılan kesinlik çalışmasına ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Tablo 4.4' de verilmiştir.

Tekrarlanabilirlik enjeksiyon ve sistem tekrarlanabilirliği olmak üzere 2 şekilde incelenmiştir. Kapiler elektroforez cihazının enjeksiyon tekrarlanabilirliği için 50 µg/mL Leflunomid ve 100 µg/mL Kafein içeren aynı çözeltiden aynı gün içinde 10 tekrarlı analiz yapılmış, göç zamanı, pik alanı ve pik yüksekliği değerlendirilmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. MEKC yöntemine ait enjeksiyon tekrarlanabilirliği verileri.

	Leflunomid*		Kafein**	
	Göç zamanı (dk)	Pik alanı	Göç zamanı (dk)	Pik alanı
1	7.26	35.70	3.46	17.15
2	7.30	35.10	3.46	17.20
3	7.27	35.10	3.40	17.25
4	7.21	35.50	3.48	17.40
5	7.23	35.01	3.42	17.00
6	7.27	35.80	3.49	17.30
7	7.20	36.40	3.40	17.20
8	7.21	35.60	3.47	17.40
9	7.23	36.00	3.45	17.20
10	7.23	35.50	3.49	17.10
$\bar{x} \pm SH$	7.25 ± 0.01	35.57 ± 0.14	3.45 ± 0.01	17.22 ± 0.04
SS	0.08	0.44	0.03	0.13
BSS	% 0.45	% 1.23	% 0.99	% 0.73

*Leflunomid derişimi: 50 µg/mL, **Kafein derişimi: 100 µg/mL

Sistem tekrarlanabilirliği çalışmaları sırasında, optimum koşullarda 50 µg/mL Leflunomid ve 100 µg/mL Kafein içeren 10 ayrı numune çözeltisi analiz edilmiş ve göç zamanı, pik alanı ve pik yüksekliği değerlendirilmiştir (Tablo 4.7).

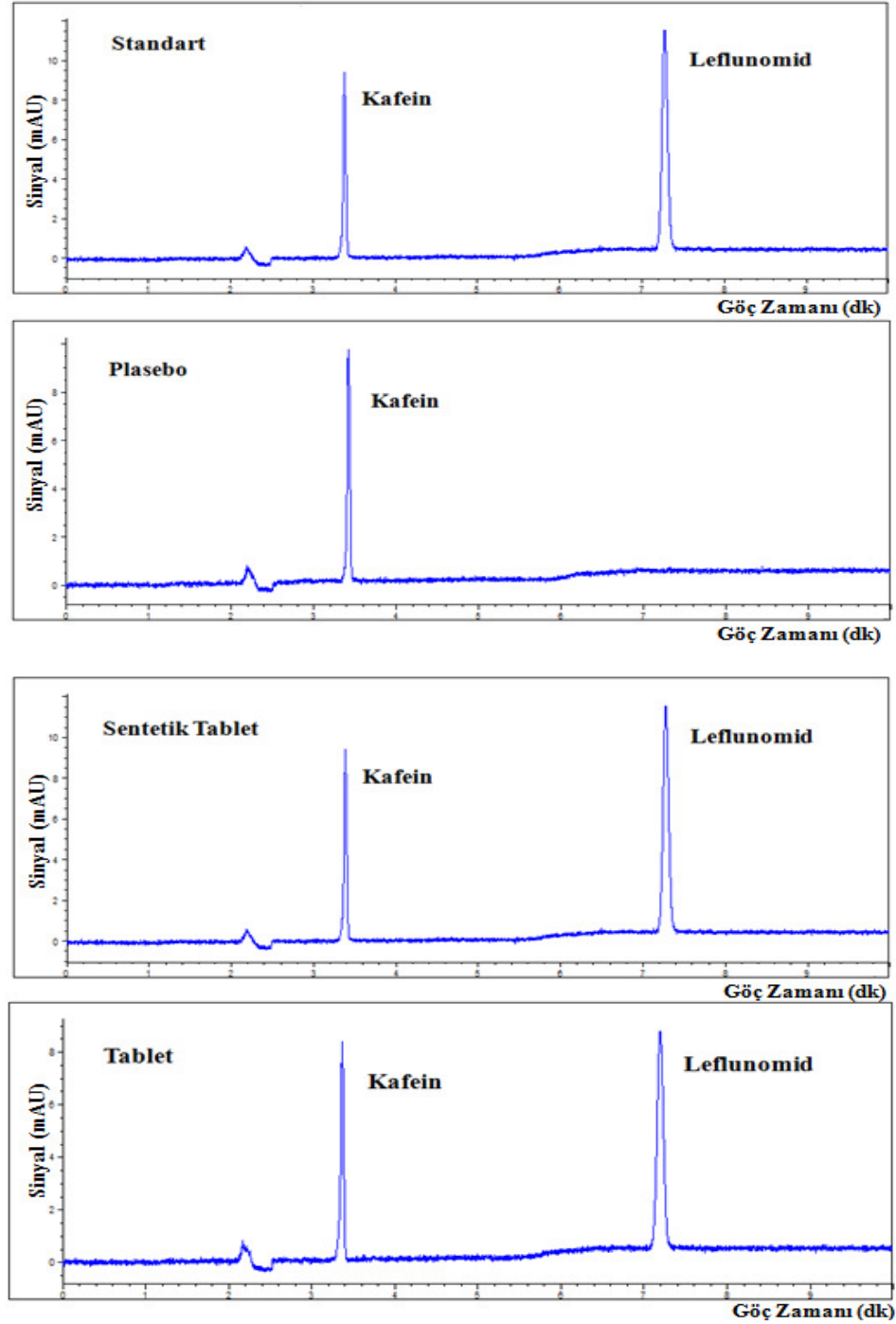
Tablo 4.7. MEKC yöntemine ait sistem tekrarlanabilirliği verileri.

	Leflunomid*		Kafein**	
	Göç zamanı (dk)	Pik alanı	Göç zamanı (dk)	Pik alanı
1	7.29	36.50	3.42	17.50
2	7.26	36.80	3.45	17.60
3	7.22	36.60	3.49	17.40
4	7.24	35.80	3.40	17.50
5	7.24	36.70	3.41	17.60
6	7.28	36.70	3.49	17.60
7	7.27	35.90	3.49	17.50
8	7.26	35.80	3.40	17.30
9	7.24	35.10	3.49	16.90
10	7.21	35.15	3.48	17.00
$\bar{x} \pm SH$	7.25 ± 0.01	36.11 ± 0.20	3.45 ± 0.01	17.39 ± 0.08
SS	0.03	0.65	0.04	0.25
BSS %	% 0.36	% 1.79	% 1.16	% 1.45

*Leflunomid derişimi: 50 µg/mL, **Kafein derişimi: 100 µg/mL

F. Özgünlük

Geliştirilen MEKC yönteminin özgünlüğünün belirlenmesi için standart çözeltiler ile plasebo, sentetik tablet ve tablet çözeltilerinin elektroferogramları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. MEKC yöntemi ile standart, plasebo, sentetik tablet ve tablet çözeltilerinden elde edilen elektroferogramlar [Koşullar : 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM Borat tamponu. t_{enj} = 5 s, P_{enj} = 50 mbar, V = 25 kV, T = 20°C, λ = 260 nm] Leflunomid derişimi: 50 μ L/mL, Kafein derişimi: 100 μ L/mL.

G. Sağlamlık

Geliştirilen MEKC yönteminin sağlamlık çalışmaları için çalışma tamponuna ait parametreler (pH, borat tamponu ve SDS derişimi) ve cihaza ait parametrelerde (voltaj, sıcaklık ve dalga boyu) her seferinde tek bir parametrede küçük değişiklikler yapılarak (artı ve eksi yönde) bu değişikliklerin analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. Her bir değişiklikle yapılan analiz sonuçları optimum koşullarda bulunan analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen değerler t testi (Ek 2) ile istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve sonuçlar Tablo 4.8’de verilmiştir

Tablo 4.8. MEKC yöntemine ait sağlamlık bulguları (n=3).

	Bulunan Leflunomid miktarı (µg/mL)**	BSS (%)	t_{hesap}***
Optimum koşullar*	50.04±0.04	0.15	-
Tampon pH 9.4	50.59±0.32	1.10	1.13
Tampon pH 9.6	50.33±0.26	0.90	0.72
Borat tamponu derişimi 24 mM	50.00±0.32	1.11	0.08
Borat tamponu derişimi 26 mM	50.07±0.47	1.63	0.04
SDS derişimi 69 mM	50.20±0.34	1.17	0.03
SDS derişimi 71 mM	49.93±0.36	1.26	0.19
Voltaj 24 kV	50.20±0.23	0.78	0.45
Voltaj 26 kV	50.33±0.46	1.57	0.42
Kapiler sıcaklığı 19°C	50.26±0.17	0.60	0.83
Kapiler sıcaklığı 21°C	50.00±0.11	0.39	0.22
Dalga boyu 259 nm	49.74±0.17	0.60	1.13
Dalga boyu 261 nm	49.67±0.24	0.82	1.02
İstatistiksel karşılaştırma: Her bir sonuç, optimum şartlarda bulunan sonuçlarla karşılaştırılmıştır. $t_{\text{tablo}} = 2.78$ ($p > 0.05$) Sonuçlar arasında fark yoktur.			

*Koşullar : 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM borat tamponu. $t_{\text{enj}} = 5$ s, $P_{\text{enj}} = 50$ mbar, $V = 25$ kV, $T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 260$ nm, Leflunomid derişimi: 50 µL/mL, Kafein derişimi: 100 µL/mL.

**Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

***İstatistiksel karşılaştırma t testi ile yapılmıştır (Hesaplamalar için Ek 1 ve Ek 2’ye bakınız.). (t_{hesap}: Hesapla bulunan t değeri).

H. Tutarlılık

Tutarlılık çalışmalarında doğrusalık aralığına giren bir derişim düzeyinde (50 µg/mL Leflunomid) farklı iki analizci tarafından yapılan analiz sonuçları karşılaştırılmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. MEKC yöntemine ait tutarlılık bulguları.

1. Analizci Bulunan Leflunomid miktarı (µg/mL)	2. Analizci Bulunan Leflunomid miktarı (µg/mL)
49.58	50.03
50.32	50.00
49.25	49.42
50.50	50.86
50.53	50.08
50.13	50.18
$\bar{x} \pm SH = 50.05 \pm 0.23$ SS = 0.52 BSS = % 1.05	$\bar{x} \pm SH = 50.10 \pm 0.21$ SS = 0.46 BSS = % 0.92
İki analizcinin bulguları için Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi uygulanmıştır. $T_H=8.5 > T_T=2$, $p < 0.05$ Sonuçlar arasında istatistiksel fark yoktur.	

4.5. Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları

Farmasotik preparatlardan Leflunomid' in analizi geliştirilen MEKC yöntemi ile yapılmış (Tablo 4.10) ve sonuçlar USP 32'de bulunan ters faz/HPLC (18) ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.11).

Tablo 4.10. MEKC yöntemi ile elde edilen farmasötik preparat analiz sonuçları.

Bulunan Leflunomid miktarı (mg/tablet)		
Arava® 10 mg film tablet	Arava® 20 mg film tablet	Arava® 100 mg film tablet
9.91	20.35	99.87
9.90	20.48	101.61
9.87	20.64	100.16
10.15	20.09	99.73
9.71	19.85	102.05
10.07	20.29	100.58
$\bar{x} \pm SH = 9.94 \pm 0.06$ SS = 0.16 BSS = % 1.59	$\bar{x} \pm SH = 20.28 \pm 0.11$ SS = 0.28 BSS = % 1.38	$\bar{x} \pm SH = 100.67 \pm 0.39$ SS = 0.96 BSS = % 0.95

Tablo 4.11. Farmasötik preparat analiz sonuçlarının karşılaştırılması (n=6).

Farmasötik preparat adı	Preparat içeriğinde belirtilen Leflunomid miktarı (mg/tablet)	Bulunan Leflunomid miktarı (mg/tablet)		İstatistiksel karşılaştırma (Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi)
		Geliştirilen MEKC yöntemi	Karşılaştırma yöntemi (18)	
Arava® 10 mg film tablet	10	$\bar{x} \pm SH = 9.94 \pm 0.06$ SS = 0.16 BSS = % 1.59	$\bar{x} \pm SH = 10.09 \pm 0.07$ SS = 0.17 BSS = % 1.69	$T_{hesap} = 1 > T_{tablo} = 0$ (p < 0.05)
Arava® 20 mg film tablet	20	$\bar{x} \pm SH = 20.28 \pm 0.11$ SS = 0.28 BSS = % 1.38	$\bar{x} \pm SH = 19.97 \pm 0.13$ SS = 0.22 BSS = % 1.12	$T_{hesap} = 1.5 > T_{tablo} = 0$ (p < 0.05)
Arava® 100 mg film tablet	100	$\bar{x} \pm SH = 100.67 \pm 0.39$ SS = 0.96 BSS = % 0.95	$\bar{x} \pm SH = 100.06 \pm 0.13$ SS = 0.31 BSS = % 0.31	$T_{hesap} = 5 > T_{tablo} = 0$ (p < 0.05)

4.6. Standart Ekleme Yöntemi

Geliştirilen MEKC yöntemi ile farmasötik preparat analizi, standart ekleme yöntemi ile de yapılmıştır. PN oranları eklenen standart Leflunomid derişimine karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi $y = (0.0196 \pm 0.0003)x + (1.0133 \pm 0.001)$, $r=0.9999$ ($n=3$) şeklinde bulunmuştur. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen doğru denkleminin eğimi kalibrasyon doğrusunun eğimine çok yakın bulunduğundan yardımcı maddelerin analizi etkilemediği görülmüş ve farmasötik preparat analizleri kalibrasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

5. TARTIŞMA

Leflunomid içeren farmasötik preparatlar romatoid artrit tedavisinde hastalığı modifiye edici ve bağışıklık sistemini güçlendirici olarak kullanılmaktadır. Kaynak araştırması sırasında Leflunomid'in farmasötik preparattan analizine yönelik herhangi bir kapiler elektroforez yönteminin uygulamasına rastlanmamıştır. Bu nedenle kaynaklara katkı sağlayacağı düşünülerek Leflunomid'in farmasötik preparattan analizi için kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmesi ve bu yöntemin validasyon çalışmaları yapılarak farmasötik preparatlara uygulanması tez çalışmasının konusu olarak belirlenmiştir.

5.1. Analiz Yönteminin Seçimi

Kalite kontrol laboratuvarlarında miktar tayini amacıyla genelde kromatografik yöntemler uygulanmaktadır. Ancak kapiler elektroforez, diğer analitik yöntemlere göre yöntem geliştirme süresi daha kısa, düşük maliyetli, ayırım etkinliği ve seçiciliği daha yüksek, hızlı, doğru ve kolay uygulanabilen bir analiz yöntemi olması sebebiyle rutin analizlerde gün geçtikçe kullanımı artan bir analitik yöntem haline gelmiştir (58-60).

Yöntem seçimi sırasında, Leflunomid'in analizi için ilk önce CZE yöntemi denenmiştir. Leflunomid standart (50 µg/mL derişimde) çözeltisinin farklı tampon çözeltileri (pH: 4.0 sitrat, pH: 7.0 fosfat ve pH: 9.5 borat tampon çözeltileri) kullanılarak asidik, nötral ve bazik pH'larda analizi yapılmıştır. Ancak CZE yöntemi ile yapılan ön denemelerde Leflunomid EOF ile birlikte göç etmiş ve herhangi bir pik gözlenememiştir.

CZE yöntemi ile nötral moleküllerin analizi mümkün değildir; çünkü uygulanan elektrik alanın nötral moleküller üzerinde etkisi yoktur ve tüm nötral moleküller EOF ile aynı hızda göç ederek birbirinden ayrılmadan elüe olurlar (Şekil 2.8). Molekül yüklü bile olsa, yük/çap oranı birbirine yakın olan başka madde molekülleri ile benzer elektroforetik hareketliliğe sahip olabilir ve bu maddelerin ayrımı CZE yöntemi ile istenen ayırıcılıkta gerçekleştirilemeyebilir. Leflunomid'in

pKa'sı 10.8 olduğundan pH=9.5'de çalışıldığında Leflunomid'in % 4.7'si iyonlaşmaktadır. Leflunomid molekülünün iyonlaşma derecesi, CZE yönteminde EOF'den ayrılmasına yetecek düzeyde değildir. Bu nedenle ayırmada polaritenin de etkili olduğu MEKC yöntemi, daha başarılı sonuçlar vereceği düşünülerek seçilmiştir (55,61).

5.2. Yöntem Geliştirme

Tez çalışmasında kullanılan Leflunomid'in saflığının belirlenmesi amacıyla erime noktası tayini yapılmış ve ölçülen değer (165.8°C) kaynakta (18) belirtilen değerle (164-168°C) uyumlu olduğundan maddenin yeterli saflıkta olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca Leflunomid'in UV spektrumu alındığında maksimum absorbans değerinin elde edildiği dalga boyunun kaynaklarda (18) belirtilen Leflunomid'e ait dalga boyu (260 nm) ile uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 4.1).

MEKC'de yöntem geliştirme sırasında çalışma elektrolitinin bileşimi, derişimi ve pH'sı, uygulanan voltaj, enjeksiyon türü ve süresi, kapiler sıcaklığı gibi parametreler optimize edilmiştir.

Çalışma elektrolitinin optimizasyonunda, tampon içeriği, derişimi ve pH'sı sistematik olarak değiştirilerek en uygun koşullar saptanmıştır.

Çalışma elektrolitinin pH'sı kapilerin içerisindeki silanol gruplarının iyonizasyon oranını etkiler. Çalışma elektrolitinin pH'sında meydana gelecek değişiklikler EOF'nin değişmesine, bu da doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar alınamamasına neden olabilir. Analiz süresince çözelti pH'sının tampon çözeltiler yardımı ile sabit tutulması, EOF'nin ve analitlerin iyonizasyon oranının değişmesini önler (49). Bu amaçla pH: 4.0 sitrat, pH: 7.0 fosfat ve pH: 9.5 borat tampon çözeltileri denenmiştir. Leflunomid'e ait pik yalnızca pH: 9.5 borat tamponu ile çalışıldığında gözlenmiştir.

pH 9.5 borat tamponu farklı derişimlerinde (10-75 mM aralığında) denenmiştir. Borat tamponu derişimi arttıkça analiz süresinin uzadığı

gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Derişim çok düşük olduğunda ise pik şeklinde bazı bozulmalar meydana gelmiştir. Bu nedenle en iyi pik şeklinin ve kısa analiz süresinin gözlemlendiği 25 mM, borat tamponu derişimi olarak belirlenmiştir.

Borat tamponu ile pH 7.0-11.0 aralığında yapılan deneyler sonucunda en iyi pik şekli ve en kısa analiz süresi pH 9.5’da elde edilmiştir (Şekil 4.3). pH 7.0-7.5’da ve pH 10.0-11.0’de de çalışılmış ancak zemin çizgisinde ve pik şekillerinde meydana gelen bozulmalar nedeniyle değerlendirilememiştir.

MEKC yönteminde, maddelerin ayırımı kullanılan yüzey aktif maddenin oluşturduğu miseller aracılığıyla gerçekleştiği için, yüzey aktif madde derişimi önemlidir. Analizde yüzey aktif madde olarak SDS kullanılmıştır. Eklenen yüzey aktif madde derişimi kendine özgü CMC’nin altında olursa misel oluşmaz, dolayısıyla ayırım sağlanamaz. Ayrıca yüzey aktif madde derişiminin yüksek olduğu durumlarda ise analiz süresi gereğinden fazla uzayabilir. Bu nedenle analiz için optimum SDS derişiminin seçilmesi gerekmektedir (55). Optimizasyon deneyleri sırasında değişik SDS derişimleri (10-90 mM aralığında) denenmiştir (Şekil 4.4). Düşük SDS derişimlerinde gerçekleştirilen analizlerde oluşan misellerin apolaritesinin Leflunomid molekülü ile etkileşebilecek düzeyde olmadığı ve bu nedenle Leflunomid’in oluşan misellerle yeteri kadar etkileşmediği için Leflunomid’e ait bir pik gözlenememiştir. Ancak SDS derişimi artırıldığında Leflunomid molekülünün misellerle etkileşmiş ve birlikte hareket ederek kapileri terk etmiştir. 70 mM’ın altındaki derişimlerde Leflunomid piki gözlenemezken ve 75 mM’dan sonra ise analiz süresinin değişmediği görülmüştür. Sonuç olarak optimum SDS derişimi, simetrik piklerin ve en kısa analiz süresinin elde edildiği 70 mM olarak belirlenmiştir.

Çalışma elektrolitine organik çözücü eklenmesi ile pik simetrisi ve ayırıcılık iyileştirilebilmektedir (62). Optimizasyon sırasında çalışma elektrolitine sırasıyla % 5, 10 ve 15 oranlarında metanol veya asetonitril çözücüleri eklenmiş ve yapılan bu eklemelerin yöntemin analiz süresi, ayırıcılık ve etkinliğine herhangi bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle organik çözücü eklenmemesine karar verilmiştir.

Sonuç olarak, 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM borat tamponu çalışma elektroliti olarak seçilmiştir.

Cihaza ait parametrelerin (kapiler kaset sıcaklığı, voltaj, enjeksiyon süresi, dalga boyu) sistematik olarak değiştirilmesi ile ayırıcılık ve seçicilik açısından optimum koşullar belirlenmiştir.

Çalışmalarda uygulanabilecek maksimum voltajı belirlemek için 5-30 kV arasında değişen voltaja karşı akım grafiği çizilmiş ve ani bir artış ya da doğrusallıktan sapma olmadığından ohm yasasının korunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5). Bu da geniş bir potansiyel aralığında çalışılabileceğini göstermektedir. Analiz sırasında uygulanan voltajın artırılması zeta potansiyelini ve elektroforetik hareketliliği etkileyerek analiz süresinin kısalmasını sağlar. Ancak voltajın artması belli bir değerden sonra kapilerin gereğinden fazla ısınmasına ve pik şekillerinde bazı bozulmalara neden olabilmektedir (56). Çalışmamızda analiz süresinin 15 kV'ta uzun, 25 ile 30 kV'ta kısa olduğu görülmüştür (Şekil 4.6). Bu yüzden kısa analiz süresi elde etmek ve joule ısınmasını önlemek amacıyla 25 kV çalışma voltajı olarak seçilmiştir.

Kapilerin analiz sırasındaki sıcaklığı çalışma elektrolitinin viskozitesini değiştirdiği için EOF ve elektroforetik hareketlilik üzerinde etkilidir. Çalışma sıcaklığındaki değişiklik analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğini de etkiler (63). Bu nedenle kapiler sıcaklığının sabit tutulması gerekir. Çalışma sıcaklığının belirlenebilmesi için 20, 25, 30 ve 35°C'de çalışılmıştır. Sıcaklığın artması ile göç zamanının azaldığı görülmüştür (Şekil 4.7). Ancak elde edilen elektroferogramlar incelendiğinde en düzgün pik şekillerinin 20°C'de elde edildiği görülmüş ve optimum çalışma sıcaklığı 20°C olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen MEKC yönteminde elektrokinetik enjeksiyona göre daha kesin ve tutarlı (50) olduğu için hidrodinamik enjeksiyon tercih edilmiştir. Enjeksiyon sırasında 50 mbar basınç uygulanmıştır. Enjeksiyon süresinin uzun olması kapiler içerisine verilen numune miktarının fazla olmasını dolayısıyla pik yüksekliği değerinin daha büyük olmasını sağlar. Ancak enjeksiyon süresinin uzaması ile

piklerde yayvanlaşma meydana gelebilir. Bu nedenle enjeksiyon süresi optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sırasında 3, 4, 5 ve 6 s sürelerinde basınç uygulanmıştır. Pik yüksekliği 3, 4 ve 5 s enjeksiyon sürelerinde giderek artmış 6 s’de ise bir miktar azalmıştır (Şekil 4.8). En fazla pik yüksekliği değeri, enjeksiyon süresi 5 s olarak uygulandığında gözlemlenmiştir. Bu nedenle optimum enjeksiyon süresi 5 s olarak seçilmiştir.

Leflunomid’in dizi diyot dedektör kullanılarak analizi için hem Leflunomid’in hem de iç standart olarak kullanılan Kafein’in maksimum absorbans verdiği bir dalga boyunda çalışılması gerekmektedir. Maddelerin UV spektrumları incelenmiş ve 205 ve 260 nm’de çalışmalar yapılmıştır. Dedektör dalga boyu olarak maksimum absorbans değerinin sağlandığı 260 nm (bant genişliği \pm 10 nm) seçilmiştir. Bu değer kaynaklarda yer alan spektroskopik dedeksiyon çalışmaları ile de uyumludur (4,38).

Optimizasyon süreci sonunda çalışma elektroliti ve cihaz parametreleri için en uygun şartlar; 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM borat tamponu, 50 mbar basınçla 5 s enjeksiyon süresi, 25 kV uygulama voltajı, 20 °C kapiler sıcaklığı ve 260 nm UV dedektör dalga boyu olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda göç zamanları Leflunomid için 7.25 ± 0.01 dk ve Kafein için 3.45 ± 0.01 dk olarak bulunmuştur.

MEKC yönteminde madde miktarının hesaplanması sırasında pik yüksekliği, pik alanı, PN (pik alanının göç zamanına oranı), pik alan oranı (maddenin pik alanının iç standardın pik alanına oranı) ve PN oranları (maddenin PN’sinin iç standardın PN’sine oranı) değerlerinden herhangi birisi kullanılabilir. Derişimin yükselmesi piklerin genişlemesi veya bozulması ile pik yüksekliklerinde değişikliklere neden olabileceğinden MEKC’de miktar tayinlerinde daha geniş bir doğrusal aralık sağladığından genellikle pik alanları değerlendirilir. Ancak, göç zamanlarındaki olası sapmalar hesaba katılarak kesinliğin artırılması için PN ve PN oranı kullanılır. Çalışmalarımızda pik alanı, pik alan oranı, PN ve PN oranı kullanılarak hesaplamalar yapılmış ve doğrusal ilişkinin en düzgün olduğu PN oranı değerlendirmelerde kullanılmıştır

Çalışma elektroliti ve cihaz parametrelerinin optimum koşulları uygulanarak yapılan deneyler sonucunda, Leflunomid ve Kafein'in pik simetrilerinin 1'e yakın olması, kapasite faktörlerinin 1'den büyük olması, teorik tabaka sayısının 2000'den yüksek olması ve ayırıcılığın 1.5'dan büyük olması geliştirilen MEKC sisteminin uygunluğunu göstermiştir (Tablo 4.1) (64).

5.3. Geliştirilen MEKC Yönteminin Validasyonu

Optimize edilen MEKC yöntemi tüm validasyon parametreleri değerlendirilerek (57,65) valide edilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (66).

Geliştirilen MEKC yönteminin validasyonu için kararlılık, doğrusallık, duyarlılık (gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı), doğruluk, kesinlik, özgünlük, sağlamlık ve tutarlılık çalışmaları yapılmıştır.

Kararlılık

Tekrarlanabilir ve güvenilir analiz sonuçları elde etmek için, validasyon çalışmalarına başlamadan önce Leflunomid'in kararlılık çalışmaları yapılmıştır.

Leflunomid'in 1000 µg/mL derişimdeki stok çözeltilerinin kısa dönem kararlılığını test etmek için, stok çözelti oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiş, bu süre sonunda son derişim 50 µg/mL olacak şekilde su ile seyreltilmiş ve geliştirilen MEKC yöntemi ile analiz edilmiş ve pik alanları karşılaştırılmıştır.

Uzun dönem kararlılık çalışmaları için ise standart stok çözelti 2 ay süresince buzdolabında bekletilmiş, bu sürenin başında ve sonunda su ile 50 µg/mL son derişime seyreltilip analiz edilmiş ve pik alanları karşılaştırılmıştır. Kısa dönem ve uzun dönem kararlılık çalışmaları sonucunda sırasıyla % 0.21 ve % 0.52'lik bir değişim görülmüştür. Bu da kabul edilebilir kararlılık kriteri olan % 2'lik (57) bir değişimden küçüktür. Ayrıca Leflunomid pikinden başka bir pike rastlanmamıştır. Buna göre Leflunomid stok çözeltisinin oda sıcaklığında en az 24 saat, buzdolabında (+4°C'de) saklandığında ise en az 2 ay kararlı olduğunu bulunmuştur (Tablo 4.2).

Doğrusallık

Leflunomid derişiminin Leflunomid'in PN'nun Kafein'in PN'na oranına karşı grafiğe geçirilmesi sonucu elde edilen kalibrasyon eğrisinin 5–150 µg/mL aralığında doğrusal olduğu (Şekil 4.10); grafik yöntemi ve istatistiksel olarak belirlenmiştir. Grafik yönteminde standart çözeltilerin olması gereken derişimlerine karşı kalibrasyon denkleminde bulunan derişimleri grafiğe geçirilmiş (Şekil 4.11) ve bir doğru elde edilmesi ile doğrusallık test edilmiştir. Elde edilen doğrunun eğiminin 1'e yakın (1.024) olması yöntemin doğruluğunu göstermiştir.

Tanımlayıcılık katsayısının (R^2) 0.9995 olarak 1.0000'e yakın bulunması çizilen kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğunu göstermektedir. ANOVA analizi yapılarak elde edilen kalibrasyon eğrilerindeki eğim değerlerinin sıfırdan farklı ($p < 0.05$), kesişim değerlerinin sıfıra eşit (önemsiz) ($p > 0.05$) ve korelasyon katsayılarının tesadüfen bulunmuş değerler olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır ($F_H > F_T$) (Tablo 4.3).

Tüm bu sonuçlar geliştirilen yöntemin 5–150 µg/mL aralığında doğrusal olduğunu kanıtlamaktadır (57)

Duyarlılık

Gözlenebilme sınırı (LOD) sinyal/gürültü oranınının 3 olduğu derişim olarak 2 µg/mL'dir. Alt tayin sınırı (LOQ) ise, sinyal/gürültü oranı 10 olduğunda saptanabilen en küçük derişim olan 5 µg/mL olarak bulunmuştur. Bulgular geliştirilen yöntemin farmasötik preparattan analiz için yeterli duyarlılıkta olduğunu göstermektedir (67).

Doğruluk

Yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk çalışmaları Leflunomid'in 10.0, 50.0 ve 125.0 µg/mL olmak üzere 3 farklı derişimindeki bağımsız numunelerinin tekrarlı (n=6) analizleriyle yapılmıştır.

Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası analizlerinin sonucunda hesaplanan % bağıl hata değerleri sırasıyla 0.02–2.00 ve 0.02–1.65 arasında bulunmuştur (Tablo 4.4). Analitik sonuçlar incelendiğinde geliştirilen yöntemde gün

içi ve günler arası için % bağıl hata değerlerinin sırasıyla % 2.00'den ve % 1.65'ten az olması ise yöntemlerin doğruluğunu göstermektedir (67).

Geri kazanım sentetik tablet çözeltisine eklenen standart maddenin analiz sonucunda ne kadarının bulunduğunu belirlemek amacıyla kullanılır (57). Geri kazanım çalışmaları için 20 mg Leflunomid eklenerek hazırlanan altı farklı çözelti analiz edilmiş ve geri kazanım değeri Leflunomid için % 99.75 ± 0.50 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.5). Bu değer kabul edilebilir sınırlar (% 98-102) içinde olması da yöntem doğruluğunun bir diğer kanıtıdır.

Kesinlik

Bir yöntemde analiz sonuçlarının tekrarlanabilir olması geliştirilen yöntemin kesinliğini göstermektedir. Kesinlik, gün içi ve günler arası kesinlik, sistem tekrarlanabilirliği ve enjeksiyon tekrarlanabilirliği şeklinde incelenmiştir (57).

Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları Leflunomid'in 10.0, 50.0 ve 125.0 µg/mL olmak üzere 3 farklı derişimindeki bağımsız numunelerinin tekrarlı (n=6) analizleriyle yapılmıştır.

Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası analizlerinin sonucunda hesaplanan BSS değerleri sırasıyla 0.19–1.19 ve 0.13–1.34 arasında bulunmuştur (Tablo 4.4). Kesinlik çalışmaları sonucunda BSS değerlerinin sırasıyla % 1.19'dan ve % 1.34'ten az olması ise yöntemlerin kesinliğini göstermektedir (67).

Kullanılan kapiler elektroforez cihazının enjeksiyon tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla, aynı derişimdeki standart çözelti 10 kez analiz edilmiş ve sinyaller incelenmiştir. Elde edilen elektroferogramlarda Leflunomid ve Kafein pikleri için göç zamanlarının BSS değerleri sırasıyla % 0.45 ve % 0.99, pik alanlarının BSS değerleri de sırasıyla % 1.23 ve % 0.73 olarak bulunmuştur. Bu değerler, cihazın tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini göstermektedir (Tablo 4.6).

Geliştirilen MEKC yönteminin sistem tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi için, Leflunomid ve Kafein içeren 10 ayrı çözelti analiz edilmiş ve sinyaller incelenmiştir.

Elde edilen elektroferogramlarda Leflunomid ve Kafein pikleri için göç zamanlarının BSS değerleri sırasıyla % 0.36 ve % 1.16, pik alanlarının BSS değerleri de sırasıyla % 1.79 ve % 1.45 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda sistemin tekrarlanabilir olduğu bulunmuştur (Tablo 4.7).

Özgünlük

Özgünlük, yöntemin Leflunomid'i diğer maddelerin varlığından etkilenmeden tayin edebilme yeteneğidir (68). MEKC yöntemi ile standart, plasebo, sentetik tablet, tablet çözeltileri analiz edilmiş ve elde edilen elektroferogramlardan Leflunomid'in tabletlerde bulunan yardımcı maddelerle herhangi bir etkileşimde olmadığı görülmektedir (Şekil 4.12).

Geliştirilen yöntemin özgünlüğü için ayrıca farmasötik preparatlardan miktar tayini için uygulanan kalibrasyon eğrisi yöntemi ve standart ekleme yöntemi ile elde edilen doğruların eğimleri karşılaştırılmıştır. Kalibrasyon doğrusunun eğimi 0.0195, standart eklemede oluşan doğrunun eğimi 0.0196'dır. Eğimlerin birbirine çok yakın olması farmasötik preparatlarda bulunan yardımcı maddelerin seçilen analiz koşullarında girişim yapmadığını doğrulamaktadır.

Ayrıca dizi diyot dedektörle elde edilen pik saflık indisleri değerlerinin 1'e yakın olması da yöntemin özgünlüğünün bir diğer göstergesidir. Cihaz bilgisayarındaki yazılım, pikin başlangıcında, ortasında ve sonundaki UV absorbans spektrumlarını inceleyerek otomatik olarak pik saflık indisini hesaplamaktadır. MEKC yöntemi ile standart Leflunomid ve Kafein çözeltilerinin analizi sonucunda elde edilen piklere ait pik saflık indisleri sırasıyla 1.00 ± 0.02 ve 1.00 ± 0.01 olarak bulunmuştur. Bu değerler piklerin saf olduğunu göstermekte ve yöntemin özgünlüğünü desteklemektedir (Tablo 4.1).

Sağlamlık

Geliştirilen MEKC yönteminin sağlamlık çalışmalarında, optimum yöntem parametrelerinde yapılan küçük değişiklikler (çalışma tamponu pH'ı 9.5 yerine 9.4 ve 9.6; borat tamponu derişimi 25 mM yerine 24 ve 26 mM; eklenen SDS derişimi

70 mM yerine 69 ve 71 mM; uygulanan voltaj 25 kV yerine 24 ve 26 kV; dedektör dalga boyu 260 nm yerine 259 ve 261 nm ve kapiler sıcaklığı 20°C yerine 19 ve 21°C) yapılarak Leflunomid analiz bulgularının değişip değişmediği araştırılmıştır (Tablo 4.8).

Değiştirilen koşullarda yapılan analizlere ilişkin sonuçlar, optimum koşullarda elde edilen sonuçlar ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları arasında anlamlı bir fark olmaması ($p>0.05$) yöntemin değiştirilen koşullarda sağlam olduğunu göstermiştir.

Tutarlılık

Geliştirilen MEKC yöntemin tutarlılığının belirlenmesi için, Leflunomid için doğrusallık aralığına giren derişim seviyesinde (50 µg/mL) farklı iki analizci tarafından yapılan analiz sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 4.9). Uygulanan Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi (Ek 2) sonucunda iki farklı analizcinin deney sonuçları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuş ($p>0.05$) ve yöntemin farklı analizcilerin uygulamaları için tutarlı olduğu belirlenmiştir.

5.4. CZE Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve valide edilen MEKC yöntemi; üç ayrı dozajda (10, 20 ve 100 mg) ve tablet formunda bulunan Arava[®] farmasötik preparatlarındaki Leflunomid'in analizine uygulanmıştır (Tablo 4.10). 10, 20 ve 100 mg'lık tabletlerdeki Leflunomid miktarı için BSS değerleri sırasıyla % 1.59, % 1.38 ve % 0.95 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen veriler, aynı numunelerin USP 32'de yer alan ters faz HPLC (18) yöntemi ile yapılan analiz sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi (Ek 2) uygulanarak yapılan istatistiksel değerlendirmede iki yöntem ile elde edilen bulgular arasında fark olmadığı saptanmıştır ($T_{hesap} > T_{tablo}$, $p < 0.05$) (Tablo 4.11).

6. SONUÇ

Tez çalışmamızda farmasötik preparatlardan Leflunomid'in analizi için bir elektroforetik yöntem olan MEKC yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen MEKC yönteminde en uygun çalışma elektroliti 70 mM SDS içeren pH 9.5 25 mM borat tamponu; optimum cihaz parametreleri ise 50 mbar basınçla 5 s hidrodinamik enjeksiyon, 25 kV voltaj uygulaması, 20°C kapiler kaset sıcaklığı ve 260 nm dedektör dalga boyu olarak belirlenmiş ve bu koşullarda Leflunomid'in göç zamanı 7.25 dk olarak bulunmuştur.

Geliştirilen MEKC yönteminin validasyonu için kararlılık, doğrusallık, duyarlılık (gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı), kesinlik, doğruluk, özgünlük, sağlamlık ve tutarlılık parametreleri değerlendirilmiş ve tüm parametrelerin kabul kriterlerini sağladığı saptanmıştır.

Valide edilen yöntem Türkiye piyasasında satılmakta olan, üç farklı dozajda Leflunomid içeren tablet şeklindeki farmasötik preparatlara uygulanmış, tabletler USP 32'de yer alan ters faz HPLC yöntemi (18) ile de analiz edilmiş, analiz sonuçları karşılaştırılmış ve sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Sonuçta MEKC yöntemi; doğru, kesin, duyarlı, özgün, tutarlı, sağlam, hızlı, kolay ve harcanan sarf malzeme maliyeti açısından ucuz olması sebebiyle kalite kontrol laboratuvarlarında Leflunomid'in rutin analizinde kullanılmak üzere önerilmektedir. Söz konusu MEKC yönteminin geliştirilmesiyle kaynaklardaki elektroforetik bir yöntemin eksikliğini giderildiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alldred, A., Emery, P. (2001) Leflunomide: a novel DMARD for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2 (1), 125-137.
2. Parekh, J.M., Vaghela, R.N., Sutariya, D.K., Sanyal, M., Yadav, M., Shrivastav, P.S. (2010) Chromatographic separation and sensitive determination of teriflunomide, an active metabolite of leflunomide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878 (24), 2217-2225.
3. Schmidt, A., Schwind, B., Gillich, M., Brune, K., Hinz, B. (2003) Simultaneous determination of leflunomide and its active metabolite, A77 1726, in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 17 (4), 276-281.
4. Pal, N.R., Chakraborty, M., Debnath, R., Gupta, B.K. (2010) Spectrophotometric method for estimation of leflunomide in bulk and tablets. *Asian Journal of Chemistry*, 22 (2), 1649-1651.
5. Babu, G.S., Babu, I.S., Kumar, N.K., Yugandhar, N.M., Raju, C.A.I. (2007) Spectrophotometric determination of leflunomide in bulk and pharmaceutical formulations. *Asian Journal of Chemistry*, 19 (2), 1633-1635.
6. Abbas, S.S., Bebawy, L.I., Fattah, L.A., Refaat, H.H. (2006) Spectrophotometric stability-indicating methods for the determination of leflunomide in the presence of its degradates. *Journal of AOAC International*, 89 (6), 1524-1531.
7. Prabu, S.L., Prakash, T.N.K.S., Shanmugarathinam, A. (2012) Development of difference spectrophotometric method for the estimation of leflunomide in tablet dosage form. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 18 (3) 407-410.
8. Yeniceli, D., Dogrukol-Ak, D., Tuncel, M. (2005) Determination of leflunomide in pharmaceutical tablets by flow-injection analysis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28 (11), 1693-1701.
9. Kher, G.J., Ram, V.R., Dubal, K.L., Bapodara, A.H., Joshi, H.S. (2011) Validation of a stability-indicating LC Method for assay of leflunomide in

- tablets and for determination of content uniformity. *International Journal of ChemTech Research*, 3 (2), 523-530.
10. Miron, D., Soldattelli, C., Schapoval, E. (2006) HPLC with diode-array detection for determination of leflunomide in tablets. *Chromatographia*, 63 (5-6), 283-287.
 11. Yeniceci, D., Dogrukol-Ak, D., Tuncel, M. (2006) Determination of leflunomide in tablets by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40 (1), 197-201.
 12. Sultana, N., Muhammad, S.A., Khan, M.M., Nawaz, M. (2011) Development and Validation of a liquid chromatographic method for the determination of leflunomide: application to in vitro drug metal interactions. *Chinese Journal of Chemistry*. 29, 1933-1938.
 13. Kher, G.J., Ram, V.R., Dubal, K.L., Bapodara, A.H., Joshi, H.S. (2011) Development and validation of a stability indicating UPLC assay method for determination of leflunomide in tablet formulation. *Pelagia Research Library Der Chemica Sinica*, 2 (5), 65-74.
 14. Çelebier, M., Altınoz, S. (2007) Development of a capillary zone electrophoresis method for the indirect determination of olmesartan medoxomil and determination of hydrochlorothiazide in synthetic tablets. *Hacettepe University Journal of Faculty of Pharmacy*, 27 (2), 119.
 15. Nemutlu, E., Çelebier, M., Uyar, B., Altınöz, S. (2007) Validation of a rapid micellar electrokinetic capillary chromatographic method for the simultaneous determination of isoniazid and pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical formulation. *Journal of Chromatography B*, 854 (1), 35-42.
 16. Hamdan, I., Jaber, A., Abushoffa, A. (2010) Development and validation of a stability indicating capillary electrophoresis method for the determination of metformin hydrochloride in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53 (5), 1254-1257.
 17. N'Cho, C.A., Blanchin, M.-D., Aké, M., Montels, J., Fabre, H. (2012) Capillary electrophoresis for the assay of fixed-dose combination tablets of artesunate and amodiaquine. *Malaria Journal*, 11 (1), 149.

18. The United States Pharmacopeia. (2009). The Official Compendia of Standards. sf.2754-2756.
19. Li, E.K., Tam, L.-S., Tomlinson, B. (2004) Leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clinical Therapeutics*, 26 (4), 447.
20. Fox, R.I., Herrmann, M.L., Frangou, C.G., Wahl, G.M., Morris, R.E., Strand, V. ve diğeri. (1999) Mechanism of action for leflunomide in rheumatoid arthritis. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 93 (3), 198.
21. Kayaalp, S. O. (1992) Romatoid artrit karşı kullanılan özel antiinflatuvar ilaçlar: narkotik olmayan analjezikler (non steroid antiinflatuvar ilaçlar). *Tıbbi Farmakoloji*, Feryal Matbaacılık, sf: 2081-2082, Ankara.
22. Furst, DE, H.J. (2001) Aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis and Allied Conditions, Lippincott Williams and Williams*, 665-716.
23. Kayaalp, S.O. (1998) *Tıbbi Farmakoloji*, Cilt 2, Hacettepe-Taş Kitapçılık Lti. Şti.
24. Yurdakul S. (2002) Uzun etkili ilaçlar. Hamuryudan V. (ed). Romatoid Artrit, MD Yayıncılık.
25. RI, R. (1997) Antimalarial drugs in the treatment of rheumatological disease. *British Journal Rheumatol*, 36, 799.
26. Samancı, N., Balcı, N. (2001) Corticosteroids and their use in clinical practice. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 21 (2), 131.
27. Bannwarth, B., Labat, L., Moride, Y., Schaeffer, T. (1994) Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Drugs*, 47 (1), 25-50.
28. Wahl, C., Liptay, S., Adler, G., Schmid, R.M. (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *Journal of Clinical Investigation*, 101 (5), 1163.
29. Breedveld, F., Dayer, J. (2000) Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 59 (11), 841-849.
30. Önal, İ.K., Arhan, M., Yasemin, Ö., Adnan, T., Sezer, S., Bilge, T. ve diğeri. (2011) Efficacy and safety of azathioprine therapy in Turkish patients with inflammatory bowel disease: a retrospective long term follow up study. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 31 (3), 568.

31. Conaghan, P.G., Brooks, P. (1995) Disease-modifying antirheumatic drugs, including methotrexate, gold, antimalarials, and D-penicillamine. *Current Opinion in Rheumatology*, 7 (3), 167-173.
32. Moreland, L.W., Schiff, M.H., Baumgartner, S.W., Tindall, E.A., Fleischmann, R.M., Bulpitt, K.J. ve diğ erleri. (1999) Etanercept therapy in rheumatoid arthritis a randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, 130 (6), 478-486.
33. Özgüneş, N., Zengin-Elbir, T., Yazıcı, S. (2010) İ nfliksımab kullanımını izleyerek geliş en akciğ er tüberkülozu: olgu sunumu. *Klinik Dergisi*, 23 (2), 70.
34. Mertens, M., Singh, J.A. (2009) Anakinra for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, 1.
35. Kayaalp S O. (1992) Siklosporin: İ mmunomodülatör ilaçlar. Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık.
36. Yücel E.A. (2002) RA Tedavisinde Biyolojik Ajanlar. Hamuryudan V. (ed). Romatoid Artrit, MD Yayıncılık, sf: 102, Ankara.
37. Rozman, B. (2002) Clinical pharmacokinetics of Leflunomide. *Clinical pharmacokinetics*, 41 (6), 421-430.
38. Babu, G.S., Babu, I.S., Kumar, N.K., Yugandhar, N.M., Raju, C.A.I. (2007) Spectrophotometric determination of leflunomide in bulk and pharmaceutical formulations. *Asian Journal of Chemistry*, 19 (2), 1633-1635.
39. Srinivas, R.V., Sunanda, K.K., Narasimha, R.M., Allam A.R., Maheswari, I.L., Srinubabu, G. (2008) Development and validation of LC method for the determination of leflunomide in pharmaceutical formulations using an experimental design. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 2(2), 010-017.
40. Quangang, Z., Jinhong, H., Huajun S., Hongjie, S. (2000) Determination of Leflunomide and A771726 by RP-HPLC. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*.
41. Rakhila, H., Rozek, T., Hopkins, A., Proudman, S., Cleland, L., James, M. ve diğ erleri. (2011) Quantitation of total and free teriflunomide (A77 1726) in

- human plasma by LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55 (2), 325-331.
42. Chan, V., Charles, B.G., Tett, S.E. (2004) Rapid determination of the active leflunomide metabolite A77 1726 in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 803 (2), 331-335.
43. Sobhani, K., Garrett, D.A., Liu, D.-P., Rainey, P.M. (2010) A rapid and simple high-performance liquid chromatography assay for the leflunomide metabolite, teriflunomide (A77 1726), in renal transplant recipients. *American Journal of Clinical Pathology*, 133 (3), 454-457.
44. Roon, E.N., Yska, J.P., Raemaekers, J., Jansen, T.L.T.A., Wanrooy, M., Brouwers, J.R.B.J. (2004) A rapid and simple determination of A77 1726 in human serum by high-performance liquid chromatography and its application for optimization of leflunomide therapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36 17–22.
45. Pawinski, T., Gralak, B. (2005) HPLC determination of active metabolite of leflunomide in plasma. *Chemia Analityczna*. 50, 785-793.
46. Jin, Y., Li, J., Yao, H.W. (2002) Determination of leflunomide's active metabolite A771726 in human serum by RP-HPLC. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*.
47. Dias, V.C., Lucien, J., Legatt, D.F., Yatscoff, R.W. (1995) Measurement of the active leflunomide metabolite-(A77-1726) by reverse-phase high-performance liquid-chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*, 1(17), 84-88.
48. Smith, N., Evans, M. (1994) Capillary zone electrophoresis in pharmaceutical and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 12 (5), 579-611.
49. Rabanal, B., Paz, E., Walser, N., Negro, A. (2001) Operating parameter effects in capillary zone electrophoresis (CZE): Analysis of pentamidine, hydroxystilbamidine, propamidine, DAPI, and stilbamidine in body fluids. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24 (1), 29-45.
50. Khaledi, M.G., (1998), High-Performance Capillary Electrophoresis, John Willey & Sons Inc.

51. Li, S.F.Y. (1992). Capillary electrophoresis: principles, practice and applications: Access Online via Elsevier.
52. Wu, S.M., Ho, Y.H., Wu, H.L., Chen, S.H., Ko, H.S. (2001) Simultaneous determination of cimetidine, famotidine, nizatidine, and ranitidine in tablets by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 22 (13), 2758-2762.
53. Frost, N.W., Jing, M., Bowser, M.T. (2010) Capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 82 (12), 4682-4698.
54. Watanabe, T., Terabe, S. (2000) Analysis of natural food pigments by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 880 (1), 311-322.
55. Hancu, G., Simon, B., Rusu, A., Mircia, E., Gyéresi, Á. (2013) Principles of micellar electrokinetic capillary chromatography applied in pharmaceutical analysis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(1), 1-8.
56. Baker, D.R. (1995), Capillary electrophoresis, John Willey & Sons Inc.
57. Committee, I.S. (2005) Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). *Harmonized Tripartite Guideline*.
58. Suntornsuk, L. (2010) Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398 (1), 29-52.
59. Morzunova, T. (2006) Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 40 (3), 158-170.
60. Holzgrabe, U., Brinz, D., Kopec, S., Weber, C., Bitar, Y. (2006) Why not using capillary electrophoresis in drug analysis? *Electrophoresis*, 27 (12), 2283-2292.
61. Silva, M. (2013) Micellar electrokinetic chromatography: A review of methodological and instrumental innovations focusing on practical aspects. *Electrophoresis*, 34 (1), 141-158.
62. Khaledi, M.G. (1997) Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective. *Journal of Chromatography A*, 780 (1), 3-40.
63. Mayer, B. (2001) How to increase precision in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 907 (1), 21-37.

64. The United States Pharmacopeia (2005) Rockville: The National Formulary, United States Pharmacopeial Convention.
65. Green, J.M. (1996) Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry*, 68 (9), 305A-309A.
66. Alpar, R. (2010). Spor, Sağlık ve Eğitim Bilimlerinden Örneklerle Uygulamalı İstatistik ve Geçerlik-Güvenilirlik (c. 1): Detay Yayıncılık.
67. Taverniers, I., Van Bockstaele, E., De Loose, M. (2010) Analytical method validation and quality assurance. *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing*, John Wiley & Sons, Inc.
68. Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E. (2004) Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23 (8), 535-552.

EKLER

EK 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağlı Standart Sapma Hesaplanması

$$\text{Bağlı Standart Sapma (BSS)} = \frac{\text{Standart sapma}}{\text{Aritmetik ortalama}} \times 100$$

Bağlı Hata Hesaplanması

$$\text{Bağlı Hata (BH)} = \frac{(\text{Olmaması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar})}{\text{Olmaması gereken miktar}} \times 100$$

Standart Hata Hesaplanması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{\text{Standart sapma}}{\sqrt{\text{Ölçüm sayısı}}}$$

% Geri Kazanım Hesaplanması

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olmaması gereken miktar}} \times 100$$

EK 2. Tez İçinde Kullanılan İstatistiksel Testler

t - Testi

İki ortalama arasında fark olup olmadığını test eder.

$$s^2 = [(n_1-1) s_1^2 + (n_2-1) s_2^2] / (n_1 + n_2 - 2)$$

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / s \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}$$

n_1 : 1.yöntemin ölçüm sayısı n_2 : 2.yöntemin ölçüm sayısı

s_1 : 1. yöntemin standart sapması s_2 : 2.yöntemin standart sapması

\bar{x}_1 : 1. yöntemin ortalaması \bar{x}_2 : 2.yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi= $n_1 + n_2 - 2$

1. H_0 = İki ortalama arasında fark yoktur.
2. $\alpha=0.05$ yanılma düzeyinde ve $n_1 + n_2 - 2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.
3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
4. Karar:
 - a) Ortalamalar arasında fark yoktur (t = Hesaplanan değer, $p > 0.05$).
 - b) Ortalamalar arasında fark vardır (t = Hesaplanan değer, $p < 0.05$).

Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi

Aynı örneklerin değişik iki durumdaki ölçüm sonuçları arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde $n < 25$ ise uygulanan önemlilik testidir.

H_0 = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha=0.05$ yanılma düzeyi seçilmiştir.

Test istatistiğinin hesaplanması:

İki yöntemden elde edilen sonuçlar iki sütun şeklinde yanyana yazılır. Sağda yeni bir sütuna satırlar arasındaki farklar +/- işaretleriyle birlikte yazılır. Ardından farklar küçükten büyüğe doğru sıralanır ve sıra no. verilir. Sıra no.ların önüne farklardaki +/- işaretleri yazılır. + ve - işaretli sıra no. grupları arasında işareti sayıca fazla olan grup toplanır. Elde edilen değer, hesapla bulunan T değeridir (T_H).

Ölçüm sayısı (n) serbestlik derecesindeki tablo T değerine bakılır.

Karar:

a) $T_H > T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur (T_H = Hesaplanan T değeri, $p < 0.05$)

b) $T_H < T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark vardır (T_H = Hesaplanan T değeri, $p > 0.05$)

ANOVA (Tek Yönlü Varyans) Analizi

Yöntemlerin karşılaştırılmasında, yöntemler arasında fark bulunup bulunmadığını kontrol etmek için Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analiz testi uygulanır. Leflunomid'in tabletlerden kapiler elektroforez ve karşılaştırma yöntemiyle elde edilen sonuçların karşılaştırılması bu test ile yapılmıştır.

1. Kareler toplamları bulunur

a) Genel kareler toplamı (GnKT)

$$GnKT = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

b) Gruplar arası kareler toplamı (GAKT)

$$GAKT = \sum \left[\frac{(\sum x_j)^2}{n_j} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

c) Denekler arası kareler toplamı (DAKT)

$$DAKT = \sum \left[\frac{(\text{Her bir satır toplamı})^2}{\text{Her bir satırdaki ölçüm sayısı}} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

d) Etkileşim (hata) kareler toplamı $\Rightarrow HKT = GnKT - GAKT - DAKT$

2) Serbestlik derecelerinin bulunması

a) Genel serbestlik derecesi $\Rightarrow GnSD = n_j \times k - 1$

b) Gruplar arası serbestlik derecesi $\Rightarrow GASD = k - 1$

c) Denekler arası serbestlik derecesi $\Rightarrow DASD = n_j - 1$

d) Hata serbestlik derecesi $\Rightarrow HSD = (n_j - 1) \times (k - 1)$

3. Kareler ortalamasının bulunması

a) Gruplar arası kareler ortalaması \Rightarrow $GAKO = GAKT / GASD$

b) Denekler arası serbestlik derecesi \Rightarrow $DAKO = DAKT / DASD$

c) Hata kareler ortalaması \Rightarrow $HKO = HKT / HSD$

4. $H_0 =$ Yöntemler arasında fark yoktur.

$H_1 =$ En az bir ölçüm diğerlerinden farklıdır.

5. Yanılma olasılığı $p = 0.05$ seçilmiştir.

6. $F = GAKO / HKO$

7. $\alpha = 0.05$ düzeyinde GASD ve HSD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: Yöntemler arasında fark yoktur ($F =$ Hesapla bulunan, $p < 0.05$) veya yöntemlerden en az biri farklıdır ($F =$ Hesapla bulunan, $p > 0.05$).

ÖZGEÇMİŞ

1988 Akdağmadeni'nde doğdum. Rauf Denктаş Lisesi'ni bitirdikten sonra 2006 yılında girdiğim Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2010 yılında mezun oldum. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladım. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.