

**PRAVASTATİN'İN
FARMASÖTİK PREPARATLARDA
KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE
MİKTAR TAYİNİ**

KEVSER KIRCALI
Yüksek Lisans Tezi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Eylül-2001

Tezimin bir kısmından veya tamamından fotokopi çekilebilir.

K. Kircali
Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphanesi

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kevser KIRCALI'nın "PRAVASTATİN'İN FARMASÖTİK PREPARATLARDA KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE MİKTAR TAYİNİ" başlıklı Analitik Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi ...13.09.2001... tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. M. Tuncel	
Üye	: P.K.F. P.R. SEDEF K.I.R.	
Üye	: Yard. Doç. Dr. Zehi Altın	
Üye	:	
Üye	:	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ..05.09.2001.. tarih ve ...20/2... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

ÖZET**Yüksek lisans Tezi****PRAVASTATİN'İN FARMASÖTİK PREPARATLARDA KAPİLER
ELEKTROFOREZ İLE MİKTAR TAYİNİ****KEVSER KIRCALI****Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı****Danışman: Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL****2001**

Bu tezde, pravastatin (PRA)'in kapiler elektroforez yöntemi ile tayini tanıtılmaktadır. Tayin, % 10 asetonitril ve 10 mM borattan oluşan pH 8.5 elektrolit çözeltisinde, 0.5 saniye vakum enjeksiyonu kullanarak, 200 nm de, sisteme 27.5 kV voltaj uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda IS olarak kullanılan lansoprazol 3.9, PRA ise 4.8 dakikada göç etmiştir. Yöntemin tekrarlanabilirliği, seçiciliği ve doğrusallığı incelenmiş ve iyi sonuçlar bulunmuştur. En düşük saptama sınırı (LOD) 8.98×10^{-6} M olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada tabletlerdeki PRA'nın miktar tayini yapılmış ve tabletlerdeki PRA'nın miktarı ortalama $\% 107.6 \pm 4.0$ olarak bulunmuştur.

Yukarıdaki sonuçlara göre; yöntemin güvenilir, doğru, hızlı ve ucuz olduğu söylenebilir. Bu nedenle, rutin analiz laboratuvarları için önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Pravastatin, Kapiler Elektroforez, Miktar Tayini

ABSTRACT**Master of Science Thesis****DETERMINATION OF PRAVASTATIN IN PHARMACEUTICAL
PREPARATION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS (CE)****KEVSER KIRCALI****University of Anadolu
Institute of Health Sciences
Department of Analytical Chemistry****Supervisor: Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL****2001**

The determination of pravastatin is described by capillary electrophoresis, in this thesis. The analysis was performed in a background electrolyte consisting of 10 percent acetonitrile and 10 mM borate at pH: 8.5, applying 27.5 kV and detecting at 200 nm. In the mentioned conditions, pravastatin and lansoprazole as (IS) were appeared at 4.8 and 3.9 minutes, respectively. The selectivity, repeatability and linearity of the method was examined and good results for the determination was found. Limit of detection (LOD) was determined as 8.98×10^{-6} . Besides, the determination of pravastatin was performed in a pharmaceutical preparation to examine the applicability of the method. The percent of pravastatin was determined as 107.6 with 4.0 standard deviation (SD).

As conclusion, it can be expressed that he method is reliable, precise, fast and highly cheap. Therefore, it is proposed for routine laboratories.

Keywords: Pravastatin, Capillary Electrophoresis, Determination

TEŞEKKÜR

Bize özgür bir Türkiye’de bilimsel araştırma imkanını kazandıran yüce önderimiz Mustafa Kemal ATATÜRK’e

Bilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendiren, değerli fikirleri ve hoşgörüsü ile destekleyen çok değerli hocam Eczacılık Fakültesi Temel Bilimler Bölümü Başkanı Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL’e

Analitik Kimya Anabilim Dalı personeline,

Eğitim hayatım boyunca bana emeği geçen tüm hocalarıma,

Destek ve yardımları ile her zaman yanımda olan sevgili ağabeyim Ali KIRCALI’ya, anneme ve babama,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa	
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞIRMASI.....	2
2.1. Pravastatin ile İlgili Genel Bilgi.....	2
2.2. Pravastatin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	4
2.3. Pravastatin ile İlgili Yapılmış Çalışmalar.....	4
3. DENEYSEL BÖLÜM.....	9
3.1. Kimyasal Maddeler	9
3.2. Aletler.....	9
3.3. Çalışma Elektrolitinin hazırlanması.....	10
3.4. Kapilerin Yıkama İşlemleri.....	10
3.5. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	10
3.6. Tabletlere Uygulanan İşlemler.....	10
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	12
4.1. Yöntemin Optimizasyonu.....	12
4.2. Doğrusallığın İncelenmesi.....	16
4.3. Geliştirilen Yöntemin Tabletlere Uygulanması.....	16
5. KAYNAKLAR.....	19
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Kolesterol biyosentezi ve sınırlayıcı hız basamağı	3
2.2.a. PRA'nın kimyasal yapısı	4
2.2.b. LNS'nin kimyasal yapısı	4
4.1. PRA ve LNS'nin 10 mM borat ve % 10 ACN'den oluşan pH 8.5 elektrolit içerisinde, 0.5 s enjeksiyon, 27.5 kV voltaj uygulanarak 200 nm'deki elektroferogramı	13
4.2.a. IS'nin pikleri ile ilgili kayıtlar	15
4.2.b. PRA'nın pikleri ile ilgili kayıtlar	15
4.3. Tabletlerdeki PRA örneğinin IS katıldıktan sonra kaydedilen elektroferogramı	17

ÇİZELGELER DİZİNİ

4.1. PRA ve LNS alan ve göç zamanları açısından integrasyon, bunlara ek olarak pik normalizasyon ve pik normalizasyon oranları değerlendirmeleri	14
4.2. PRA ve IS'nin pikleri ile ilgili integrasyon değerlendirmeleri	15
4.3. Gün içi ve günler arası kalibrasyon değerlendirmeleri	16
4.4. PRA tablet analiz sonuçları	18
4.5. PRA tablet deneylerinin istatistiksel hesapları	18

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Pravastatin (PRA), HMG-CoA'nın mevalonata dönüşümünü katalize eden, HMG-CoA redüktaz enzimi inhibitörü olup, insan organizmasındaki toplam kolesterol düzeyini düşüren maddelerden biridir[1-3]. Son yıllarda statinler diye bilinen bu grup maddeler ile çok başarılı sonuçlar alındığından hekimler tarafından 10 ve 20 mg'lık tabletleri reçetelere önemli ölçüde yazılmaktadır.

PRA tayini için, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)[4,5], Sıvı Kromatografisi/Tandem Kütle Spektrometrisi (Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry, LC/MS/MS)[6], İndüklenmiş Lazer Floresans (Laser Induced Fluorescence, LIF) dedektör ile Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)[7], Kapiler İyon Elektroferez (Capillary Ion Electrophoresis, CIE)[8], Kapiler Elektroferez (Capillary Electrophoresis, CE)[9], Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi/Atmosferik Basınc Kimyasal İyonizasyon Kütle Spektrometrisi (Liquid Chromatography /Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, LC/APCI-MS)[10] ve Gaz Kromatografisi/Kimyasal İyonizasyon Kütle Spektrometrisi (Gas Chromatography/Chemical Ionization Mass Spectrometry, GC/CIMS)[11] gibi yöntemler kullanılmıştır.

Son zamanlarda, kapiler elektroferez genel analitik laboratuvarlarının gözde yöntemlerinden biridir. Çalışmalardaki kolaylığı ve analiz maliyetinin düşüklüğünün yanı sıra biyolojik çalışmalara yatkınlığı gibi üstünlükleri ile çoğu araştırmacının yeğlediği yöntemlerden biridir. Statinlerden biri olan fluvastatinin de kapiler elektroferez ile yapılmış bir yöntem geliştirme çalışması bulunmaktadır[9].

Bu tez ile, kapiler elektroferez kullanılarak doğrudan Kapiler Zon Elektroferez (CZE) tekniği ile PRA'nın elektroforetik davranışlarının incelenmesi ve tabletlerdeki PRA tayinine uygulanması amaçlanmıştır.

Yöntem geliştirilirken analitik açıdan tümüyle bilimsel yol izlenmiş, ilgili validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.

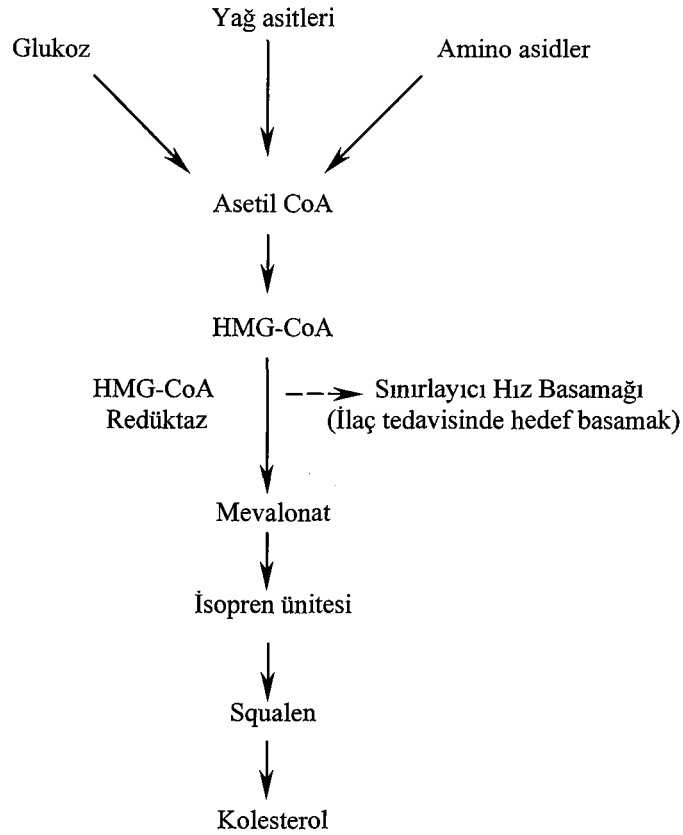
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Pravastatin ile İlgili Genel Bilgi

HMG-CoA redüktaz inhibitörleri, 3-hidroksi-3-metilglutaril Coenzim A'yı inhibe ederler ve kolesterol biyosentezinde sınırlayıcı ajanlardır. Kolesterol biyosentezi ve sınırlayıcı hız basamağı Şekil 2.1'de gösterilmektedir. PRA lipit düşürücü etkisini iki yolla gerçekleştirmektedir. İlk olarak, HMG-CoA redüktaz aktivitesini tersinir olarak inhibe etmek suretiyle intraselüler kolesterol seviyelerinde az ölçüde bir azalma meydana getirir. Bunun sonucunda hücre yüzeylerindeki düşük yoğunluklu lipoprotein (Low Density Lipoprotein, LDL) reseptör sayısında, reseptör aracılığıyla oluşan katabolizmada [1] ve dolaşımda bulunan LDL'nin klirensinde artma meydana gelir[2]. İkinci olarak, PRA, LDL ön maddesi olan çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (Very Low Density Lipoprotein, VLDL) karaciğerdeki sentezini inhibe etmek suretiyle LDL oluşumunu inhibe eder[3].

PRA aktif bileşiği, sodyum tuzu halinde ağız yoluyla uygulanır. Karaciğerde geniş ölçüde ilk geçiş ekstraksiyonuna maruz kalmakta ve absorbe edilen miktarın yaklaşık % 46'sı hepatik ekstraksiyon ile değişikliğe uğramaktadır[2].

PRA, insanlarda plazma toplam kolesterol ve LDL konsantrasyonlarını düşürücü etkilidir. HMG-CoA redüktaz inhibitörleri, kolesterol biyosentezinin hız sınırlayıcı basamağını inhibe ederek, kardiyovasküler hastalık ve ölümlerin önemli bir nedeni olan LDL kolesterol konsantrasyonunu %20-35 oranında azaltmaktadır[1,3]. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (High Density Lipoprotein, HDL)'lerin yapısında başlıca Apolipoprotein (Apo) AI ve AII proteinleri bulunmaktadır. Hiperlipidemik hastalar 10-20 mg/gün PRA ile tedavi edilmişler ve 12 hafta sonunda Apo AI ve AII düzeylerinin %12-16 dolayında arttığı gözlenmiştir. Buradan da PRA'nın HDL konsantrasyonunu arttırdığı anlaşılmaktadır[12].



Şekil 2.1. Kolesterol biyosentezi ve sınırlayıcı hız basamağı[13]

Dekalin halkasına hidroksil gruplarının bağlı olmasından dolayı, PRA diğer HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinden daha büyük hidrofilite göstermektedir. PRA'nın proteinlere bağlanma oranı yaklaşık %50'dir. Oysa, lovastatin, fluvastatin ve simvastatinin proteinlere bağlanma oranınının %90'dan daha fazla olduğu görülmektedir[1,3,14].

PRA'nın, diğer HMG-CoA redüktaz inhibitörleri ile karşılaştırıldığında düşük hepatik ekstraksiyon, düşük safra boşaltımı ve yüksek üriner boşaltıma uğradığı belirtilmiştir[1,3,14,15].

PRA, HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinden lovastatin ve simvastatin ile karşılaştırıldığında PRA'nın metabolik modelinin daha az kompleks olduğu gözlenmekte ve aynı zamanda biyoaktivitesinin yaklaşık %75 olduğu belirtilmiştir[15,16].

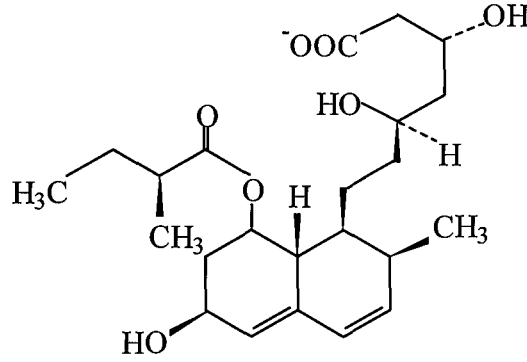
Bu güne kadar HMG-CoA redüktaz inhibitörleri üzerinde çok sayıda farmakokinetik araştırma yapılmış ve buna göre fluvastatin ve PRA en iyi HMG-CoA redüktaz inhibitörleri olarak nitelendirilmişlerdir[1].

2.2. Pravastatin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

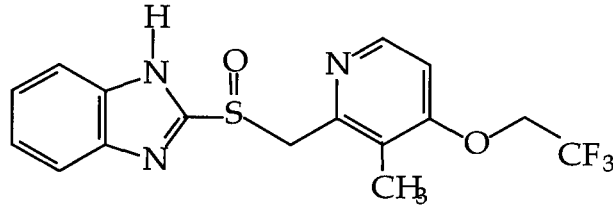
PRA kimyasal olarak, [1S-[1 α (β S*, δ S*),2 α ,6 α ,8 β -(R*),8 α]]-1,2,6,7,8,8a-hekzahidro - β , δ , 6- trihidroksi -2- metil -8-(2 – metil -1- oksobutoksi) -1-naftalenheptanoik asit (Şekil 2.2.a) olarak adlandırılır. Kapalı formülü C₂₃H₃₆O₇' dir. Molekül ağırlığı 424.25' dir[17].

Lansoprazol (LNS) ise, 2-[[[3- metil -4-(2,2,2-trifloroetoksi) -2- piridinil] metil] sülfenil]-1H-benzimidazol (Şekil 2.2.b) olarak adlandırılır. Kapalı formülü C₁₆H₁₄F₃N₃O₂S 'dir. Molekül ağırlığı 369.37' dir[17].

a)



b)



Şekil 2.2.a) PRA'nın kimyasal yapısı

b) LNS'nin kimyasal yapısı

2.3. Pravastatin ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Otter ve Mignat[4], insan plazmasındaki HMG-CoA redüktaz inhibitörü olan PRA'nın tayini için hassas HPLC yöntemini kullanmışlardır. İç standart olarak triamsinolon asetonid kullanılmış ve ters-faz sıvı-faz ekstraksiyonu

temeline göre örnek hazırlanmıştır. Birkaç HPLC kolonunda ayırma yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Üç farklı üretici firma tarafından üretilmiş C₁₈ sıvı faz kartuşların verimleri karşılaştırılmıştır. Buna göre; PRA'nın yüksek verimi nedeniyle C₁₈ ekstraksiyon kartuşları yeğlenmiş. Bond elut C₁₈ ekstraksiyon kartuşları 3 ml su ve 2 ml metanol ile hazırlandıktan sonra maddeler C₁₈ ters-faz analitik kolonu ile ayrılmış ve UV detektörü ile tayin edilmiştir. Plazmadaki PRA'nın geri kazanımı % 69.2±6.7 (ortalama±SD) olarak bulunmuştur. Sulu çözeltideki PRA için tayin limiti 0.4 ng/ml, plazmadaki saptama limiti ise 2 ng/ml'dir. İki sağlıklı gönüllü ile yapılan öncelikli farmakokinetik çalışmada plazmadaki PRA'nın yarılanma ömrünün (t_{1/2}) 0.8 - 2.3 saat olduğu bulunmuştur.

Siekmeier ve ark. [5], PRA tayini için HPLC yöntemini kullanmışlardır. Örnekler siklohegzil bağlı kartuşlarda sıvı faz ekstraksiyonu ile hazırlanmış ve oktil matriksinde kromatografiye tatbik edilmiştir. İç standart olarak triamsinolon asetonid kullanılmıştır. Bu yöntem 5-200 µg/l PRA derişim sınırlarında doğrusaldır. 10, 50, ve 100 µg/l PRA derişimlerinde üç seri analiz yapılmış ve bunların varyasyon sabitleri hesaplandığında %10'dan fazla olmadığı bulunmuştur. PRA'nın sağlıklı bireyler üzerinde yapılan deneylerle farmakokinetiği tayin edilmiştir. Beş sağlıklı deneğe PRA'nın 60 mg'lık oral dozundan ve bunlardan birine de 80 mg'lık ilave bir dozu üç farklı günde verilmiştir. İlaç alımından 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 ve 300 dakika sonra bütün deneklerden kan örnekleri alınmıştır. Buna göre PRA'nın en yüksek plazma konsantrasyonlarının 60 mg'lık oral doz alımından itibaren 60 dakika ve 120 dakika arasında olduğu ve etki ettiği değerlerin 37 µg/l ve 126 µg/l olduğu bulunmuştur.

Mulvana ve ark.[6], insan serumundaki PRA, PRA-d₅, SQ31906, SQ-31906-d₅ ve PRA-lakton'un tayinini için hassas, seçici ve tekrarlanabilir analitik yöntem geliştirerek validasyon çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. 0.5 ml serum örneği alınarak, beş analit insan serumundan yonteme göre ayrılmıştır. Örnek sıvı faz ekstraksiyonu ile ekstre edilmiş ve asitlendirilmiştir. Ekstrakt örneği, pozitif iyon modunda turbo iyon sprey LC/MS/MS ile analiz edilerek yeniden değerlendirilmiştir. Toplam analiz süresi 9 dakikadır. Beş analit için en düşük tayin limitinin 0.5 ng/ml olduğu belirtilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin beş analit için

0.5 ng/ml den 100 ng/ml 'ye kadar doğrusal olduğu ve kalibrasyon eğrisinden de korelasyon katsayısının ≥ 0.999 olduğu bulunmuştur. Doğruluk ve kesinlik kalite kontrol (QC) örnekleri, 2, 30, 80 ve 500 ng/ml derişimlerde hazırlanmıştır. Kalite kontrol örneklerinden, gün içi ve günler arası kesinlik ve günler arası doğruluk değerleri hesaplanmış, bütün analitler için %8 dolayında bulunmuştur. Ekstraksiyon geri kazanımının ise bütün analitler için %90'dan fazla olduğu bulunmuştur. Buz-su banyosunda (≤ 10 °C) ilacın hazırlanması süresince karşılaşılan stabilite deneylerinde, serumdaki PRA-lakton'un PRA'ya hidroliz olduğu gözlenmiştir. PRA, PRA-d₅, SQ-31906 ve SQ-31906-d₅'in bu koşullar altında 24 saate kadar stabil olduğu gözlenmiştir. Serum örnekleri buz-su banyosunda muhafaza edilmiş ve pH: 4.5 serum tampon yardımıyla hidrolizi azaltılmıştır. Tüm analitlerin, üç donma-erime devrinden sonra ve yeniden oluşturma çözeltisinde 4°C'de 1 hafta sonunda stabil olduğu söylenebilir. Ayrıca -70°C'de 77 gün depolandığında insan serumundaki bütün analitlerin stabil olduğu belirtilmiştir. Analizi yapılan örneklerin stabiliteleri aynı şekilde incelenmiş ve sonuçlar, kalite kontrol örneklerinden elde edilenlerle karşılaştırılmıştır.

Dumousseaux ve ark. [7], kolesterol düşürücü ajan olan PRA'nın plazmadaki tayini için, antikor kolon ekstraksiyonu ile maddeyi kazanmış ve HPLC kullanarak LIF'e dayalı miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. Plazma örneği kolona uygulanmış, su ile yıkandıktan sonra ilaç metanol ile elüe edilmiştir. N-Dansiletilendiamin (DNS-ED) ilacın karboksil grubuna dioksan içerisindeki dietil fosforosiyaniat (DEPC) ve trietilamin (TEA) varlığında birleştirilmiştir. Türevlendirme işlemi beş dakikada tamamlanmıştır. Saptama limiti (LOD) 2 pg/ml olup normal floresans tayinlerinden 20 kez daha duyarlı olduğu bulunmuştur, tayin limiti (LOQ) ise 100 pg/ml olarak bulunmuştur. 1-100 pg/ml lik çözeltelerde CV (varyasyon sabiti) % 8 olarak hesaplanmıştır. Sıçanlarda (20 mg/kg) ve köpeklerde (5 mg/kg) tek doz uygulamasında ortalama değerler sırasıyla 142 ve 310 ng/ml olarak bulunmuştur.

Nair ve Izzo [8], hızlı bir ayırma tekniği olan ve elektriksel alan içinde yüklü ve yüksüz türlerin farklı göç etmeleri temeline dayanan CIE yöntemini kullanmışlardır. İyonların hızlı tayin ve saptanması için indirekt UV detektör ve ozmotik akış izleyici ile kombine edilmiş CE temellerine dayanan CIE yöntemi

kullanılmıştır. 60 cm x 75 mm iç çapında ergitilmiş silika kapiler ile donatılmış patentli kromat tampon ve osmotik akış izleyici ile birleştirilmiş Water Quanto 4000 CE sistemi kullanılmıştır. Parametreler optimize edilmiş ve analitlerin göç zamanlarının 5.0 dakika içinde olduğu belirtilmiştir. Parametreler için yapılan optimizasyon çalışmalarında sistemin analiz süresi, voltajı, doğrusallığı, kesinliği ve tayin limiti gösterilmiştir. Ayrıca örnek seyreltmelerdeki organik çözücü varlığının anyonların göç zamanlarına olan etkisi incelenmiştir. PRA, taksol ve iopiperidol için yöntemin uygulamaları tanımlanmıştır. Bu doğrultuda iyon kromatografisinin avantaj ve dezavantajlarının karşılaştırılması tartışılmıştır.

Kawabata ve ark. [10]'nın yapmış olduğu bu çalışmada, insan plazmasında HMG-CoA redüktazın kuvvetli inhibitörü olan PRA ve başlıca metabolitinin tayini için LC/APIC-MS metodu anlatılmıştır. İnsan plazmasındaki PRA ve R-416, sıvı-faz ekstraksiyonu kullanılarak ayrılmış ve LC/APIC-MS ile analiz edilmiştir. Seçilen iyon izleyici, kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile 0,625-80 mg/ml sınırlarının üzerinde saptamayı mümkün kılmıştır. Polar moleküller için türevlendirmeye gerek bulunmamaktadır. PRA, P-416 ve iç standart (R-1437)'in alıkonma zamanları sırasıyla 2.1, 2.5 ve 3.9 dakikadır, toplam analiz süresi ise 5 dakikadır. Bu metod Gaz kromatografisi/negatif iyon kimyasal iyonizasyon kütle spektroskopisi koşullarına göre otomatikleştirilerek karşılaştırılmış ve validasyonu yapılmıştır.

Morris ve ark. [11], plazmadaki HMG-CoA redüktaz inhibitörleri lovastatin, PRA ve simvastatinin saptanması için GC/CIMS metodunu geliştirmişler ve validasyonunu yapmışlardır. Analitler, sıvı-faz ekstraksiyon işlemi ile plazmadan ilaçların lakton ve asit formlarının ayrılması ile elde edilmiştir. Lakton, karboksil grubunun pentaflorobenzilasyonu ile türevlendirilmiş ve ardından hidroksil fraksiyonlarının trimetilsilasyonu ile asit forma çevrilmiştir. Asıl ve çevrilmiş asitten türevlendirilmiş örnekler, negatif iyonizasyon kütle spektroskopisi kullanılarak GC/MS ile saptanmıştır. İlaçlar terapötik dozlarda uygulanmıştır. Klinik örneklerin analizi için metodun yeterli hassasiyet, doğruluk, kesinlik ve seçiciliğe sahip olduğu ifade edilmiştir. Metodun lovastatin ve simvastatinin hem lakton hem de asit formlarının tayinine olanak sağladığı, ve ayrıca PRA'nın saptanmasında da uygulanabilir olduğu belirtilmiştir.

Iacona ve ark.[18], plazmadaki PRA'nın analitik tayini için ters faz HPLC ile UV deteksiyon tekniğini geliştirmişlerdir. Ekstraksiyon ve örnek arındırma işlemleri basit ve uygulanabilir özelliktedir. Elde edilen kromatogramlarda endojen plazma içeriklerinin ve PRA ile birlikte alınan diğer antikolesterolemik ajan veya ilaçların yarattığı girişim bulunmamaktadır. PRA için tayin limiti 2 ng/ml olup standart eğrisi 5-200 ng/ml arasında doğrusaldır. Saptama sınırında varyasyon sabiti %10'dan düşüktür. Bu metod iki hiperkolesterolemik kalp nakli olan alıcı ve iki hiperkolesterolemik nakil yapılmamış hastada, PRA plazma düzeylerindeki çalışmada kullanılmıştır. Burada anlatılan metodun, hastalar üzerinde PRA'nın terapötik etkisinin incelenmesinde ideal olduğu sonucuna varılabileceği belirtilmiştir.

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. Kimyasal Maddeler

Standart pravastatin tetrametilbütülinin Bristol-Myers Squibb Firmasından temin edilmiştir. Test yöntemi olarak HPLC'yi referans gösteren şekilde uygulandığında % 100.0 saflıkta olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, ϵ (1 cm, % 1) 239 nm'de 434 absorptivite, spesifik rotasyon 20 °C'de ve D ışığında $[\alpha]$ olarak +116 verilmektedir.

İç standart maddemiz olan LNS Bilim İlaç San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir.

Hidroklorik asit, sodyum hidroksit, etanol, boraks ve asetonitril, 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 apareylerde 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) oluşmaktadır. Veriler OS/2 WARP (Versiyon 3.0) programı altında PC 1000 (Versiyon 2.6) ile işlenmiştir.

Analizler, 75 μ m iç çaplı çıplak silika kolon (Phenomenex) kullanılarak yapılmıştır. Kolon, 50 cm si etkin olmak üzere toplam 86 cm uzunluğundadır.

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

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

Çözeltideki partikülleri çöktürmek için Sigma 1-2 model santrifüj aleti kullanılmıştır.

3.3. Çalışma Elektrolitinin Hazırlanması

Borat tamponu stok çözeltisi hazırlamak için 9.53 g boraks tartılıp distile su ile çözülerek 250 ml'ye tamamlanmıştır.

Bu çözeltiden 10 ml alınmış üzerine 10 ml asetonitril (ACN) ilave edilip pH'sı 8.5 olarak ayarlanmış ve 100 ml'ye tamamlanarak çalışma elektrolit çözeltisi hazırlanmıştır.

3.4. Kapilerin Yıkama İşlemleri

Her enjeksiyon öncesinde kolon, sırası ile 0.1 M NaOH, distile su ve yukarıda sözü edilen elektrolit çözeltisi ile 2'şer dakika yıkanmıştır.

3.5. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

PRA'nın stok çözeltisini hazırlamak amacıyla 12.9 mg pravastatin tetrametilbütilaminin 10 ml etanolde çözülüp distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden sırasıyla 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ml alınarak distile su ile 6 ml' ye seyreltilmiştir. Bu çözeltilerden de 2'şer ml alınıp üzerlerine 1 ml IS çözeltisi, 1 ml ACN ve 1 ml elektrolit çözeltisi ilave edilerek 1.56×10^{-5} ve 7.78×10^{-5} M (bu derişimler pravastatin sodyuma göre çevrilmiştir) konsantrasyon sınırlarında beş çözelti hazırlanmıştır.

IS'nin stok çözeltisi, 5.5 mg LNS'nin distile suda çözülüp üzerine bir damla 0.1 M NaOH çözeltisi ilave edilerek distile su ile 50 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır.

3.6. Tabletlere Uygulanan İşlemler

On adet Pravachol[®] (her tablet 10 mg Pravastatin sodyum içermektedir) tablet tam olarak tartılıp (1.996 g), bir tabletin ortalama ağırlığı (0.200 g) hesaplandıktan sonra havanda dövülmüş ve homojen şekilde karıştırılmıştır.

Kapiler elektroforetik çalışmalarda kullanılacak tablet çözeltisini hazırlamak için yaklaşık 5 mg kadar PRA içeren tablet tozu tartılarak az miktarda su ile çözöldükten sonra 50 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. Tablet çözeltileri süzme işleminden sonra 5.600 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen çözeltilerden, önce 3 ml alınıp 6 ml' ye distile su ile seyreltilmiş ve bu hazırlanan çözeltilerden de 2'şer ml alınıp üzerlerine 1 ml IS özeltisi, 1 ml ACN ve 1 ml'de elektrolit çözeltisi ilave edilerek kapiler elektroforez aletine enjekte edilmek üzere tablet çözeltileri hazırlanmıştır.

4. SONUÇ ve TARTIŞMA

4.1. Yöntemin Optimizasyonu

Analitik kimyada optimum koşulların oluşturulması sürecinde, göz önüne alınması gereken koşullar vardır. Bütün bu uygunlukların (efficiency) bir araya getirildiği analitik (çözelti bileşimi, oranları, pH, iyon şiddeti ve diğerleri) ve aletsel (tayin dalgaboyu, uygulanan voltaj, enjeksiyon süresi ve diğerleri) parametrelerin araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmaya öncelikle en önemli parametrelerden biri olan elektrolit çözeltisi hazırlanarak başlanılmıştır. PRA'nın en uygun sürede geldiği elektrolit sistemi, 10 mM borat ve %10 ACN'den oluşan pH 8.5 olarak belirlenmiştir. Bu elektrolit çözeltisi içerisinde PRA'nın 4.8 dakika dolaylarında belirlediği saptanmıştır. PRA'nın tayini için yaklaşık beş dakikalık bir analiz sürecinin uygun bir süre olduğu söylenebilir.

Statinlerden biri olan fluvastatin üzerinde yapılan bir çalışmada benzer tampon sistemi kullanılmıştır. Ancak, kullanılan elektrolit sistemi pH 8.0'dir ve ACN içermemektedir. Çalışmaların sonuç olarak birçok benzer yönü bulunmaktadır [9].

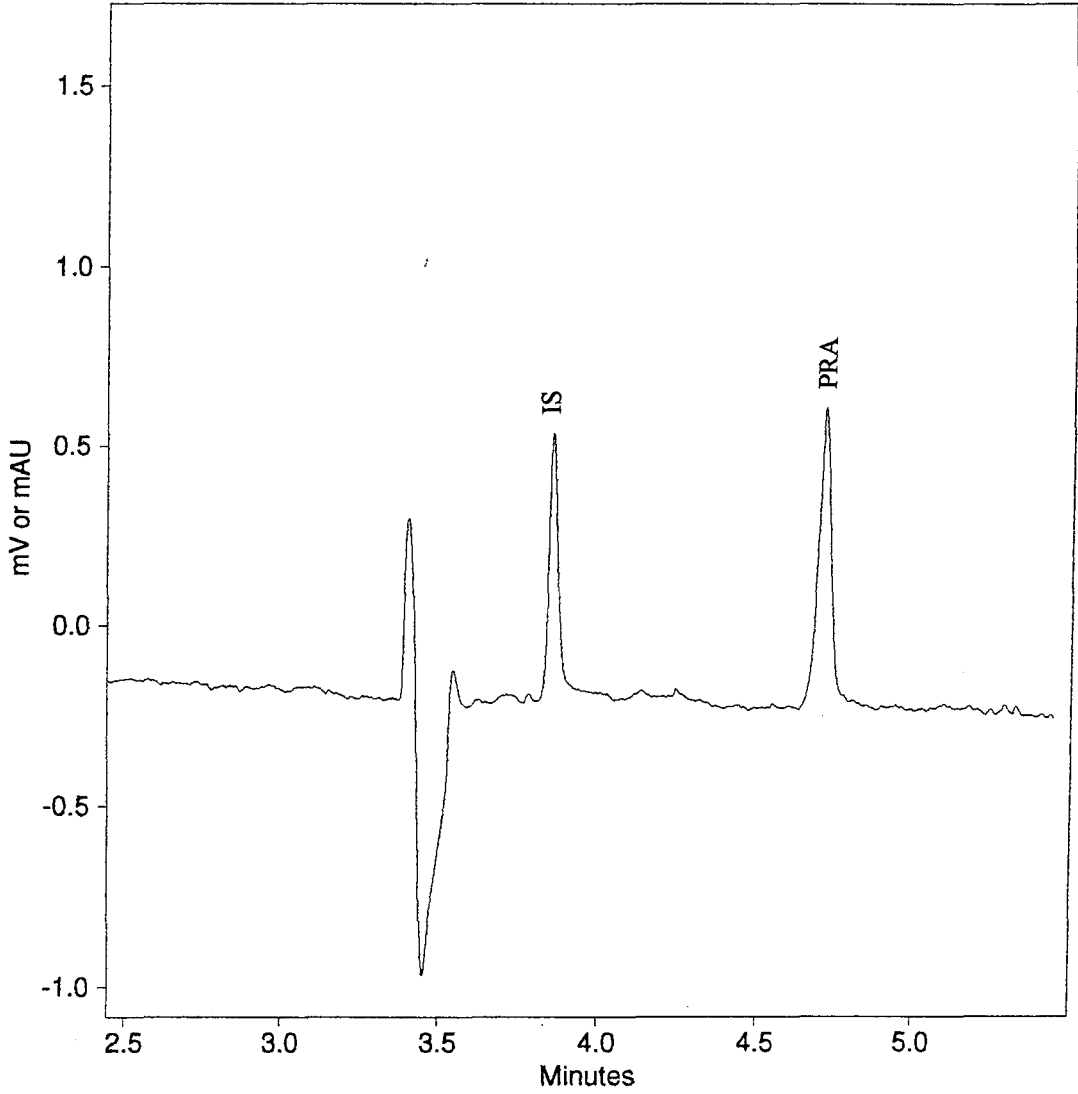
Çalışmanın bundan sonraki bölümü, iç standardın (IS) belirlenmesini kapsamaktadır. Gerek kromatografik gerekse kapiler elektroforetik çalışmalarda doğruluk ve kesinliğin sağlanabilmesi için IS kullanımının gereği yadsınamaz. Bu nedenle, çeşitli kimyasal maddeler denenmiş ve en uygun kimyasal bileşiğin LNS olduğu bulunmuştur. Fluvastatin çalışmasında IS olarak fenobarbital sodyum kullanılmıştır [9].

10 mM borat ve %10 ACN'den oluşan pH 8.5 elektrolit sistemi kullanılarak, 0.5 s enjeksiyon süresinde, 27.5 kV voltaj uygulanmasıyla ve analitlerin kapiler penceresi önünden geçmeleri sırasında 200 nm'de tayin edilmesiyle elektroferogramlar elde edilmiştir.

6.2×10^{-5} M PRA ve 5.6×10^{-5} M IS'den oluşan örnek çözeltinin yukarıdaki koşullardaki elektroferogramı Şekil 4.1'de verilmektedir.

Belirtilen koşullarda yöntemin validasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için yukarıdaki belirtilen analitik ve aletsel koşullarda 6.2×10^{-5} M PRA ve 5.6×10^{-5}

M IS içeren oluşan örnek çözeltisi 8 kez enjekte edilmiş ve PRA ve IS ile ilgili piklerin alan ve göç zamanları açısından integrasyonu, bunlara ek olarak pik normalizasyon (Düzeltilmiş pik alanı, pik alanı/göç zamanı, PN) ve pik normalizasyon oranları (PN_{PRA}/PN_{IS}) değerlendirilmeleri yapılmıştır.



Şekil 4.1. PRA ve LNS'nin 10 mM borat ve %10 ACN den oluşan pH 8.5 elektroliti içerisinde 0.5 s enjeksiyon, 27.5 kV uygulayarak 200 nm'deki elektroferogramı

Kapiler elektroforez ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, tekrarlanabilirlik çalışmalarının sonuçlarının; göç zamanları[20-22], pik alanları

[20-22] ve pik alan normalizasyonlarının [20,23] %RSD (bağıl standart sapma) değerlerine göre yorumlandığı görülmektedir. Buradan yola çıkarak hesaplanan %RSD değerleri Çizelge 4.1’de verilmektedir.

Çizelge 4.1. PRA ve LNS alan ve göç zamanları açısından integrasyonu, bunlara ek olarak pik normalizasyon ve pik normalizasyon oranları değerlendirilmeleri

	Alan PRA	Göç Zamanı(dk) PRA	Alan IS	Göç Zamanı(dk) IS	PN PRA	PN IS	PN(PRA)/PN(IS)
1	1955	4.929	1311	4.082	396.63	321.17	1.23
2	2036	4.755	1421	3.957	428.18	359.11	1.19
3	2275	4.759	1520	3.921	478.04	387.66	1.23
4	2176	4.677	1361	3.832	465.27	355.17	1.31
5	2274	4.620	1447	3.806	492.21	380.19	1.29
6	2277	4.732	1409	3.865	481.19	364.55	1.32
7	2131	4.780	1334	3.896	445.82	342.40	1.30
8	2183	4.769	1477	3.877	457.75	380.96	1.20
x_{ort}	2163.4	4.753	1410	3.905	455.64	361.40	1.26
SD	118.83	0.089	71.77	0.086	31.45	22.23	0.052
%RSD	5.49	1.88	5.09	2.20	6.90	6.15	4.13

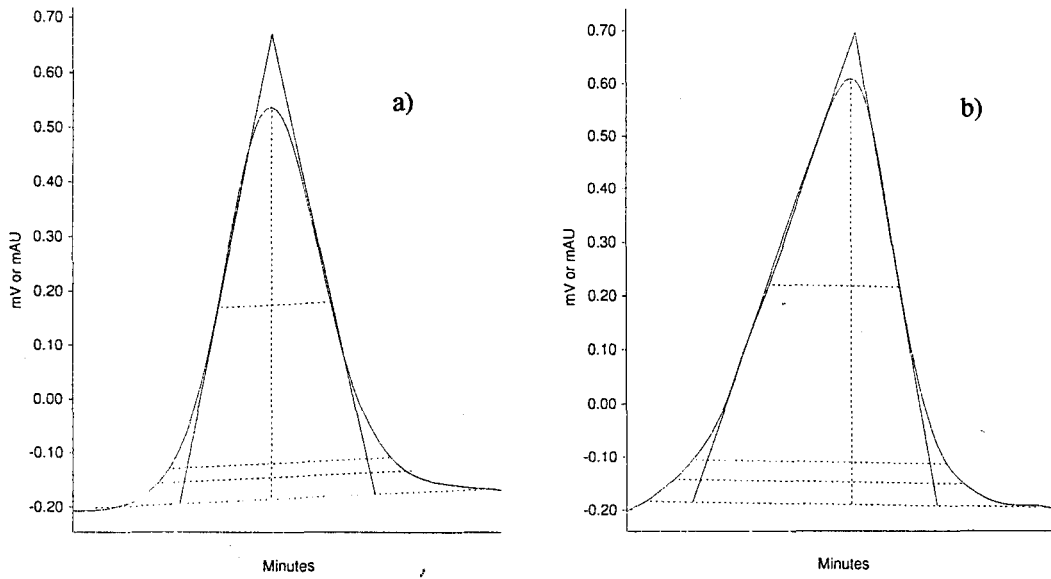
Yukarıdaki değerlendirmeler incelendiğinde, en uygun tekrarlanabilirlik ve kesinlik (precision) değerlerinin PN_{PRA}/PN_{IS} ’den elde edildiği görülmektedir. Çalışmanın bu bölümünden itibaren tüm kantitatif işlemlerde PN_{PRA}/PN_{IS} değerlerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Elektroozmozun ortalama 3.4, IS’nin 3.9 ve PRA’nın 4.8 dakika dolaylarında belirlediği görülmüştür. Ayırım 319.8 V/cm’lik (27500 V / 86 cm) elektriksel alan altında gerçekleştirilmiştir.

Elektroozmozun hızı 0.245 cm/s olarak hesaplanmış, IS ve PRA’nın elektroforetik hızları ise $V_{net} = V_{eo} - V_{ep}$ formülünden IS için 0.031, PRA için 0.070 cm/s değerlerinde bulunmuştur.

Bu koşullarda, saptama sınırı (Limit of Detection, LOD) $S/N=3.3$ kabul edilerek 8.98×10^{-6} M olarak hesaplanmıştır.

PRA ve IS nin pikleri ile ilgili integrasyon kayıtları Şekil 4.2’de, değerlendirmeleri Çizelge 4.2’de verilmektedir.



Şekil 4.2.a. IS'nin pikleri ile ilgili kayıtlar

b. PRA'nın pikleri ile ilgili kayıtlar

Çizelge 4.2. PRA ve IS'nin pikleri ile ilgili integrasyon değerlendirmeleri

Parametreler	PRA	IS
Ortalama Alıkonma Zamanı(dak)	4.75	3.9
Kapasite Faktörü	8.5	6.7
Alan	2091	1367
Tabandaki Pik Yüksekliği(dak)	0.074	0.050
Simetri Faktörü	0.82, 0.82	1.11, 1.11
Asimetri Faktörü (%10)	0.80	1.09
Tabaka	64995, 74820	94943, 100358
Tabaka/metre	649952, 748196	949435, 1003579
Ayırım (resolution)	13.9, 14.7	7.92, 7.73
Teorik Tabakaya Eşdeğer Yükseklik(mm)	0.00154, 0.00134	0.00105, 0.000996

Bu değerlendirmelerden anlaşıldığı gibi oldukça simetrik pikler elde edilirken, pikleri etkileyen herhangi bir girişime rastlanmamıştır. Buradan da seçiciliğin tümüyle sağlandığı sonucu çıkmaktadır.

Tüm validasyon sonuçları, yöntemin seçiciliği ve sonuçların kısa sürede alınabiliyor olması gibi üstünlüklerinden sonra geliştirilen yöntemle PRA tabletlerinde analizler yapılarak yöntemin kullanılabilirliği incelenmiştir.

4.2. Doğrusallığın İncelenmesi

Doğrusallık incelemeleri, içerisinde sabit derişimde 5.6×10^{-5} M IS ve 1.56×10^{-5} - 7.78×10^{-5} M derişimleri arasında beş ayrı PRA derişimi bulunan üç grup standart çözelti hazırlanmış ve bunlar üç ayrı günde yukarıda belirtilen koşullarda alete verilmiştir. Bu kalibrasyon setleri gün içi ve günler arası şeklinde; derişimin PN_{PRA}/PN_{IS} değerlerine karşı incelenmesi ile değerlendirilmiştir. Bunlar Çizelge 4.3’de verilmektedir.

Çizelge 4.3. Gün içi ve günler arası kalibrasyon değerlendirmeleri

Parametreler	Gün içi kalibrasyon k=1, n=5	Günler arası kalibrasyon k=3, n=15
Eğim \pm SD	20745.24 \pm 182.36	21573.31 \pm 1921.15
Kesim	0.000679	-0.0428
Korelasyon katsayısı (r)	0.99996	0.9961
Eğim \pm Güven Aralığı (0,05)	20745.24 \pm 214.3	21573.31 \pm 998.3

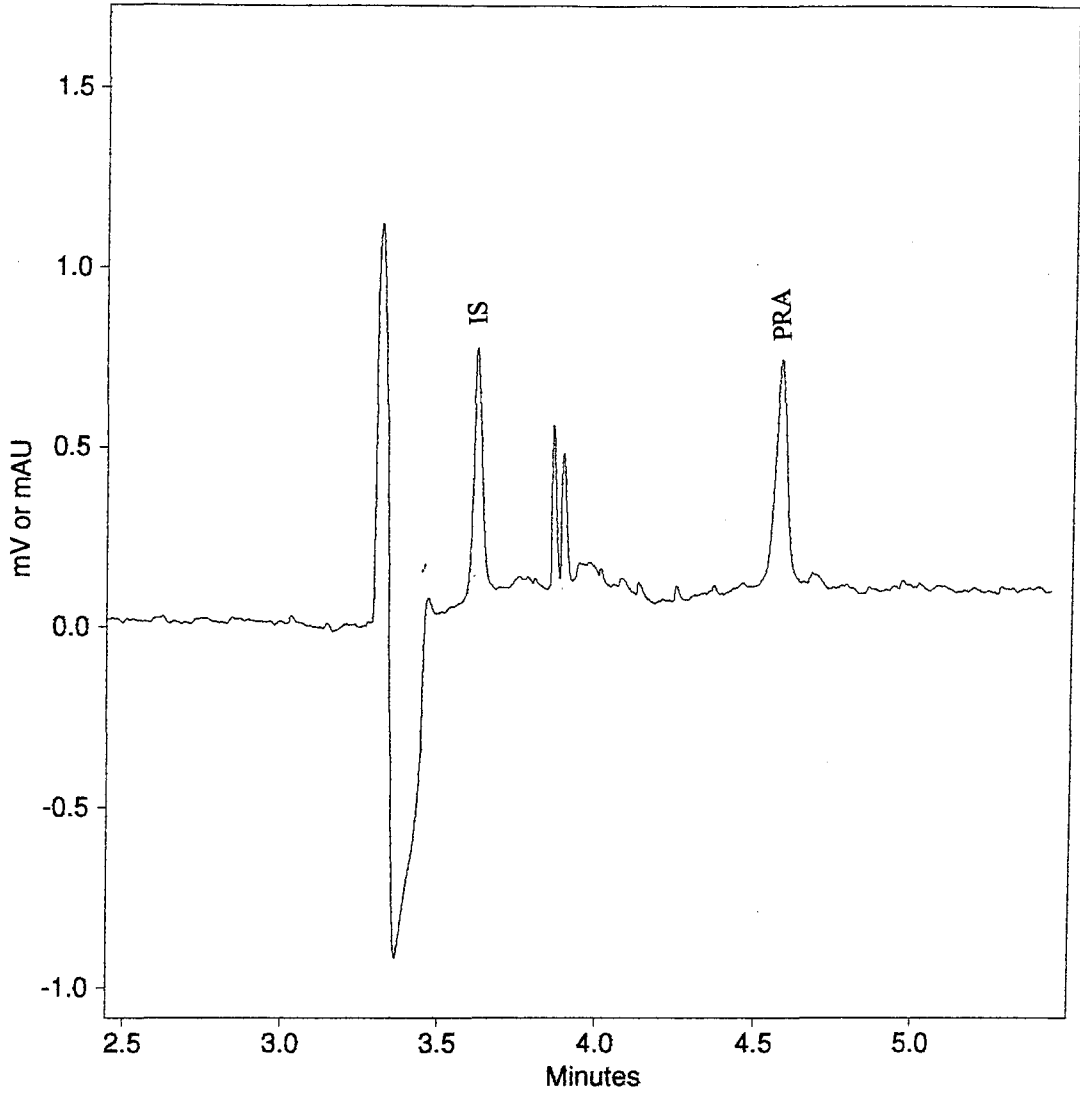
(k: Set sayısı , n: numune sayısı, SD: Standart sapma)

Yukarıdaki değerlendirmeler altında gün içi ve günler arası değerler oldukça iyi doğrusallık taşımaktadır. Noktalar arasındaki ilişkide biraz düşüklük olmakla birlikte eğimler arasında yakınlık göze çarpmaktadır.

4.3. Geliştirilen Yöntemin Tabletlere Uygulanması

Geliştirilmiş yöntemin tabletlere uygulanışı iki amaçla yapılmaktadır. Bunlardan birincisi yöntemin uygulanabilirliğinin incelenmesi, ikincisi ise hazırlanmış tabletlerin farmakope koşullarını taşıyıp taşımadığının araştırılmasıdır.

Yöntemimiz seçici olduğundan, bir çok yönden diğer yöntemlere göre üstün olduğu ve tablet çözeltilerinin CE’ye enjekte edilmesiyle tablet içeriklerinden gelen bir karışıklığın söz konusu olmadığı rahatlıkla söylenebilir. Elde edilen elektroferogramlardan tablet katkı maddelerinin gerek PRA ve gerekse IS ile girişim yapmadığı gözlenmiştir. Şekil 4.3’de tabletlerdeki PRA örneğinin bir elektroferogramı görülmektedir.



Şekil 4.3. Tabletlerdeki PRA örneğine IS katıldıktan sonra kaydedilen elektroferogramı

Deneysel bölümde anlatıldığı gibi hazırlanan örnekler alete verilecek duruma getirilmiştir. Gerekli yıkama ve koşullandırma işlemlerinden sonra kapilere enjekte edilmiş ve sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar, Çizelge 4.4'de verilmektedir.

Çizelge 4.4. PRA tabletlerdeki analiz sonuçları.

Deney No	% Saflık
1	111.4
2	102.8
3	107.3
4	104.1
5	107.3
6	112.4

Bu sonuçlardan yararlanılarak istatistiksel hesaplamalar yapılmış ve Çizelge 4.5' deki değerler elde edilmiştir.

Çizelge 4.5. PRA tablet deneyinin istatistiksel hesapları

Ortalama (%)	107.6
Standart Sapma (SD)	3.82
Bağıl standart Sapma (%RSD)	3.55
Güven Sınırları(CL)	± 4.01

Statinlerden bazıları farmakopelere girmiştir[19]. Örneğin simvastatin ve lovastatin ile ilgili monograflar bulunmasına karşın, PRA'nın monografı henüz farmakopelerde yer almamıştır. Monografı olanlarla monografı olmayan tüm preparatların 10 mg aktif madde içerdiği göz önüne alınırsa monografı olmayanlarında olanlara benzer koşullar taşıyacağı sonucu çıkar ve aşağıdaki tartışmanın geçerli olacağı söylenebilir.

Farmakopelerde statinlerin genellikle miktar tayinleri HPLC ile yapılmaktadır ve genellikle %10 sınırları arasında bir hataya izin verilmektedir[19]. Yukarıdaki sonuçlar göz önüne alındığında ortalama bir tabletin % 107.6 olduğu hesaplanmıştır. Bu değer % 90-110 değerleri arasında kalmaktadır. Yapılan analizlerin kesinliği (precision) 3.55 gibi iyi sayılabilecek bir değerdedir. Bu bilgiler ışığında geliştirilen yöntemin kesinlik, doğruluk (accuracy) gibi istatistiksel değerlendirmelere sahip olduğu ve ek olarak çoğu yöntemle göre 5 dakikada sonuç alınabilecek bir hızda, aynı zamanda da kullanılabilen malzeme cinsinden son derece ucuz bir yöntem olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. LENNERNÄS, H., FAGER, G., *Clin Pharmacokinet*, **32**, 403-425, 1997.
2. STONE, N., J. BLUM, C., B., WINSLOW, E., Management of Lipids in Clinical Practice, Professional Communications Inc., 1997, s:178-186.
3. HARIA, M., MCTAVISH, D., *Drugs*, **53**, 299-336, 1997.
4. OTTER, K., MIGNAT, C., *J. Chromatography B*, **708**, 1-2, 235-241, 1998.
5. SIEKMEIER, R., GROSS, W., MARZ, W., *Int. J. Clin. Pharmacology and Therapeutics*, **38**, 9, 419-425, 2000.
6. MULVANA, D., JEMAL, M., PULVER, S. C., *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **23**, 851-866, 2000.
7. DUMOUSSEAU, C., MURAMATSU, S., TAKASAKI, W., TAKAHAGI, H., *J. Pharm. Sciences*, **83**, 11, 1630-1636, 1994.
8. NAIR, J.B., IZZO, C.G., *J. Chromatography*, **640**, 1-2, 445-461, 1993.
9. DOGRUKOL-AK, D., KIRCALI, K., TUNCEL, M., and, ABOLU-ENEIN, H., Y., *Biomedical Chromatography*, **15**, 389-392, 2001.
10. KAWABATA, K., MATSUSHIMA, N., SASAHARA, K., *Biomedical Chromatography*, **12**, 5, 271-275, 1998.
11. MORRIS, M., J., GILBERT, J., D., HSIEH, J., Y., -K., MATUSZEWSKI, B., K., RAMJIT, H., G., and, BAYNE, W., F., *Biological Mass Spectrometry*, **22**, 1-8, 1993.
12. NAKAYA, N., GOTO, Y., *Drugs Affecting Lipid Metabolism*, Berlin: Springer-Verlag, 274-277, 1987.
13. MARKS, D., B., MARKS, A., D., SMITH, C., M., *Basic Medical Biochemistry*, A Waverly Company, 1996, s:525.
14. APPEL, S., DINGEMANSE, J., *Drugs Today*, **32**, 39-55, 1996.
15. QUION, J.A.V., JONES, P.H., *Clin Pharmacokinet*, **27**, 94-103, 1994.
16. DESAGER, J.P., HORSMANS, Y., *Clin Pharmacokinet*, **31**, 348-371, 1996.
17. The Merck Index, An Encyclopedic of Chemicals, Drugs and Biologicals, Twelfth edition, Published by Merck Research Laboratories Division of MERCK & Co., Inc., 1996, s: 916, 1323.

18. IACONA, I., REGAZZI, M.B., BUGGIA, I., VILLANI, P., FIORITO, V., MOLINARO, M., GUARNONE, E., *Therapeutic Drug Monitoring*, **16**, 2, 191-195, 1996.
19. The United States Pharmacopeia XXIV, Marck Printing Co., Easton, 2000, s: 992-993, 1521-1522.
20. TAGLIARO, F., MANETTO, G., BELLINI, S., SCARCELLA, D., SMITH, F.P., MARIGO, M., *Electrophoresis*, **19**, 42-50, 1998.
21. DAALI, Y., CHERKAOUI, S., CHRISTEN, P., VEUTHEY, J.L., *Electrophoresis*, **20**, 3424-3431, 1999.
22. CHINAKA, S., TANAKA, S., TAKAYAMA, N., TSUJI, N., TAKOU, S., UEDA, K., *Analytical Sciences*, **17**, 649-652, 2001.
23. MATEUS, L., CHERKAOUI, S., CHRISTEN, P., VEUTHEY, J.L., *J. Chromatography A*, **868**, 285-294, 2000.