

**FORMOTEROL'UN
KAPİLER ELEKTROFOREZ (CE) İLE
TAYİNİ VE FARMASÖTİK PREPARATI
OLAN İNHALASYON KAPSÜLLERİNE
UYGULANIŞI**

Erol ŞENER

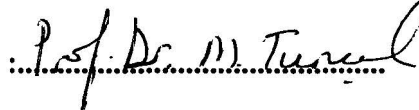

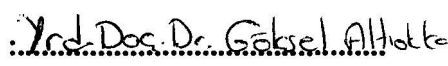
Yüksek Lisans Tezi

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Eylül-2001**

Yerinin bir kısmından veya tamamından fotokopi
çektirilebilir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Erol ŞENER'in "FORMOTEROL'UN KAPİLER ELEKTROFOREZ (CE) İLE TAYİNİ VE FARMASÖTİK PREPARATI OLAN İNHALASYON KAPSÜLLERİNE UYGULANIŞI" başlıklı Anolitik Kimya Anabilim Dalındaki , Yüksek Lisans tezi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye(Tez Danışman)	Prof. Dr. M. Tural	
Üye	Prof. Dr. Sefer Kır	
Üye	Yrd. Doc. Dr. Gürsel Altın	
Üye	
Üye	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
05.09.2001 tarih ve 00 sayılı kararı ile onaylanmıştır

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. İ. B. ÖZKURAK

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****FORMOTEROL'UN KAPİLER ELEKTROFOREZ (CE) İLE TAYİNİ VE
FARMASÖTİK PREPARATI OLAN İNHALASYON KAPSÜLLERİNE
UYGULANIŞI****EROL ŞENER****Anadolu Üniversitesi****Sağlık Bilimleri Enstitüsü****Analitik Kimya Anabilim Dalı****Danışman: Prof. Dr. Muzaffer TUNCEL****2001**

Bu çalışmada, farmasötik preparatlarda formoterol'ün miktar tayini için UV dedektörlü kapiller elektroforez (CE) tekniğinin kullanıldığı bir yöntem tanıtılmaktadır. Analiz, %20 asetonitril içeren 50 mM fosfat tamponunda pH 2.5 da 0.5s enjekte ederek, 27 kV uygulayarak ve 200 nm de, iç çapı 75µ etkin boyu 50, toplam boyu 86 cm olan çıplak silika kolonda gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda IS olarak kullanılan 3,4 dihidroksi benzilamin ve FOR sırasıyla 6.1 ve 8.3 dakikalarda oldukça simetrik pikler halinde belirlemiştir. $7.6 \times 10^{-6}M$ IS ve $6.0 \times 10^{-6}M$ FOR dan 6 kez enjekte edilmiş, sonuçta en iyi değerlendirmenin pik normalizasyona göre olduğu bulunmuştur. $2.38 \times 10^{-6}M$ - $7.15 \times 10^{-6}M$ derişimlerdeki FOR çözeltileri enjekte edilmiş, gün içi ve günler arası kesinlik (accuracy) incelenmiştir. İyi korelasyonlu lineer sonuçlar elde edilmiştir. Tayin sınırı (limit of detection, LOD) $S/N = 3.3$ $1.28 \times 10^{-6}M$ olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle FOR'un inhalasyon kapsüllerinde yapılan tayinlerde FOR % 98 olarak bulunmuştur. Bu miktar USP XXIV'ün belirttiği sınırlar içerisine girmektedir.

O halde geliştirilen yöntem, güvenilir, doğru kesin, oldukça hızlı ve ucuzdur.

Anahtar Kelimeler: Formoterol, Kapiller Elektroforez, Miktar tayini

ABSTRACT**Master Thesis****DETERMINATION OF FORMOTEROL BY CAPILLARY
ELECTROPHORESIS (CE) AND ITS APPLICATION TO INHALER
CAPSULES****EROL ŞENER****University of Anadolu****Institute of Health Sciences****Supervisor: Prof. Dr. Muzaffer TUNCEL****2001**

A capillary electrophoretic method for the determination of FOR in certain pharmaceutical preparations described. Analysis was made in a background electrolyte consisting of 20 percent acetonitrile and 50 mM phosphate at pH 2.5, using a total of 86 cm and effective 50 cm length and 75 μ ID fused silica capillary, injecting 0.5 s, applying 27kV potential, detecting at 200 nm. In these conditions, 3,4 dihydroxybenzylamine as IS and FOR appeared exhibiting very symmetrical peaks at 6.1 and 8.3 min. respectively. 7.6×10^{-6} M IS and 6.0×10^{-6} M FOR were injected six times and the best evaluation techniques was found to be as the value of peak normalizations. The linearization was examined in the concentration range of 2.98×10^{-6} - 8.94×10^{-6} M considering the intra-day and inter-day. Good correlated straight relations and accuracy were obtained. Limit of detection was calculated as 1.28×10^{-6} M considering S/N is equal to 3.3. The determinations in the inhaler capsules of FOR was practically calculated 98 percent. These evaluations cover the general requirements of USPXXIV.

These are resulted that the method is reliable, precise, accurate, rather fast and low cost.

Keywords: Formoterol, Capillary electrophoresis, Determination.

TEŞEKKÜR

Bize özgür ve laik Türkiye’de bilimsel araştırma imkanı kazandıran yüce önderimiz Mustafa Kemal ATATÜRK’e

Bilgi, tecrübe ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Eczacılık Fakültesi Temel Bilimler Bölüm Başkanı değerli hocam Prof .Dr. Muzaffer TUNÇEL’e

Her zaman yanımda olan tüm Analitik Kimya personeline,

Bilgisayarını tezim süresince bana veren kardeşim Altan ŞENER’e,

Araştırmacı olmamda bana örnek olan sevgili teyzem Samiye FIÇICIOĞLU’na

Desteği ve yardımları için Araş. Gör. Tolga YILMAZ’a

Bana ayırdığı zamanı ve emekleri için Zafer BAYRAM’ a

Tezimin validasyonunda yardımcı olan tüm SANOVEL İLAÇ A.Ş. personeline.

Desteklerini en zor anlarında bile eksik etmeyen ve beni bugünlere getiren sevgili annem Fethiye ŞENER ve babam Mümin ŞENER’e ,

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. Formoterol'un Kimyasal Yapısı.....	2
2.2. Formoterol'un Farmakolojik Özellikleri.....	2
2.3. Formoterol'un Enantiyomerlerini Saflaştırma Çalışmaları.....	3
2.4. Formoterol Hakkındaki Analiz Çalışmaları.....	3
3. DENEYSEL BÖLÜM.....	6
3.1. Kimyasallar.....	6
3.2. Aletler.....	6
3.3. Çalışma Elektrolitinin Hazırlanışı.....	7

3.4. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı.....	7
3.5. Yıkama Programı.....	7
3.6. Farmasötik Preparatlardan FOR'un Kazanımı.....	7
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	8
4.1. Yöntemin Optimizasyonu ile İlgili Çalışmalar.....	9
4.2. Yöntemin Geçerliliği (Validasyonu) ve Seçiciliği.....	10
4.3. Doğrusallık İlişkisi.....	13
4.4 Geliştirilen Yöntemle Farmasötik Preparatlarda FOR Tayini.....	13
5. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	16

ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1.	Formoterol'un Kimyasal Yapısı.....	2
4.1.1	IS ve FOR Elektroferogramı.....	11
4.2.1	IS ve FOR Piklerinin Morfolojisi.....	12

ÇİZELGELER DİZİNİ

4.2.1.	FOR ve IS Pikleri İle İlgili Değerlendirmeler.....	11
4.2.2.	İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	12
4.3.1.	Gün İçi ve Günler Arası Lineerlik İlişkileri Sonuçları.....	13
4.4.1	Farklı Kapiler Elektroferezler'in Karşılaştırılması.....	14

1.GİRİŞ

Formoterol (FOR) astım ve kronik bronşitte bronkodilatör olarak kullanılan β_2 -adrenerjik reseptör agonisti bir maddedir[1,2]. FOR'un düşük yan etki, yüksek reseptör seçiciliği ve etki süresi açısından diğer bazı β_2 -adrenerjik reseptör agonistlerinden daha uzun etkili olduğu belirtilmiştir[2-4]. FOR'un piyasada ki preparatların da maddenin rasemik halinin (farklı stereoizomerlerinin) olduğu rapor edilmiştir. FOR'un iki stereojenik merkezi olduğu ve buna bağlı farklı farmakolojik etki gücünde(R,R-R,S-S,R-S,S) stereoizomerlerinin olduğu belirtilmekte, yapılan çalışmalarda en etkili izomerinin R,R formu olduğu ifade edilmektedir[5-7].

FOR ve rasematlarını hedefleyen çalışmalar farmasötik preparatlara ve biyolojik sıvılara uygulanmıştır. Elektrokimyasal detektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile yapılan miktar tayinleri[8-10] ve rasemat ayırımı[11] çalışmalarıyla birlikte UV[12] ve LIF[13] detektörlü kapiler elektroforez sistemleri ile yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.

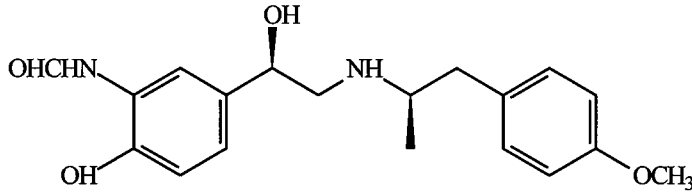
Bu çalışmada FOR'un farmasötik preparatlardaki kapiler elektroforez UV detektör sistemi kullanılarak miktar tayini yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Deneylede tekrar edilebilirliği artırmak amacıyla iç standart olarak 3,4-dihidroksibenzilamin kullanılmıştır. Çalışmanın her basamağı bilinen işlemlerle valide edilmiştir.

Yöntem, 9 dakika içinde FOR'un tayinine olanak sağlamaktadır. Tayin için uygulanan işlemler basit, duyarlı, seçici, hızlı ve tekrar edilebilir özelliktedir. Önerilen yöntem; FOR'un farmasötik preparatlarına kalite kontrol amacıyla kolaylıkla uygulanabileceğinden, rutin FOR tayini yapan laboratuarlarda kullanılabilir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Formoterol'un Kimyasal Yapısı

FOR feniletanolamin türevi bir kimyasal maddedir. İki şiral merkezi olan molekülün dört adet enantiyomeri mevcuttur.(R,R-R,S-S,R-S,S) Klinikte kullanılan FOR formülasyonlarında RR ve SS enantiyomerleri bulunmaktadır[1,2]. FOR'un farmasötik preparatlarda kullanılan şekli fumarat monohidrat tuzudur. N - [2 - hidroksi - 5 - [(RS) - 1 - hidroksi - 2 - [(RS) - 2 - (4 - metoksifenil) - 1 - metiletilamino] etil] fenil] formamide hemifumarat monohidrat uzun isimlendirmeli, kapalı formülü $(C_{19}H_{24}N_2O_4)_2 \cdot C_4H_4O_4 \cdot 2H_2O$ olan molekül ağırlığı 840.93 g olan bir kimyasaldır[14]. Kimyasal yapı formülü Şekil 2.1.1. de verilmektedir.



Şekil. 2.1.1. FOR'un kimyasal yapısı.

FOR düşük ölçüde lipofilik olmasına karşın (oktanol:su oranı $\text{Log}_{10}P = 0.4$, pH 7.4) fizyolojik pH'larda suda çözüldüğü belirtilmektedir[14]. Taranan literatürlerde ve yapılan çalışmada FOR'un stabilite sorununun olmadığı gözlenmiştir.

2.2. Formoterol'un Farmakolojik Özellikleri

FOR astım hastalığında bronkodilatasyon amacı için kullanılan bir β_2 adrenerjik reseptör agonistidir. Etkisini adenilsiklazı aktive ederek siklik AMP'yi artırmak suretiyle bronkodilatasyon yaparak gösterir[3,14]. FOR uzun etkili bir β_2 adrenerjik reseptör agonistidir[1]. Kendisi gibi uzun etkili β_2 adrenerjik

reseptör agonisti olan Salmeterol ve Salbutamol dan daha spesifik ve uzun etkili olduğu belirtilmiştir[3,15].

Her ne kadar farmasötik preparatlarında FOR'un R,R ve S,S enantiyomerleri bulunsa da sadece R,R enantiyomerinin iyileştirici etkisinin olduğu düşünülmektedir[4-6]. Yapılan hayvan deneylerinde bronş düz kasını gevşetici etkinin FOR'un R,R enantiyomerinde gözlenmiş. Buna karşın R,S ve S,R enantiyomerlerinde etkilerin birbirleriyle aynı fakat R,R enantiyomerinden çok düşük olduğu S,S enantiyomerinin etkisinin ise bunlardan da az olduğu belirtilmiştir[5].

FOR'un klinikte inhalasyon şeklinde uygulanmasına karşın oral preparatlarında mevcuttur. Klinik dozu erişkinlerde ve çocuklarda günde 12 µg lık iki doz şeklindedir[2].

2.3. Formoterol'un Enantiyomerlerini Saflaştırma Çalışmaları

FOR'un enantiyomerlerinin farklı etki derecelerinden dolayı etkiden sorumlu R,R enantiyomerinin saflaştırılması veya daha saf sentezlenmesine yönelik çalışmalar literatürlerde mevcuttur.

Akışkan yataklı preparatif sıvı kromatografisi ile yapılan bir çalışmada FOR'un tüm enantiyomerleri %99-%99.99 oranında aynı zamanda diğer konvansiyonel tekniklerden daha ucuza saflaştırılabildiği[15].

Farklı sentez yolları geliştirilerek FOR'un daha saf R,R enantiyomeri elde edilmiştir[6,16].

2.4. Formoterol Hakkındaki Analiz Çalışmaları

Literatür taramasında FOR'un klinik uygulama dozunun çok düşük olmasından dolayı pek az analiz çalışmasına rastlanmıştır. Çalışmaların genellikle saf enantiyomer sentezi yada sentez sonrası enantiyomer saflaştırılması üzerine yapıldığı görülmüştür.

Lecaillon ve ark. [8] yaptıkları bir çalışmada elektrokimyasal detektörlü HPLC kullanılmıştır. Çalışmada FOR'un plazmadaki tayini yapılarak

farmakokinetik özellikleri incelenmiştir. Çalışmada FOR'un iki sulu fumarat tuzu kullanılmıştır. Stok MeOH de çözülerek hazırlanmış ve seperasyon kolonu oktodesilsilan (5µ silika çaplı, 200mm×3mm I.D.) kullanılmıştır. Mobil faz olarak asetonitril-metanol-pH 6 fosfat tamponu (5:25:70) kullanılmıştır. İç standart olarak CGP 47086A kodlu, yapısı FOR'a çok benzeyen bir kimyasal madde kullanılmıştır. Analizde camısı karbon elektrotlu kimyasal detektör kullanılmış, +0.63V potansiyelinde çalışılmıştır. Elektrokimyasal detektör kullanmalarındaki amaç; FOR'un plazma konsantrasyonun pmol/L civarında olması olduğu da belirtilmiş. Numuneler pH 6 fosfat tamponu ile tamponlandıktan sonra enjeksiyon yapılmıştır.

Vandenberg ve ark.[9] yaptığı başka bir çalışmada az önceki çalışmadaki gibi elektrokimyasal detektörlü HPLC kullanılarak yapılmıştır. Yöntemde FOR'un plazmadan analizi gerçekleştirilmiş enjeksiyon öncesi katı faz ekstraksiyonu ile plazma numunesi saflaştırılmıştır. Geliştirilen yöntemde IS olarak bromo-formoterol kullanılmıştır. On dakika içerisinde IS ve FOR analizi gerçekleştirilmiştir. Alıkonma zamanları IS için 5.6 dk FOR için ise 10 dk olduğu ve saptama limitinin 20 pg/mL olduğu belirtilmiştir.

Graham ve ark.[10] da benzer bir çalışma yapmışlardır. Onlar da tayin limitinin 20 pg/mL ye indiğini belirtmektedirler.

Kaiser ve ark.[11] yaptığı bir diğer HPLC çalışmasında ise FOR'un enantiyomerlerinin idrarda ayırımını gerçekleştirmişlerdir. İdrardan sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile alınan ve daha sonra katı faz ekstraksiyonu ile saflaştırılan ekstrakt içinde FOR enantiyomerlerinin analizi yapılmıştır. İç standart olarak FOR'un R,S yada S,R diasteriomerleri kullanılmıştır. Ayırım kolonu olarak şiral α_1 -asitglikoprotein(AGP) kolon, detektör olarak da elektro kimyasal detektör kullanılmış. Analizler camısı karbon elektrotunda +0.63V potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Böylelikle, çok düşük derişimdeki FOR'un R,R ve S,S enantiyomerleri analiz edilebilmiştir. İdrar ekstraktında FOR'un R,R ve S,S formlarının saptama limiti 60 pmol/L ve 75 pmol/L olduğu saptanmış. Yöntem farklı bir yöntem (GC/MS) kullanılarak valide edilmiştir.

Zheng Song ve ark. [12] FOR'un analizini, farmasötik preparatı olan süspanسیون tozunda kapiler elektroforez kullanılarak yapmışlardır. Çalışmada,

örnek-biriktirme tekniği kullanılmıştır. Kılcal çalışma tamponu ile doldurulduktan sonra inletten dar bir zone şeklinde su enjektörde edilmiş daha sonra inlet numuneye batırılıp elektrokinetik enjeksiyon ile numunedeki FOR'un su zonunda birikmesi sağlanmış ve inlet tekrar çalışma tamponuna daldırılıp +20 kV voltaj uygulanmıştır. İç standart olarak klorsiklizin HCl kullanılmıştır. Stok FOR 1-propanol da çözülerek, IS stoku ise suda çözülerek hazırlanmıştır. 60 µM fosfat tamponu ile pH 2,5-8 arası taranmış en uygun ayırım pH 3 de gözlenmiştir. Fosfat tamponunun pH sı fosforik asit ile ayarlanmıştır. Detektör olarak UV detektör kullanılmış ve 200 nm ye ayarlanmıştır. Validasyon çalışmaları için analizler iki ayrı CE aletinde yapılmış yöntemin sağlamlığı (robustness) incelenmiştir . Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik beşli örnek setleri şeklinde yapılmış ve görelî(rölatif) standart sapmaları hesaplanmıştır.

Eric ve ark. [13] LIF detektörlü kapiler elektroforez ile FOR enantiyomerlerinin zepto molar düzeyinde ayırımını denemişlerdir. Lazer ışığı kullanan floresans detektörü (LIF) ile FOR'un enantiyomerlerinin zeptomolar derişiminde tayini gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada detektörün ışık kaynağı olarak eksitasyonu 488 nm olan argon-iyon lazer kaynağı, emisyon içinde 520 nm lik optik filtre kullanılmıştır. Kılcal kolonun çıplak silika olmasına karşın FOR'un enantiyomerlerini ayırmak için çalışma tamponuna α,β,γ -siklodekstrin, heptakis(2,6-di-O-metil- β -siklodekstrin) ve heptakis(2,3,6-tri-O-metil- β -siklodekstrin) lerden oluşan siklodekstrin karışımı ilave edilmiştir. Rasemik FOR florosein izotiyosiyanat ile türevlendirilmişlerdir. Türevlendirilmiş FOR silika jel kullanılarak saflaştırılmıştır. Çalışma bu aşamadan sonra hem kapiler zone elektroforez(CZE) tekniği ile hem de miseller elektro kinetik kromatografi (MECC) tekniği ile değerlendirilmiştir. CZE ve MECC tekniklerinde kullanılan sıcaklık (25°C) enjeksiyon basıncı ve süresi (0.3 psi, 5 s), pH 8 olarak belirtilmektedir. Buna karşın, CZE analizinde 12 kV, MECC analizinde ise 11 kV potansiyel uygulanmıştır. Çalışma elektroliti CZE'de pH 8 fosfat tamponu, 20 mM TM- β -CD, ve %10 metanol kullanılmıştır. MECC'de ise pH 8 fosfat tamponu, 20 mM TM- β -CD, 40 mM oktan sülfonik asit ve %10 metanol kullanılmıştır. Analiz edilecek FOR rasematı, standart çözeltinin hazırlanıp seyreltilmesi şeklinde hazırlanmıştır.

Bu koşullarda, gerçekleştirilen çalışma sonucunda, 1 pg/mL derişiminde hazırlanan standart çözeltinin 5 nL enjeksiyonun yaklaşık 120 molekül formoterol enantiyomerine karşılık gelmekte olduğu belirtilmiştir. Bu konsantrasyonda FOR enantiyomerleri analiz edebildiklerini belirtmektedirler.

Ayrıca, FOR analizi için CZE ve MECC teknikleri karşılaştırmışlar MECC ile yapılan FOR analizinin her ne kadar analiz süresi 10 dk uzamış ise de daha iyi ayırım yaptığı ifade edilmektedir.

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. Kimyasallar

Standart FOR Novartis Sağlık, Gıda ve Tarım Ürünleri San ve Ticaret A.ř. (İstanbul) dan temin edilmiştir.

İç standart (IS) olarak kullanılan 3,4-dihidroksibenzilamin HBr Aldrich (Milwaukee, USA) firmasının üretimidir.

Hidroklorik asit, sodyum hidroksit, fosfat ve etanol Merck (Darmstadt, G) firmasından elde edilmiştir ve analitik ölçülerde saftırlar.

Diğer kullanılan kimyasalların tümü analitik ölçülerde saftır.

Deneyler sürecinde kullanılan iletkenlik suyu tümü camdan yapılmış aparatlarda laboratuvarımızda elde edilmiştir.

3.2. Aletler

Deneyler Spektrophoresis 100 kapiler elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu sistem; modüler enjektör, yüksek voltaj güç kaynağı ve SpektraFOCUS ultraviyole ve görünür alan tarayıcı detektöründen (Thermo Separation Product, San Jose, USA) oluşmaktadır. Veriler OS/2 WARP (Versiyon 3.0) programı altında PC 1000 (Versiyon 2.6) ile işlenmiştir.

Analizler, 75 mikron i çaplı çıplak silika kolon (Phenomenex) kullanılarak yapılmıştır. Kolon etkin 50 cm, toplam 86 cm uzunluğundadır.

Yöntemin validasyonu için otomatik enjeksiyonlu SpektraFOCUS ultraviyole ve görünür alan tarayıcı detektörlü, Spektrophoresis 1000 kapiler

elektroforez sistemi kullanılmıştır. Bu kapiler elektroforezde validasyon çalışmaları etkin uzunluğu 60 cm, toplam uzunluğu 68 cm, iç çapı 75 mikron olan kılcal kolonda yapılmıştır. Veriler OS/2 WARP (Versiyon 3.0) programı altında PC 1000 (Versiyon 3.0) ile işlenmiştir.

Çözeltilerin pH ları P 114 Model pH metre (Consort) ile ölçülmüştür.

Çözeltilerin içerisindeki çözünmüş gazları çıkarmak için B-220 model ultrasonik banyo kullanılmıştır (Branson).

3.3. Çalışma Elektrolitinin Hazırlanışı

Çalışma elektroliti 322 µL derişik H₃PO₄ (50 mM fosforik aside karşı gelmektedir), 20 mL asetonitril'in karıştırılıp pH'sının 2.5'a ayarlanması sonunda 100 mL ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Tüm çözeltilerin hazırlanması sürecinde içerisinde partikül bulunmayacak şekilde gerekli işlemler yapılmıştır.

3.4. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı

FOR 1.5x10⁻³ M %20 etanollu çözeltisi içerisinde hazırlanmış ve seyrelmeler çalışma elektroliti kullanılarak hazırlanmıştır. 3,4 dihidroksibenzilamin (IS) çözeltisi 3.5x 10⁻³ M su içerisinde hazırlanmış daha sonraki seyrelmeler çalışma elektroliti ile yapılmıştır.

Alete verilen çözeltiler ise 0.5 mL IS ve 2.0 mL FOR çözeltisi olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.5. Yıkama Programı

Kapilerin yıkanması, 0.1 M NaOH, distile su 0.1 M HClO₄, distile su ve temel elektrolit çözeltisi (Background electrolyte, BGE) sırası ile yapılmıştır. Sonraki yıkamalarda, bazla ve suyla yıkama, sıradan çıkarılarak bir yıkama işlemi uygulanmıştır.

3.6. Farmasötik Preparatlardan FOR'un Kazanımı

Kapsül içerikleri tartılıp deney tüplerine alındıktan sonra üzerlerine 2.5 mL çalışma elektroliti eklenip üç kez üçer dakika vortekslenmiştir. Çözelti berrak olmasına karşın partikül bulunmayacak şekilde gerekli işlemler yapılmıştır.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1. Yöntemin Optimizasyonu ile İlgili Çalışmalar

Deneilerin yapılışında önce bazik bir çözeltinin kullanımı tercih edilmiş, 8, 8.5 pH'a sahip çözeltilerde FOR pikinin elektroozmozdan daha önce geldiği gözlenmiştir. Çözelti pH'ı 9, 9.6 gibi değerlere çıkıldığında FOR piki elektroozmozun gerisine düşmüştür. Diğer yandan, FOR'un çözünürlüğü nedeniyle organik çözücü kullanılması düşünülmüştür. Organik çözücünün az kullanılması durumunda omuzlu pikler meydana gelmiştir. FOR'un ilk çözünmesi sürecinde etanol yüzdesinin % 20 nin altına düştüğü durumlarda omuzlu piklerin belirmesi sürmüştür. Yukarıda belirtilen nedenlerle bazik bir elektrolit kullanımından vazgeçilmiştir.

FOR'un çözünürlüğü pik şekli üzerine çok etkili olmaktadır. Yeterince çözünmediği durumlarda pikler omuz halinde belirmektedir. Etanol ve metanol gibi çözücülerin derişimi artırıldığında pik şekilleri normale dönüşmektedir.

FOR'un kapiler elektroforez ile analizi hedeflendiğine göre bu yönteme temel oluşturan kurallar gözden geçirildiğinde molekül üzerinde oldukça fazla artı yükün varlığı dikkat çekmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, bazik bir elektrolit kullanıldığında eksi yük taşıyan silanol gruplarının FOR'un üzerindeki artı yükü girişim yaptığı sonucu çıkmaktadır.

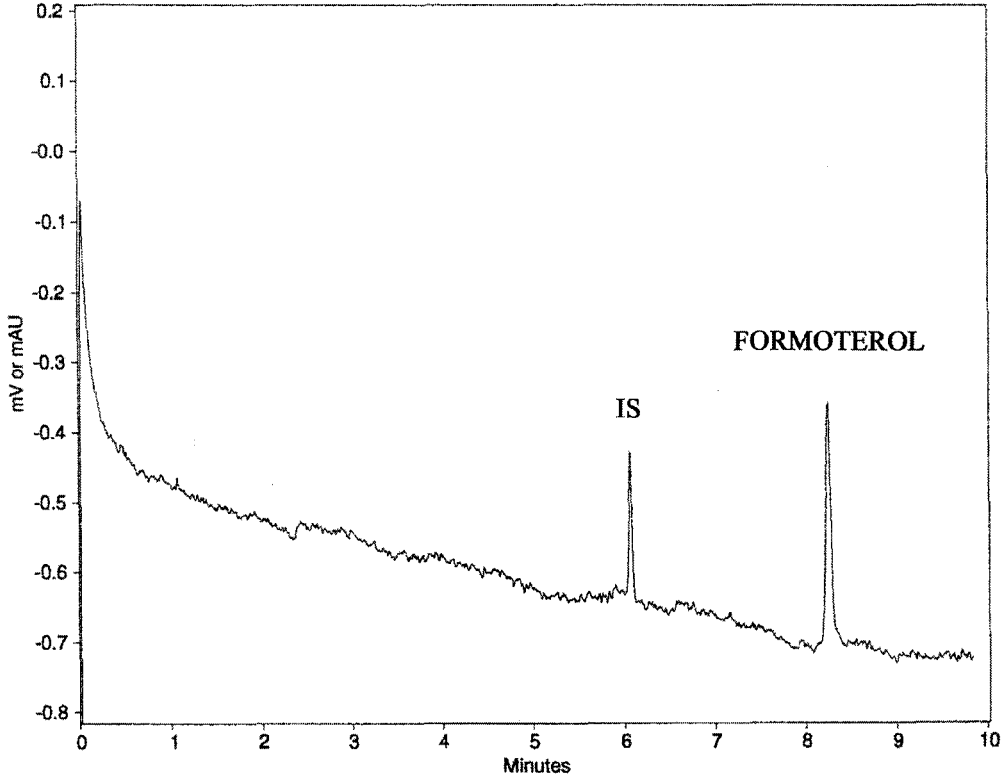
Elektrolit çözeltisi asidik bölgede olduğu zaman silanol grupları büyük ölçüde kapandığından molekülün kapiler duvarı ile etkileşimi daha az olur. Bu nedenle asidik çözelti ile çalışılması planlanmıştır.

Kapiler elektroforez ile yapılan analiz çalışmalarında analiz öncesi ve analiz sonrası yıkamanın analizin tekrar edilebilirliğini doğrudan etkilediği

görülmüştür. Bunun nedeni de ortamda bulunan silanol gruplarının her seferinde aynı şekilde şartlanması ve aktifliklerinin her analizde eşit olması gerekliliğidir. Farklı aktifliklerde olan yani iyonizasyonları farklı olan silanol gruplarının analiz materyalinin göç zamanlarını etkileyeceği şüphesizdir. Bunun yanı sıra kılcal kolonda bir önceki analizden artık maddenin kalmaması da yıkamanın birincil nedenlerindedir. Bu çalışmada analiz sonrası kılcal kolonu temizlemek ve silanol gruplarını şartlandırmak için analiz sonrası yıkama çözeltisi olarak 0.1 M HClO₄ analiz öncesi yıkama çözeltisi olarak da çalışma tamponu kullanılmıştır

FOR çözeltisinden 0.5 saniyelik enjeksiyon yapılmış ve sözü edilen madde kapiler penceresinin önünden geçerken 200 nm de tayini yapılmıştır. Sisteme 27 kV potansiyel uygulanarak analiz gerçekleştirilmiştir. Deneyler oda sıcaklığında yapılmıştır. 6.0x10⁻⁶ M derişiminde ki FOR çözeltisi % 20 asetonitril içeren 50 mM fosfat çözeltisinin pH'ını 2.5 ayarlanması ile hazırlanmış elektrolit çözeltisi içerisinde yürütülmüştür. Bu sistemde, FOR ortalama 8.3 dakikada gelmiştir. Bu süre bir analiz için çok uygun bir süredir.

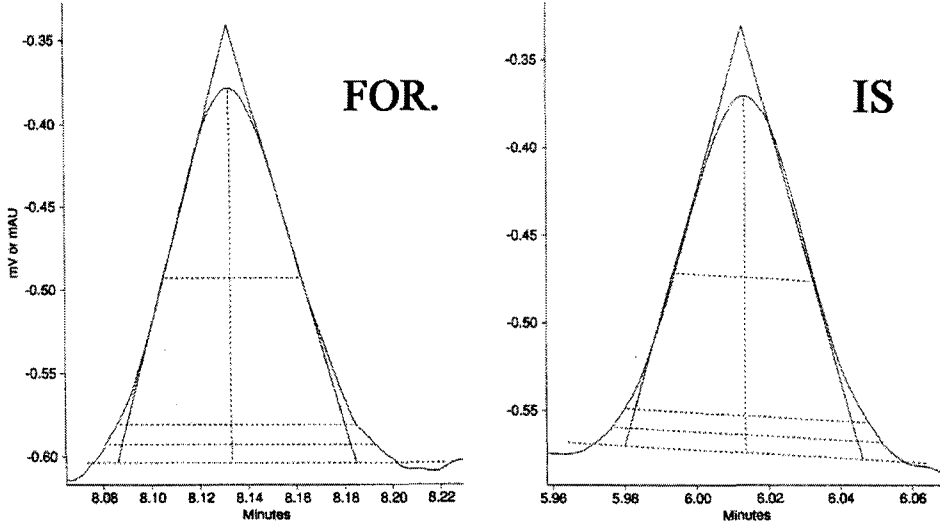
Kapiler elektroforez yüklü ve yüksüz parçacıkların taşınmaları ile ilgili bir yöntem olduğundan kromatografik tekniklere benzer olarak IS kullanımına gerek vardır. Bu yüzden uygun sürede elektroferogramda belirecek bir IS ye gerek duyulmaktadır. Bu amaçla, 7.6x10⁻⁶M 3,4 dihidroksibenzilamin enjekte edildiğinde 6.1 dakikada belirlediği gözlenmiştir. FOR ve IS birlikte enjekte edildiğinde gözlenen elektroferogram Şekil 4.1.1. de verilmektedir.



Şekil 4.1.1. 0.5 s enjekte edilen 6.0×10^{-6} M FOR ve 7.6×10^{-6} M IS nin %20 asetonitril ve 50 mM fosfat pH 2.5 elektroliti içerisinde 200 nm ve 27 kV daki elektroferogramı.

4.2. Yöntemin Geçerliliği (validasyonu) ve Seçiciliği

Şekil 4.1.1. de görüldüğü gibi hem FOR hem de IS uygun sürede belirlemektedir. Belirtilen koşullarda düzgün pikler meydana gelmektedir ve bu pikler başka maddeler tarafından etkilenmemektedir. İlgili pikler ile integrasyon verileri Şekil 4.2.1. ve değerlendirmeleri Çizelge 4.2.1 de sunulmaktadır. Bu sonuçlara dayanılarak yöntemin seçici olduğu sonucu çıkarılabilir.



Şekil 4.2.1. %20 asetonitril ve 50 mM fosfat pH 2.5 elektroliti içerisinde 200 nm ve 27 kV daki 6.0×10^{-6} M FOR ve 7.6×10^{-6} M IS nin piklerinin aletsel integrasyon şekilleri.

Çizelge 4.2.1. FOR ve IS pikleri ile ilgili integrasyon ve elektroforetik değerlendirmeler.

	IS	FOR
Göç zamanı (Mt)	6.1	8.3
Kapasite faktörü	11.02	15.26
Alan	487	794
Tabandaki pik genişliği (dak.)	0.066	0.099
Simetri faktörü	1.0158	1.0779
Asimetri faktörü	1.01	1.05
Tabak sayısı	132208	107190
Tabak /metre	1322082	1071897
Teorik tabaka eşdeğer yükseklik	0.000075	0.0093
Ayırım(Resolution)	25.6, 26.3	25.6, 26.3

Yöntemin geçerliliğinin (validasyon) araştırılması sürecinde yukarıda belirtilen analitik ve aletsel koşullarda altı ardışık enjeksiyon yapılmış ve cihazın

hesapladığı integrasyon değerleri Çizelge 4.2.2 de olduğu gibi istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.

Şekil 4.1.1 de hem FOR hem IS uygun sürede belirmekte olduğu ve bu koşullarda yöntemin seçiciliği görülmektedir.

Yöntemin seçiciliğinin incelenebilmesi için yukarıdaki analitik ve aletsel koşullarda altı enjeksiyon yapılmış ve sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.2.2. Elektroferogramdaki bazı parametrelerin geçerliliğinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi (n=6).

	Mt(FOR)	A(FOR)	Mt(IS)	A(IS)	PN(FOR)	PN(IS)	PN(FOR)/PN(IS)
	8.07	1041	5.96	467	128.85	78.34	1.64
	8.06	1024	5.94	475	127.05	79.97	1.59
	8.07	1009	5.95	450	125.03	75.63	1.65
	8.05	1019	5.92	443	126.54	74.74	1.69
	8.02	971	5.91	475	120.97	80.37	1.51
	8.14	1051	6.008	466	129.10	77.56	1.66
Ort.	8.07	1019.17	5.95	462.67	126.26	77.77	1.62
SD	0.04	28.06	0.03	13.28	3.00	2.27	0.07
RSD	0.47	2.75	0.57	2.87	2.38	2.92	4.18

Çizelgedeki değerlendirmelere bakıldığında, tekrarlanabilirlik ile birlikte kesinlik değerinin de çok iyi olduğu görülmektedir. Ancak, her zaman çok iyi tekrarlanabilirlik sonuçları veren PN/PN_{IS} ilişkisinin buradaki düşüklüğünün kullanılan standart maddenin azlığı ve farmasötik preparatlarında ki miktarının düşüklüğü nedeniyle küçük hacimli pipetlemelere başvurulmasına bağlanabilir. Yine de 4.18 RSD değerinin makul ölçülerde olduğu söylenebilir. Bu sonuçlardan sonra miktar tayini ile ilgili tüm çalışmalarda PN_{FOR}/PN_{IS} ilişkisi kullanılacaktır.

4.3. Doğrusallık İlişkisi

FOR'un doğrusallık ilişkisi 2.38×10^{-6} - 7.152×10^{-6} M (2 ppm – 6 ppm) derişimleri arasında ve deneysel bölümde anlatıldığı şekilde hazırlanmış FOR'un artan derişimlerde, IS nin sabit derişiminde üçlü set halinde farklı günlerde enjeksiyonlar yaparak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonuçları Çizelge 4.3.1 de gösterilmektedir.

Çizelge 4.3.1. Gün içi ve günler arası lineerlik ilişkileri sonuçları.

	Gün İçi	Günler Arası
Derişimin SD'sı	± 0.0232	± 0.1301
a \pm SD	204667 ± 4925.51	235165 ± 6521.57
a \pm CL (0.5)	204467 ± 7004.77	235165 ± 3637.14
b \pm CL(0.5)	0.0259 ± 0.05	0.1277 ± 0.02
Korelasyon Katsayısı	0.9994	0.9992
Doğru Denklemi	$y = 204667x + 0.0259$	$y = 235165x - 0.1277$

Tekrarlanabilirlik incelemelerinde olduğu gibi noktaların dağılımı nedeniyle eğimde bir farklılık göze çarpmaktadır. Bunun da, seyrelmelerin küçük hacimler kullanılarak yapılmış olmasından kaynaklandığı söylenebilir.

Setler arası korelasyon katsayılarının çok iyi olduğu hemen göze çarpmaktadır. Elde edilen sonucun analitik açıdan kullanılabilir olacağı, hatalar toplamının % 2 nin üzerine çıkmayacağı hemen söylenebilir.

Saptama sınırı (limit of detection, LOD) $S/N = 3.3$ 1.28×10^{-6} M olarak hesaplanmıştır.

4.4. Geliştirilen Yöntemle Farmasötik Preparatlarda FOR Tayini

Deneysel bölümde farmasötik preparatlardan geri kazanımı anlatılan FOR çözeltisi; kapsül içeriğinin alınıp 2.5 mL çalışma elektrolitinde çözülmesi ile hazırlanmıştır. Bu çözelti santrifüjlendikten sonra üzerinden 2 mL alınarak ve 0.5

mL IS eklenip analiz numunesi hazırlanmıştır. Bu numune cihaza enjekte edilmiş ve belirlenen optimum koşullarda yürütülmüştür. İntegrasyon verilerinden yararlanarak her bir kapsülün FOR içeriği μg olarak hesaplanmış, preparatın üzerindeki miktar %100 kabul edilerek her bir kapsülün % FOR içeriği hesaplanmıştır. Çizelge 4.4.1. in birinci sütununda TSP Spectraphoresis 100, ikinci sütunda TSP Spectraphoresis 1000 ile gerçekleştirilen analizlerin % saflık sonuçları bulunmaktadır.

Çizelge 4.4.1. TSP 100 ve TSP 1000 aletleri ile FOR preparatlarında yapılan miktar tayini sonuçları.

	% Saflık TSP 100 n=6	% Saflık TSP 1000 n=6
	101	101
	98	98
	100	103
	95	99
	95	101
	99	99
ortalama	98	100.1
t-test	0.05	tablo t değeri:2.015
F-test	0.50	tablo F değeri:5.05

Bu sonuçlar incelendiğinde, ortalamaların birinci yöntemle % 2 düşüklüğü, ikinci yöntemle % 0.1 gibi fazlalığı görülmektedir. Gerçekte her iki yöntemin de ($\pm\% 10$) fark ile USPXXIV [17] tarafından kabul edilebilir sınırlar içerisine girdiği belirtilmektedir. Ayrıca, iki alet arasındaki uyuşmayı ortalamalar açısından inceleyen t-testine göre ($0.05 < 2.015$)ve ortalamaların karelerinin oranına göre inceleyen F-testine göre ($0.5 < 5.05$) farklı aletlerde ki ve farklı laboratuvarlarda ki sonuçlar arasında önemsiz fark (insignificant difference) bulunmaktadır. Sonuç olarak, deneyin sağlamlığının[12] (robustness) da geçerli olduğu söylenebilir.

Bu tez ile, 12 μ g FOR içeren kapsüllerin analizinde kullanılabilir bir CE yönteminin geliştirilmesine çalışılmıştır. Tayinin 9 dakika gibi analiz için kısa sayılabilecek bir sürede, güven içerisinde, kesin (precise) ve diğere yöntemlere göre çok az masraflı olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. LEMOINE, H., *Quantitative Structure-Activity Relationships*, **11**, 211-218, 1992
2. A.J.M. SCHREURS, H.E.J. SINNINGHE DAMSTE, C.S. DE GRAAFF, A.P.M GREEFHORST., *European Respiratory Journal*, **9**, 1678-1683, 1996
3. NALINE E., ZHANG Y., QUIAN Y., MAIRON N., ANDERSON G.P., GRANDORDY B., Advenier C., *European Respiratory Journal*, **7**, 914-920, 1994
4. MURASE, K., MASE, T., IDA, H., TAKAHASHI, K., MURAKAMI, M., *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1123, 1978
5. WALDECK, B., *Chirality*, **5**, 350-355, 1993
6. TROFAST, J., OSTERBERG, K., KALLSTROM, B.L., WALDECK, B., *Chirality*, **3**, 443-450, 1991
7. CHERKAOUI, S., FAUPEL, M., FRANCOU, E., *Journal Of Chromatography A*, **715**, 159-165, 1995
8. CAMPESTRINI, J., LECAILLON, J.B., GODBILLON, J., *Journal Of Chromatography B*, **704**, 221-229, 1997
9. VANDENBERG, B.T.J., PORTIER, E.J.G., VANDENBERG, M., BRAAT, M.C.P., VANBOXTTEL, C.J., *Therapeutic Drug Monitoring*, **16**, 196-199, 1994
10. GRAHAM, S.J., BEAULIEU, N., LOVERING, E.G., *Journal Of Liquid Chromatography*, **16**, 1497-1503, 1993
11. BUTTER J.J., VAN DEN BERG B.T.J., PORTIER E.J.G., KAISER G., VAN BOXTEL C.J., *Journal of Liquid Chromatography Rel. Technol.*, **19**, 993-1005, 1996
12. JING, ZHENG S., JUE, C., SONG, J.T., ZENG, P.S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, **21**, 569-576, 1999
13. SAMIR, C., MICHEL, F., ERIC, F., *Journal Of Chromatography A*, **715**, 159-165, 1995
14. ANDERSON, G. P. *Life Sciences*, **52**, 2145.1993
15. FRANCOU, E.R., RICHERT, P., *Journal Of Chromatography A*, **769**, 101-107, 1997

16. ROBERT, H., QUIN, K.F., YUN, G., YAPING, H., HAL, T.B., XIAOYI, M., STEPHEN, A., *Tetrahedron Letters*, **38**, 1125-1128, 1997
17. The United States Pharmacopeia XXIV, Marck Printing Co., Easton, s: 992-993, 2000